

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861066

研究課題名(和文)放射線治療反応性と関連する遺伝子変異プロファイルの同定

研究課題名(英文)Identification of gene mutation profiles related to responses to radiation therapy

## 研究代表者

尾池 貴洋(Oike, Takahiro)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10643471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒトがんにおける放射線治療反応性と関連する遺伝子変異プロファイルの同定を目的とした。放射線治療を受けた子宮頸癌患者の治療前腫瘍生検・ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルからDNAを抽出し、高速シーケンサを用いたターゲットキャプチャシーケンシング法により50種類の既知がん関連遺伝子変異を解析した。同解析結果と臨床経過とを比較検討した結果、FGFR変異、SMAD4変異など放射線治療抵抗性との関連を示唆する候補遺伝子変異が抽出された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to identify gene mutation profiles in human cancer that correlate with sensitivity to radiation therapy. From a prospective and retrospective cohort of patients with uterine cervical cancer treated by radiation therapy, we obtained tumor biopsy samples before initiation of radiation therapy. We extracted DNA from the formalin-fixed and paraffin-embedded tumor biopsy samples. Using a next-generation sequencer, we performed target-capture sequencing of the extracted DNA and analyzed mutational status in 50 known cancer-related genes. Consequently, we identified several genes including FGFR family genes and SMAD4 whose mutational status can affect sensitivity to radiation therapy.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：遺伝子変異 放射線感受性

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代高速シーケンサを用いた網羅的ゲノム解析手法の急速な発展・普及に伴い、がんにおける新規の遺伝子変異の発見が相次いでいる。その結果、これまで組織学的に同一のカテゴリーに分類されていたがんが、特定の遺伝子変異またはその組み合わせによって細分類されつつある<sup>1,2</sup>。化学療法に関しては、がんの遺伝子変異に基づいた治療の個別化が進み、例えば *EGFR* 変異や *ALK* 遺伝子融合などチロシンキナーゼ遺伝子群の活性化変異陽性のがんはそれぞれの変異遺伝子産物を標的とした Gefitinib、Crizotinib による分子標的治療に高い治療効果を示すことが明らかとなった<sup>3</sup>。申請者らは高速シーケンサを用いて肺癌手術検体のゲノム網羅的な遺伝子異常の検索をおこない、肺腺癌の約 2% に存在する新規融合遺伝子 *KIF5B-RET* を同定し、同融合遺伝子をもつがん細胞は RET キナーゼ阻害薬に高感受性であることを示した<sup>4</sup>。また、昨今の大規模がんゲノム解析によりヒストンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含めたクロマチンリモデリング遺伝子群の失活変異が、様々ながん種において高頻度（数 10% 程度）に生じていることが明らかになってきている<sup>5</sup>。化学療法の臨床現場では、以上のような治療反応性に関連する遺伝子変異の解明に伴い、腫瘍検体から DNA を抽出し遺伝子変異を解析するクリニカル・シーケンスが一部のがん種において日常臨床レベルで普及している。

放射線治療の臨床現場では、同程度の進行期および宿主状態、かつ同じ組織型のがんであっても照射への反応性が異なることが経験される。放射線治療においても、今後は治療の個別化を進めることが重要と考えられ、照射への反応性に寄与する遺伝子変異の同定は、放射線治療の個別化に極めて有用な基盤情報になると考えられる。これまでに申請者は、癌細胞のヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性が放射線感受性を左右することを見出した<sup>6</sup>。しかし現状では、チロシンキナーゼ遺伝子の活性化変異やクロマチンリモデリング遺伝子群の失活変異を含めたがんにおける遺伝子変異と放射線治療への反応性との関連については明らかにされていない。さらに、放射線治療の臨床現場においては、クリニカル・シーケンスのパイプラインは確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、子宮頸癌放射線治療症例の腫瘍生検試料について、高速シーケンサを用いたターゲットキャプチャシーケンサ法による遺伝子異常の解析をおこない、遺伝子異常プロファイルと放射線治療反応性とを関連解析することで、放射線治療反応性を規定する遺伝子変異を同定することである。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体収集

本研究施設で放射線治療される子宮頸癌患者に対し、放射線治療直前時点で腫瘍組織の生検をおこない、ホルマリン固定・パラフィン包埋する。病理学的にがん細胞の含有が認められた試料から DNA を抽出する。

(2) 臨床情報整理

本研究で解析する症例群の背景因子と放射線治療成績を整理しデータベース化する。

(3) 遺伝子異常の検出

ホルマリン固定パラフィン包埋試料から抽出した DNA を用いたシーケンサ法を確立する。ターゲットキャプチャシーケンサ法を用い、チロシンキナーゼ遺伝子およびクロマチンリモデリング遺伝子群を含む、各種がんにおける変異好発遺伝子群や遺伝子融合を検出する(表 1)。具体的には、すでに稼働しているライフテクノロジーズ社のシステムを用い、解析遺伝子群に対応するゲノム DNA 領域を濃縮し、Ion PGM 高速シーケンサで平均 depth 500 の基準でシーケンスリードを取得する。

<i>ABL1</i>	<i>EZH2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PTEN</i>
<i>AKT1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH2</i>	<i>PTPN11</i>
<i>ALK</i>	<i>FGFR1</i>	<i>KDR</i>	<i>RB1</i>
<i>APC</i>	<i>FGFR2</i>	<i>KIT</i>	<i>RET</i>
<i>ATM</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KRAS</i>	<i>SMAD4</i>
<i>BRF</i>	<i>FLT3</i>	<i>MET</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>CDH1</i>	<i>GNA11</i>	<i>MLH1</i>	<i>SMO</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>GNAS</i>	<i>MPL</i>	<i>SRC</i>
<i>CSF1R</i>	<i>GNAO</i>	<i>NOCH1</i>	<i>STK11</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>HNF1A</i>	<i>NPM1</i>	<i>TP11</i>
<i>EGFR</i>	<i>HRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>VHL</i>
<i>ERBB2</i>	<i>IDH1</i>	<i>PDGFRA</i>	
<i>ERBB4</i>	<i>JAK2</i>	<i>PIK3CA</i>	

表 1. 本研究で解析する遺伝子

(4) 遺伝子異常と放射線治療反応性との関連解析

遺伝子異常情報と放射線治療反応性との関連を解析し、放射線治療反応性に寄与する遺伝子異常の候補を抽出する。子宮頸癌の放射線治療においては、初期治療に対する局所反応不良例や、初期治療から 1 年以内の早期に転移を認める症例が散見されることから、とくにそのような症例に特徴的な遺伝子異常プロファイルに着目する。

(5) 関連解析の validation

遺伝子異常と放射線治療反応性との一次関連解析に使用しなかった試料について、同様の手法で関連解析をおこない、抽出された候補

異常遺伝子の蓋然性を検討する。

#### (6) 候補異常遺伝子の機能解析

放射線治療反応性との関連が示唆された候補遺伝子異常に対し、培養細胞実験系およびヌードマウス実験系を用いた機能解析をおこなう。具体的には、遺伝子異常の活性型・不活性型に応じて、培養細胞実験系において各種ヒトがん細胞株に候補異常遺伝子産物を過剰発現または発現抑制させた後、X線照射し、コロニー形成法で放射線感受性への影響を評価する。培養細胞実験系において放射線感受性との関連が認められた遺伝子異常について、異常遺伝子産物を過剰発現または発現抑制させたヒトがん細胞株をヌードマウス皮下に接種し、形成した腫瘍にX線照射し、経時的に腫瘍径を測定することで放射線感受性への影響を評価する。

#### 4. 研究成果

臨床検体の遺伝子解析を含む本研究内容について、ゲノム指針・疫学指針による施設内IRB承認を得た(子宮頸癌の放射線治療反応性に関与する遺伝子の同定に関する研究: 前向き観察研究ならびに後向き観察研究)。IRB承認後、前向きコホートの症例集積を開始し、現時点で約60例を集積した(前向きコホートは合計5年間、症例集積を継続する)。これと並行して、本研究施設に保存されている既採取試料を整理し、後向きコホート188例を集積した。前向きおよび後向きコホート症例について、背景因子と放射線治療成績を整理しデータベース化した。

前向きおよび後向きコホートの症例について、ホルマリン固定・パラフィン包埋腫瘍生検試料からDNAを抽出した。これらの精製DNAをNanoDropで解析した結果、全症例の約80%でA260/A280値が1.8を超え、収量の平均値は5μgを超えた。以上から、臨床の腫瘍生検にて取得したホルマリン固定・パラフィン包埋試料から抽出したDNAが次世代シーケンサによる遺伝子解析に耐え得ることが明らかとなった。

後向きコホートの症例について、精製DNAを次世代シーケンサを用いてIon AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher)で解析した。同解析から得られた50種類の既知がん関連遺伝子の変異情報と放射線治療反応性とを比較検討した。結果、放射線治療に対する局所反応不良例において*FGFR*変異、*SMAD4*変異など、子宮頸癌において典型的<sup>7-10</sup>(表2)でない遺伝子異常が同定された。以上から、これらの遺伝子異常は放射線抵抗性に寄与する遺伝子の候補であると考えられた。

後向きコホートの一部および前向きコホートの精製DNAについては、現在Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2解析が進行中である。また、現時点で抽出された放射線反応性に寄与する候補遺伝子変異について培

養細胞実験系で放射線感受性試験を施行中である。

クリニカル・シーケンス研究と並行し、がんの遺伝子異常に関する既報告を分析し、放射線治療反応性との関連が示唆される候補遺伝子を抽出した。同知見を基に培養細胞実験系を用いた放射線感受性の解析研究をおこない、*TP53*および*EGFR*が放射線感受性に与える影響を明らかにした。これらの研究成果を5報の論文および5つの学術集会で発表した。

本研究の3年間を通して、放射線治療反応性に寄与する候補遺伝子異常が抽出されたのみならず、放射線治療の臨床現場における、ホルマリン固定・パラフィン包埋腫瘍生検検体を用いたクリニカル・シーケンスのパイプラインが確立されたことは、意義深いと考えられる。

変異遺伝子	変異頻度			
	Ref.7	Ref.8	Ref.9	Ref.10
PIK3CA	16	31	23	
EP300	12			
FBFW7	10			
HLA-B	8			
PTEN	6			
TP53	6			
ERBB2	5			
MAPK1	5			
EGFR		4		
ELF3	3			
KRAS	3	9		10
NFE2L2	3			
STK11	3	5		
CBFB	2			

表 2. 子宮頸癌にて同定されている主な遺伝子変異。(Refは引用文献を指す)

#### <引用文献>

1. Govindan R, Ding L, Griffith M et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. Cell 2012;150:1121-34.
2. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. Nature 2012;486:400-4.
3. Pal SK, Figlin RA, Reckamp K. Targeted therapies for non-small cell lung cancer: an evolving landscape. Mol Cancer Ther 2010;9:1931-44.
4. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat Med 2012;18:375-7.

5. Oike T, Ogiwara H, Nakano T et al. Histone acetyltransferases (HATs) involved in non-homologous end joining as a target for radiosensitization. In: Tejinder Kataria (ed). *Frontiers in radiation oncology*, 1st edn. Intech, 2013, 3-12. ISBN: 978-953-51-1163-4
6. Oike T, Ogiwara H, Torikai K et al. Garcinol, a histone acetyltransferase inhibitor, radiosensitizes cancer cells by inhibiting non-homologous end joining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 84: 815-821 (2012)
7. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 2506: 371-5 (2014)
8. Wright AA, Howitt BE, Myers AP et al. Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer* 119: 3776-83 (2013)
9. McIntyre JB, Wu JS, Craighead PS et al. PIK3CA mutational status and overall survival in patients with cervical cancer treated with radical chemoradiotherapy. *Gynecol Oncol* 128: 409-14 (2013)
10. Wegman P, Ahlin C, Sorbe B. Genetic alterations in the K-Ras gene influence the prognosis in patients with cervical cancer treated by radiotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 21: 86-91 (2011)

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

Amornwichee N, Oike T, Shibata A, Nirodi CS, Ogiwara H, Makino H, Kimura Y, Hirota Y, Isono M, Yoshida Y, Ohno T, Kohno T, Nakano T, The EGFR mutation status affects the relative biological effectiveness of carbon-ion beams in non-small cell lung carcinoma cells, *Scientific Reports*, 査読有, 5, 2015, 11305  
DOI:10.1038/srep11305.

Oike T, Ohno T, Shirai K, Inoue T, Nakano T, Polymyositis and fatal interstitial pneumonia following pelvic irradiation that led to unexpectedly severe adverse effects: a case report, *Clinical Case Reports*, 査読有, 8, 2015, 710-713  
DOI:10.1002/ccr3.322.

Amornwichee N, Oike T, Shibata A, Ogiwara H, Tsuchiya N, Yamauchi M, Saitoh Y, Sekine R, Isono M, Yoshida Y, Ohno T, Kohno T, Nakano T, Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe, *Plos One*, 査読有, 9, 2014, e115121  
DOI:10.1371/journal.pone.0115121.

Oike T, Ogiwara H, Amornwichee N, Nakano T, Kohno T, Chromatin-regulating proteins as

targets for cancer therapy, *Journal of Radiation Research*, 査読有, 55, 2014, 613-628  
DOI:10.1093/jrr/rrt227.

Oike T, Ogiwara H, Nakano T, Yokota J, Kohno T, Inactivating mutations in SWI/SNF chromatin remodeling genes in human cancer, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 査読有, 43, 2013, 849-855  
DOI:10.1093/jjco/hyt101.

#### 〔学会発表〕(計5件)

Kobayashi D, Oike T, Shibata A, Niimi A, Amornwichee N, Yoshimoto Y, Sato H, Isono M, Yoshida Y, Kohno T, Ohno T, Nakano T, Carbon-ion beams efficiently kill cancer cells showing resistance to X-rays and cisplatin by inducing mitotic catastrophe, 日本放射線腫瘍学会第28回学術大会, 2015年11月19日~2015年11月21日, ペイシア文化ホール(群馬県前橋市)

尾池 貴洋, 荻原 秀明, 柴田 淳史, 水上 達治, 河野 隆志, 中野 隆史, がんの遺伝的多様性に基づく分子標的増感を目指したトランスレーショナル・リサーチ, 第17回癌治療増感研究シンポジウム, 2015年2月6日~2015年2月7日, 奈良県民文化会館(奈良県奈良市)

尾池 貴洋, ナパパ アモウイチェト, 柴田 淳史, 荻原 秀明, 磯野 真由, 吉田 由香里, 大野 達也, 河野 隆志, 中野 隆史, Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe, 日本放射線影響学会第57回大会, 2014年10月1日~2014年10月3日, かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

Amornwichee N, Oike T, Komachi M, Isono M, Ogiwara H, Kohno T, Nakano T, Evaluation of DNA damage response after carbon-ion beam irradiation in p53-mutant cancer cells, ASTRO's 56<sup>th</sup> Annual Meeting, 2014年9月14日~2014年9月17日, Moscone Center(アメリカ合衆国・カリフォルニア州)

ナパパ アモウイチェト, 尾池 貴洋, 柴田 淳史, 荻原 秀明, 木村 由夏, 磯野 真由, 吉田 由加里, 大野 達也, 河野 隆志, 中野 隆史, Carbon-ion beam irradiation kills X-ray-resistant p53-null cancer cells by inducing mitotic catastrophe, 第43回放射線による制癌シンポジウム・第52回生物部会学術大会, 2014年7月11日~2014年7月12日, メルパルク京都(京都府京都市)

#### 6. 研究組織 (1)研究代表者

尾池 貴洋 (OIKE, Takahiro)  
群馬大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号： 10643471