

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791854

研究課題名(和文)一塩基多型解析による子宮体癌幹細胞の個性診断

研究課題名(英文)An individual diagnosis of uterine cancer stem cells by SNP analysis

研究代表者

野村 弘行(NOMURA, HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50327590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：子宮体癌に対する術後補助化学療法の効果을早期に的確に判定する手法の構築を目指し、薬物反応を規定する宿主側因子としての一塩基多型(SNP)に着目した。網羅的SNP解析を行い、治療ターゲットとしての癌幹細胞個性診断を試みた。本研究により、化学療法時の薬物反応と相関する薬物代謝関連の特定のSNPを選別することができた。これらは化学療法の毒性の予測と同時に、治療効果をも予測する因子として有用であった。以上のことから、個体のゲノム情報に基づいた癌幹細胞個性診断が、新たな個別化治療戦略に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Single nucleotide polymorphisms (SNPs) analysis is expected as the personalized medicine in pharmacotherapy. In this study, we attempted to extract SNPs correlated with drug response of adjuvant chemotherapy for uterine cancer as an individual diagnosis of cancer stem cells. A comprehensive SNP analysis was conducted, and specific SNPs on drug metabolism genes were identified. These SNPs may be useful in predicting toxicities as well as effects of chemotherapy. An individual diagnosis of cancer stem cells based on genomic information could apply to a new personalized treatment for uterine and other cancers.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：一塩基多型 化学療法 効果予測 子宮体癌 卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌の治療では、初回手術後に再発高リスク群とされる進行症例においては術後補助化学療法が施行される。子宮体癌に対する化学療法は、近年、卵巣癌に対して標準的に用いられているパクリタキセル+カルボプラチン併用療法(TC療法)の有効性が示され、これが広く行われつつある。しかしながら、補助化学療法を行う場合には画像検査等で診断しうる評価可能病変が存在しないため、治療前や治療後早期に化学療法的確な効果予測ができないことが臨床上の大きな問題点である。通常、術後補助化学療法の有効性が明らかになるのは治療終了後長期間を経た後であり、無効な場合は患者への負担および医療経済上の負担は大きい。

近年、薬物代謝に関与する一塩基多型(SNP: single nucleotide polymorphism)が数多く見出され、SNP解析は薬物療法における個別化医療としての応用が期待されている。肺癌や乳癌では、抗癌剤の毒性と治療効果が相関し、これを規定する因子としてのSNPの存在が報告されている。このことは癌宿主である個体の特性を規定している生物学的・遺伝的因子が、癌細胞の特性をも共通して規定しており、臨床的な標的病変によらない宿主側因子に基づく治療効果予測の可能性を示唆するものである。

上記の視点で考えた場合、化学療法に対する反応に関与するSNPが正常幹細胞より癌幹細胞に受け継がれ、このことが抗癌剤の効果および副作用に関与するという仮説がたてられる。すなわち、癌幹細胞は正常幹細胞およびその分化した細胞が遺伝子変異を来たして発生しその性格は後天的な遺伝子変化に関連すると考えられてきたが、癌幹細胞の個性は宿主固有の個性を受け継いでおり癌幹細胞の性格は先天的に決定されていると考えることができる。

これまで申請者らの研究グループでは、婦人科がんの腫瘍進展、治療効果予測、早期診断等に関与する各種の新規バイオマーカーを、癌細胞自体の分子生物学的特徴に着目した解析や癌細胞を用いたマイクロアレイ解析にて報告してきた。しかしながら、従来の網羅的遺伝子情報から統計学的手法により薬物の効果や副作用を予測する手法は再現性が低く、未だ確立された有効な方法は見いだせていない。すなわち、真のターゲットを同定するためには、従来と全く異なるアプローチによる遺伝子機能に基づく解析手法と同時に、個別化が必要である。

以上の観点から、宿主側因子としてのSNPに着目した癌幹細胞個性診断へのアプローチは、治療効果を予測する新規手法の構築のみならず、子宮体癌およびその他の婦人科がんの治療の個別化と予後改善につながる有効な治療戦略になるものと考えられる。

2. 研究の目的

一般に術後補助化学療法の場合は肉眼的には腫瘍は無く、このような状況は癌幹細胞をターゲットにした治療になり、また癌幹細胞は正常幹細胞より遺伝子を受け継ぐため、好中球減少の程度は癌幹細胞の障害のサロゲートマーカーになる可能性がある。そこで本研究では、抗癌剤に対する反応に関与するSNPが正常幹細胞より癌幹細胞に受け継がれ、抗癌剤の効果および副作用に関与するという仮説を立て、SNP解析による子宮体癌幹細胞(EMCSC)の個性診断を試みる。

具体的には、本研究により以下の点を検証する。

(1) 従来の子測モデルの報告は癌細胞自体のsporadicな変化を解析する手法であったが、本研究ではSNPという宿主固有の変化を解析する事により、宿主の個性に基づいた予測モデルを確立する。

(2) 補助化学療法のターゲットとなる癌幹細胞におけるストレス応答・薬剤耐性に関与するマーカーとSNPとの関連性を検証する。これより、SNPによる癌幹細胞の個性診断に基づく診断キットを作成する。

本研究によって得られた知見により、化学療法の効果および副作用を施行前に的確に予測できるシステムを構築し、個別化医療としての臨床応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

術後補助化学療法の効果や副作用を予測しうる一塩基多型(SNP)を選別し、ゲノム情報に基づいた効果予測因子を同定する。選別した候補SNPは、癌幹細胞、epithelial mesenchymal transition (EMT)、およびストレス応答・薬剤耐性と関連したものを選別することで臨床的な意味づけを行い、癌幹細胞としての個性診断を試みる。

(1) 術後補助化学療法として標準レジメンであるTC療法を施行した子宮体癌もしくは上皮性卵巣癌症例を対象に、TC療法時の副作用としての好中球減少の程度と臨床効果としての無増悪生存期間(PFS)との相関性を検証する。

(2) 術後補助化学療法としてTC療法を施行した症例のうち、同意が得られ血液検体が採取された上記とは別の子宮体癌もしくは卵巣癌症例を対象に、血中リンパ球から抽出したDNAを用いて網羅的SNP解析を実施する。

(3) 副作用としての化学療法時の好中球減少の程度で分けた2群間で統計的に差の見られたSNPを選別し、さらにSNPの有無による臨床効果としてのPFSの差を検証する。

(4) 術後補助化学療法の効果や副作用を予測できる診断キットの作成を念頭に、これらの予測に最適な複数のSNPの組み合わせを、

統計学的手法を用いて抽出する。

4. 研究成果

(1) 術後補助化学療法時の副作用と臨床効果の相関性の検討

術後補助化学療法として TC 療法を施行した子宮体癌もしくは上皮性卵巣癌症例 81 例を対象とした。NCI-CTCAE による好中球減少の判定において、Grade 0-3 群の PFS に比較し Grade 4 群の PFS は有意に良好であった ($p < 0.01$)。多変量解析においても好中球減少は独立した予後因子であった ($HR = 0.50$, $p = 0.02$)。以上より、薬物療法時の正常細胞に対する反応 (副作用) と癌細胞に対する反応 (治療効果) との相関性が確認された。

(2) 網羅的 SNP 解析の実施

術後補助化学療法として TC 療法を施行し、血液中よりリンパ球を採取可能であった子宮体癌もしくは上皮性卵巣癌症例 63 例を対象とした。抽出した DNA 検体を用いて Illumina 社の SNP アレイを用いて網羅的 SNP 解析を施行した。

(3) 効果 / 副作用を予測しうる SNP の選別

初回 TC 療法 1 サイクル目の好中球減少が高度な群と軽度な群の 2 群間で分布に有意差 ($p < 0.05$) を認めた SNP を抽出した。臨床的な意味づけを行うため、これらの中から、進行症例においてオッズ比の高いものより 22 個の SNP を、薬物代謝関連 47 遺伝子上より 39 個の候補 SNP を選別した。さらに、これらの候補 SNP について、PFS との相関性も検証を行い、副作用と効果を同時に予測可能な候補 SNP を 5 個選別できた。

(4) 診断キットに使用しうる SNP の組み合わせの選別

TC 療法時の好中球減少が高度な群と軽度な群の 2 群間で分布に有意差を認めた SNP のうち、 p 値が小さいものから順に 200 個を対象にして、SVM 法を用いた判別分析にて、最も効率良く薬物反応を予測しうる SNP の組み合わせを検討した。タキサン代謝関連遺伝子を中心に 20 個の SNP が選別され、これらを用いた薬物反応の診断率は 98.4% であった。

以上の研究成果より、患者における特定の SNP の有無を調べることで化学療法時の薬物反応を予測しうる事が明らかとなり、個体のゲノム情報に基づいた薬物療法が可能であることが示された。

このことは、本来ヘテロな細胞集団である癌の分子生物学的特性に影響されない普遍化した治療効果予測を可能にするものである。本手法を従来の効果予測手法に加えて複合的に用いることにより、がん治療における新たな個別化治療戦略の構築への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

(1) 進 伸幸, 山上 亘, 野村 弘行, 阪埜浩司, 青木 大輔. 子宮体がんの術後再発リスク評価と術後療法. 臨床婦人科産科, 2013;67:474-484. (査読無)

(2) Nogami Y, Banno K, Kisu I, Yanokura M, Umene K, Masuda K, Kobayashi Y, Yamagami W, Nomura H, Tominaga E, Susumu N, Aoki D. Current status of molecular-targeted drugs for endometrial cancer (Review). Mol Clin Oncol, 2013;1:799-804. (査読無) doi:10.3892/mco.2013.140

(3) Banno k, Kisu I, Yanokura M, Tsuji K, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Yamagami W, Nomura H, Tominaga E, Susumu N, Aoki D. Biomarkers in endometrial cancer: Possible clinical applications (Review). Oncol Lett, 2012;3:1175-1180. (査読無) doi:10.3892/ol.2012.654

(4) 津田 浩史, 井口 蓉子, 片岡 史夫, 野村 弘行, 田中 英雄, 千代田 達幸, 平沢 晃, 進 伸幸, 青木 大輔. 発現解析による子宮体癌の再発予測モデルの開発, 日本分子腫瘍マーカー研究会誌, 2012;27:45-46. (査読無)

(5) Tanaka H, Tsuda H, Nishimura S, Nomura H, Kataoka F, Chiyoda T, Tanaka K, Iguchi Y, Susumu N, Aoki D. Role of Circulating Free Alu DNA in Endometrial Cancer. Int J Gynecol Cancer, 2012;22:82-86. (査読有) doi:10.1097/IGC.0b013e3182328c94

[学会発表](計 13 件)

(1) 野村 弘行, 片岡 史夫, 岩佐 尚美, 中平 直希, 橋本 志歩, 有馬 宏和, 千代田 達幸, 山上 亘, 冨永 英一郎, 進 伸幸, 吉村 泰典, 青木 大輔. 上皮性卵巣癌に対する TC 療法の薬物反応を規定する一塩基多型の抽出. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2014 年 4 月 19 日, 東京都千代田区.

(2) Nomura H, Kataoka F, Chiyoda T, Tanaka H, Hashimoto S, Arima H, Yamagami W, Tominaga E, Susumu N, Aoki D. Association between drug response and gene polymorphisms in first-line chemotherapy for ovarian cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 5 日, 神奈川県横浜市.

(3) 野村 弘行. 子宮体癌 up date. 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2013 年 8 月 30 日, 宮城県仙台市.

(4) 野村 弘行, 津田 浩史, 片岡 史夫, 千代田 達幸, 井口 蓉子, 橋本 志歩, 山上 亘, 冨永 英一郎, 進 伸幸, 青木 大輔, 吉村 泰典. 上皮性卵巣癌初回化学療法における治療効果予測因子としての gene

polymorphisms の解析 .第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2013 年 5 月 10 日, 北海道札幌市 .

(5) 滝川 彩, 山上 亘, 進 伸幸, 桑波田美智子, 野村 弘行, 片岡 史夫, 富永 英一郎, 阪埜 浩司, 津田 浩史, 青木 大輔, 吉村 泰典 . 当院における子宮体癌 b 期症例の臨床病理学的検討 . 第 124 回関東連合産科婦人科学会学術集会, 2012 年 10 月 28 日, 山梨県甲府市 .

(6) Chiyoda T, Tsuda H, Ito Y, Tanaka H, Takano M, Nishimura S, Kataoka F, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS), 2012 年 10 月 13 日, Vancouver, Canada.

(7) Tsuda H, Ito Y, Kataoka F, Tanaka H, Nomura H, Chiyoda T, Iguchi Y, Hirasawa A, Tominaga E, Yamagami W, Susumu N, Aoki D. Classification of ovarian cancer based on the stromal gene expression related with recurrence of endometrial cancer. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 21 日, 北海道札幌市 .

(8) 野村 弘行, 津田 浩史, 片岡 史夫, 千代田 達幸, 井口 蓉子, 山上 亘, 富永 英一郎, 進 伸幸, 青木 大輔, 吉村 泰典 . 子宮体癌および上皮性卵巣癌症例における血漿中遊離 DNA 量に関する検討 . 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2012 年 4 月 13 日, 兵庫県神戸市 .

(9) 野村 弘行, 津田 浩史, 片岡 史夫, 田中 京子, 千代田 達幸, 山上 亘, 平沢 晃, 富永 英一郎, 進 伸幸, 青木 大輔 . 上皮性卵巣癌における初回化学療法 of prognostic marker としての血液毒性 . 第 49 回日本癌治療学会学術集会, 2012 年 10 月 28 日, 愛知県名古屋市 .

(10) Tsuda H, Ito Y, Tanaka H, Takano M, Nishimura S, Kataoka F, Nomura H, Chiyoda T, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. A gene expression profile as a predictor of recurrence in low and intermediate-risk endometrial cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日, 愛知県名古屋市 .

(11) Tanaka H, Tsuda H, Nomura H, Kataoka F, Hirasawa A, Chiyoda T, Susumu N, Aoki D. The significance of measurement of cell free DNA in the endometrial cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3 日, 愛知県名古屋市 .

(12) 津田 浩史, 井口 蓉子, 片岡 史夫, 野村 弘行, 田中 英雄, 千代田 達幸, 平沢 晃, 進 伸幸, 青木 大輔 . 発現解析による子宮体癌の再発予測モデルの開発 . 第 31 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2011 年 10 月 2 日, 愛知県名古屋市 .

(13) 千代田 達幸, 津田 浩史, 野村 弘行, 片岡 史夫, 平沢 晃, 進 伸幸, 青木 大輔, 吉村 泰典 . 子宮体部癌肉腫の遺伝子発

現パターンに基づいた治療戦略の考察 . 第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2011 年 8 月 30 日, 大阪府大阪市 .

〔図書〕(計 1 件)

(1) Susumu N, Nomura H, Yamagami W, Hirasawa A, Banno K, Tsuda H, Sagae S, Aoki D. In Tech (Croatia), CANCER OF THE UTERINE ENDOMETRIUM - ADVANCES AND CONTROVERSIES, 2012, 167-182.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obgy.med.keio.ac.jp/04research/06gy2.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

野村 弘行 (NOMURA HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 50327590