

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21574

研究課題名（和文）放射線療法、化学療法に伴い正常食道上皮に生じるゲノム異常の解明

研究課題名（英文）Elucidation of genomic abnormalities in normal esophageal epithelium associated with radiation therapy and chemotherapy

研究代表者

横山 顕礼（Yokoyama, Akira）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20515514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、放射線療法に伴う正常食道上皮に生じるゲノム異常を解明するために、放射線療法後に、食道上皮がどのようなゲノム異常が蓄積するのかを解明することを目的とした。1例から放射線照射内の非腫瘍部から6カ所、照射外から3カ所のマルチサンプリングを行った。照射外ではドライバー変異を認めるにも関わらず、照射内の粘膜では、ドライバー変異が消失する現象を認めた。7例28サンプルの放射線照射内の食道粘膜を用いて再現性コホートを行ったが、82% (23/28) でドライバー変異を認め、再現性を認めなかった。このため、一定の条件で、食道ドライバーが消失すると考えられたが、その条件を見出すには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道がんは、フィールドがん化を呈するがんであり、飲酒・喫煙といったリスク因子の長期的な暴露により、食道全体ががんのリスクが高いため、一度治療しても高い異時性多発がんの発症が報告されている。食道粘膜に対する放射線療法の効果は、このような異時性多発を減少させると考えられるプラスの面と、2次発がんのマイナス面と両面が有するが、食道粘膜にどのようなゲノム異常が生じるのか、その機序を理解することは、極めて重要である。今回は、全面的な解明には至らなかった。ドライバー変異がどのような症例に消失するのか、更に検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the genomic abnormalities that accumulate in normal esophageal epithelium after radiation therapy. We performed multiple sampling of 6 sites from non-tumor areas within radiation therapy and 3 sites outside radiation therapy. Despite the presence of driver mutations outside of radiation therapy, we observed a phenomenon of disappearance of driver mutations in the mucosa within irradiation. 28 samples of esophageal mucosa within radiation therapy in 7 cases were used for a reproducibility cohort, but 82% (23/28) had driver mutations and were not reproducible. Therefore, we hypothesized that under certain conditions, esophageal drivers would disappear, but we were unable to find such conditions.

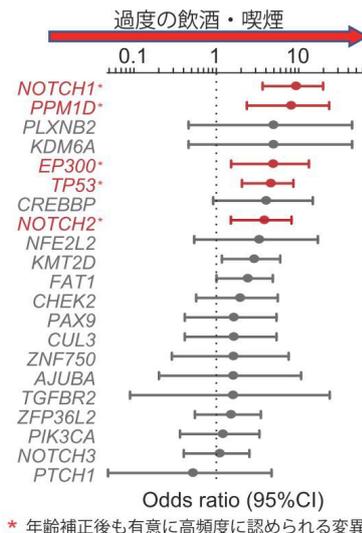
研究分野：ゲノム研究

キーワード：食道がん フィールドがん化 放射線療法 飲酒 喫煙 ゲノム異常

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんはドライバー変異を獲得した細胞のクローン性増殖によって特徴づけられる病気だが、近年、一見正常に見える皮膚や血液においても、このようなクローンの拡大が生じていることが報告されている。こうした食道上皮の「再構築」は、全ての健常人で例外なく認められるが、特に食道がんのリスク因子となる高度の飲酒と喫煙歴のある人では、この過程が強く促進されており、特に、*NOTCH1*、*PPM1D*、*EP300*、*TP53* 変異等が、食道がんリスク因子を有する症例で有意に高頻度に認められた¹ (右図)。このことは、飲酒、喫煙といったリスク因子の慢性的な暴露により正常食道上皮のクローン選択が生じていることを意味する。進行期の食道扁平上皮がんの治療法は、手術療法のみならず、化学療法、放射線療法を組み合わせ



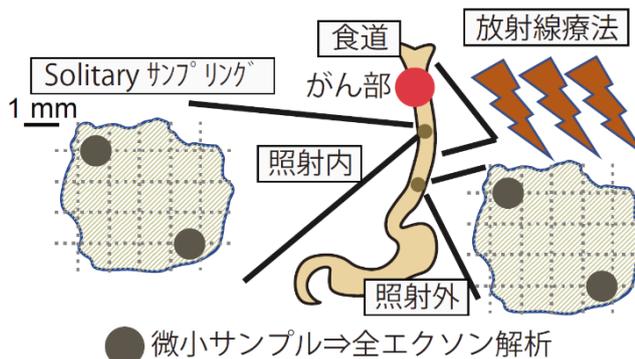
合わせた集学的な治療が施行される。化学療法で用いられる 5-FU は、粘膜障害が主たる有害事象であり、放射線療法ではさらに重度な粘膜障害が生じ、一時的に、正常食道上皮が剥がれ、びらん面を形成する。このような粘膜障害が生じた後に、食道上皮が再生して治癒してゆく過程で、食道上皮がどのような遺伝子変異によるクローン選択が行われるかは不明であり、ゲノム異常を解明したいと考えた。

2. 研究の目的

本申請研究は、放射線療法、または、化学療法に伴う正常食道上皮に生じるゲノム異常を解明するために、治療介入後に、食道上皮が再生して治癒してゆく初期の粘膜修復の過程で、どのようなゲノム異常が蓄積するのかを解明することを目的とする。

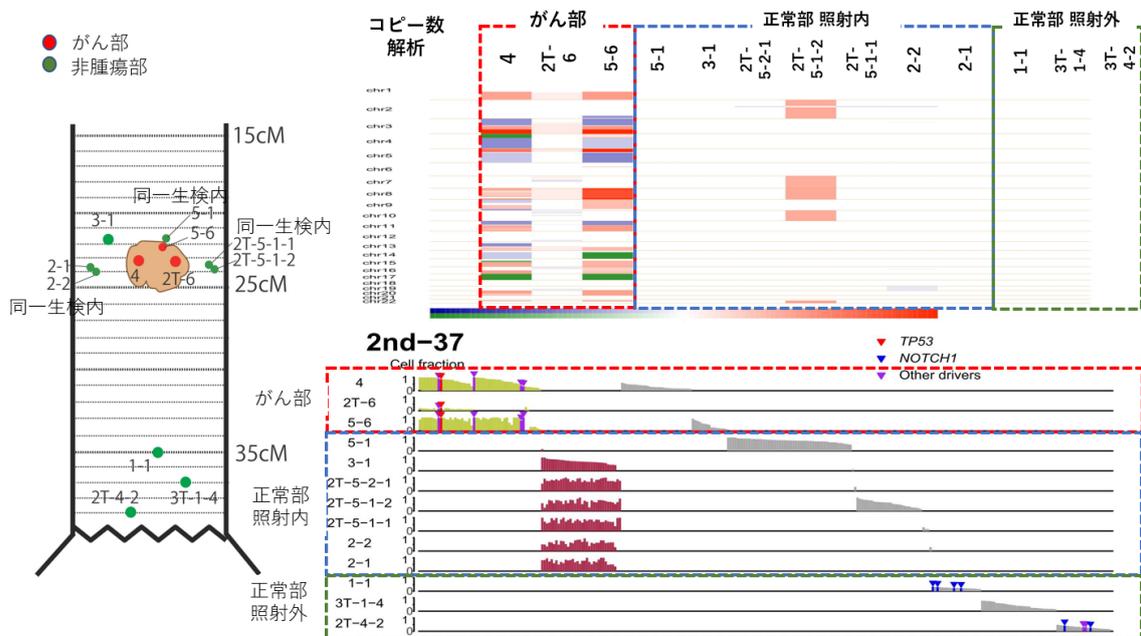
3. 研究の方法

放射線療法や化学療法の治療歴のない ESCC 患者より同意を得た上で、がんから離れた放射線照射範囲内と照射範囲外のびらん部や潰瘍部ではない完全に上皮化した部位から狙撃生検を行い、採取した生検サンプルは実体顕微鏡下で粘膜下層を除去し上皮を単離した。その上で、別クローンを観測するために、1個の生検サンプルから対角線上に離れた2個の直径1mmのパンチ生検を行い、微量DNAからの全エクソン解析を行った (右図)。



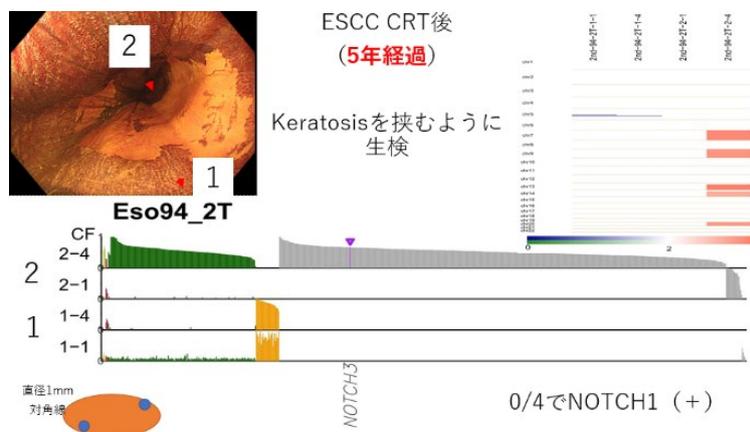
4. 研究成果

(1) 飲酒歴・喫煙歴をともに認めない 80 代女性。右上葉肺がんに対して放射線照射 (73 歳時)、その後、右胸壁転移に対して放射線照射 (83 歳) の既往があり、放射線照射内に生じた食道がん発生した。本症例に対して、がん部から 3 サンプル、照射外の非腫瘍部から計 3 サンプル、そして、照射内の非腫瘍部から計 6 サンプル採取して全エクソン解析を行った。



がん部では、通常の食道発がんと同様に、*TP53* を主体としたドライバー変異をメジャークロークロンに認めた。また、放射線照射外の3サンプル中2サンプルで *NOTCH1* 変異を含む食道ドライバーを認めた。この一方で、照射内の非腫瘍部6サンプルでは、*NOTCH1* 変異を含むドライバー変異を全く認めなかった。同時に、コピー数解析も行ったが、がん部は、通常発がんと同様に、genome instabilityを生じていたが、非腫瘍部は、1サンプルを除いて、コピー数異常を認めなかった。

(2) 放射線照射内で食道ドライバー変異が消失する現象に関して、再現性を確認するために、食道への放射線照射歴のある計7例から照射内食道を計28サンプル採取して、全エクソン解析を行った。代表例を右図に示す。症例は、根治的放射線療法により完全寛解後5年目で、経過観察



中の方である。放射線照射部にケラトシスが生じていたため、これを目印として、前後2カ所の生検から、それぞれ、対角線上にサンプリングして、計4か所の全エクソン解析を行った。4か所のサンプルの中で、1生検は、共通変異を有していた。1サンプルで、*NOTCH2* 変異は認められたが、*NOTCH1* 変異を主体とするその他の食道ドライバー変異を認めなかった。コピー数異常も1サンプルに認めたのみで、前述した手術例と再現性が確認できた症例も存在した。ただし、計28サンプル中、23サンプルでは何らかの食道ドライバーを認め、手術例のように、全く照射内の正常部に食道ドライバーを認めない症例は、再現性実験を行った7例中1例のみであった。

(1) (2) より、症例によっては、放射線療法後の正常食道に、食道ドライバーが消失するクローン選択が生じたが、普遍的な変化ではなく、限定的な変化である可能性が示唆された。実際に dNdS を用いて、陽性選択変異の解析を行ったが、*NOTCH1* は、 $qglobal_cv=1.59E-10$ であり、陽性選択

されており、*NOTCH1* 以外のドライバー変異では、*PPMID* のみが、 $q\text{-value} < 0.05$ であった。

- 1 Yokoyama, S. *et al.* Age-related changes of color visual acuity in normal eyes. *PLoS One* **16**, e0260525, doi:10.1371/journal.pone.0260525 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------