

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293298

研究課題名(和文)食道癌ゲノムおよびエピジェネティクス制御解析による分子治療開発

研究課題名(英文) The attempt of new molecular therapy for esophageal cancer using the analysis of regulation concerning genome and epigenome

研究代表者

松原 久裕 (Matsubara, Hisahiro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20282486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌切除標本および正常食道粘膜から抽出したDNAそれぞれの全ゲノム配列を決定した。食道扁平上皮癌におけるエクソソームシーケンスにより、今回の解析においてもTP53の変異が最多であり80%を超える極めて高い頻度であった。次いでZNF750に変異が多いことを確認した。

アレル特異的発現についてそれぞれの変異位置においてDNAとRNAの特異アレルの検出頻度を比較すると、多くの症例で変異をもつアレルが優位に発現していることを解明し、食道癌細胞ではアレル特異的な遺伝子発現が存在し、さらに癌の発生、維持に有利な遺伝子変異をもつアレルを発現している細胞が選択されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Analysis of allele specific expression in esophageal squamous cell carcinoma with combination of exome sequencing and mRNA Sequencing. Exome sequencing analysis of 25 ESCC cases identified TP53 and ZNF750 as significantly mutated genes. Each gene was analyzed in detail with combination of DNA sequencing data and RNA sequencing. The expression level of TP53 with splicing site mutations, stopgain mutations, and indels were decreased significantly, which was seemed to cause dysfunction of p53 protein. Although expression of TP53 with nonsynchronous mutation was maintained, frequencies of nonsynchronous mutation allele in RNA were increased than those in DNA, which possibly cause dysfunction of its product. Comparing between normal and tumor tissues, expression of VNF750 were decreased, which ZNF750 expression of 2 cases with nonsynchronous mutations were maintained.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 ゲノム エピゲノム 分子治療

1. 研究開始当初の背景

食道癌は近年の集学的治療の進歩により予後は向上してきたが、未だ再発症例、手術不能症例の治療には難渋しており、他の癌で有効性が示されている分子標的薬剤の治療も進んでおらず、新たな治療開発が必要とされている。また、次世代シーケンサーの開発、進歩により遺伝子配列の解明はより容易になり、その速度も著明に改善されている。中国では1個の細胞からの全ゲノム配列を明らかにしたとの報告がなされた。米国での1000ドルゲノム計画の推進もあり、近い将来非常に高速で安価に全ゲノム塩基配列が明らかにできることは疑いが無い。その時代を見据え、より早期から食道癌ゲノム解析を行い、新たな分子治療開発を行うことは現在、医薬品の輸入超過が年間1兆円を超える日本においては緊急性を持って推進する必要欠くべからざる研究である。

これまで食道癌での全ゲノム塩基配列の解析は未だ報告されておらず、その解析も緊急性を要する。さらにリンパ節転移巣での解析を加え、転移機序解明を進める。バイオマーカーの研究は個別化医療という観点から現在、非常に注目されている研究分野になっており、この点からも本研究は重要である。バイオマーカーは新たな分子標的薬剤の開発ならびにその効果予測マーカーとしても利用可能であり、新たな効率的な薬剤開発には必須であると考えられている。有効な効果予測マーカーの出現が個別化医療に有効なことは言うまでも無く、他方医療経済に与えるインパクトも極めて大きい。予後予測マーカーに関しては重要な治療標的となることが容易に考えられる。

現在まで高信化学株式会社とともに日本科学技術振興機構の委託事業により食道癌における『抗癌剤治療効果遺伝子診断キット』の開発について私が責任医師となり食道癌治療を熱心に行っている国内11施設とともに2009年より臨床試験を実施している。食道癌生検標本からの遺伝子マイクロアレイ解析により抗癌剤感受性の評価を行い、治療により変化のある遺伝子群の解析は終了している。今後、製品化に向け開発実施計画を策定、特許出願を準備している。

そのため前臨床試験において感受性に関係する遺伝子群と全ゲノムシーケンスにより標的と考えられる部分を中心にエクソーム解析を手術標本、郭清リンパ節、内視鏡生検検体を用いて行うことにより、効率的に癌転移・浸潤能、抗癌剤、重粒子線を含めた放射線感受性などの解析を進める。また、これまでヒストンのアセチル化制御、マイクロRNAなどエピジェネティクス制御についても同時に関連性を明らかにすることにより、より詳細で正確な分子治療開発が遂行可能である。さらにこれらにより明らかにした遺伝子の導入、細胞内での遺伝子の発現、細胞内での分子移動の制御、遺伝子導入細胞によ

る生体の応答を利用した難治性食道癌に対する新たな分子治療も目指す。

2. 研究の目的

予後不良の消化器癌である食道癌に関し、手術標本、郭清リンパ節、内視鏡生検検体から次世代シーケンサーを利用した全ゲノムシーケンスおよびエクソームシーケンスを行い、食道癌における原発巣およびリンパ節転移における遺伝子配列とその変異を明らかにする。これまで多施設での食道癌抗癌剤治療効果遺伝子診断キットの開発研究によりDNAマイクロアレイ解析を行っており、これら遺伝子群を中心に解析を進める。同時にヒストンのアセチル化、miRNAなどエピジェネティクス制御についても解明することにより、癌転移機構の解明および抗がん剤、放射線治療感受性について解明し、個々の状態にあった適切な治療を行う個別化医療の一助となる新たな分子、その制御について明らかにすることにより新たな分子治療を提案する。

食道癌切除標本ならびに転移リンパ節から癌特異的ゲノム変異、発現量の異なる遺伝子群および遺伝子制御に関わる領域のエピジェネティックな差異を明らかにする。原発巣、転移巣での遺伝子変異の変化、その頻度の有無、部位について解明を行い、食道癌の浸潤、転移に関する遺伝子群を膨大な網羅的解析データのバイオフィンフォマティクス解析の手法を用いて明らかにする。正常食道粘膜との対比により発がんに関する遺伝子群の解析も行う。本研究課題は、食道癌症例を対象とし、癌特異的なゲノム変異、発現遺伝子群およびエピジェネティックな変異を網羅的に検索し、これら性質のことなるデータを包括的に解析する。ゲノム変異ではこれまでSNPアレイでは検出できなかった変異を検出すること、検出された変異から疾患の原因となる変異の同定が可能であり、トランスクリプトーム解析では新規転写産物や融合遺伝子の検出も可能となる。これまで当科で明らかにしてきた食道癌の浸潤、転移に関連するPrdx-1、Fra-1などの遺伝子、『抗癌剤治療効果遺伝子診断キット』の開発研究において25000遺伝子群が搭載されているマイクロアレイ解析により同定された抗癌剤により変化を受ける遺伝子およびp53癌抑制遺伝子などこれまで報告されている癌に関連するアポトーシス、細胞周期、増殖などの制御に重要な遺伝子群を中心に、次世代シーケンサーを用いた複数のアプローチの組み合わせから食道癌発症機序の解明、ならびにこれら一連の原因遺伝子同定から情報解析技術を駆使したプロトコルの確立することを目指す。得られる知見は原因遺伝子の同定のみならず、その機能に關与する分子の網羅的な相互作用とそれらが形成するネットワークをも視野に入れた食道癌原因分子からの発症へと至る機序を明らかにすることが

可能である。全エクソンの解析を進める。食道癌切除標本ならびに転移リンパ節、内視鏡生検検体での解析を行い、食道癌の浸潤、転移の関連する遺伝子を明らかにする。また、食道癌については術前化学療法の有用性が報告され標準的な治療となってきた。当科では従来の CDDP, 5-FU の標準化学療法に加え、ドセタキセルを加えた3剤併用療法、放射線を加えた化学放射線治療、重粒子線照射を併用した化学放射線治療の臨床研究を推進しておりこれらの術前治療による抗癌剤、重粒子線、通常の放射線に対する感受性について解明し、あらたな効果予測可能なバイオマーカーについて明らかにする

3. 研究の方法

食道癌切除標本ならびに転移リンパ節から全ゲノム配列から変異探索と染色体構造を明らかにする。これに加えて、原発巣、転移巣を対象に全エクソンおよび既知癌遺伝子のターゲットリシーケンス、トランスクリプトーム解析ならびにエピジェネティクス制御解析を統合的・包括的に解析することで、食道癌発症、転移・浸潤機序の解明、抗癌剤などの感受性を規定する遺伝子群を検索・同定する。得られた知見から食道癌関連遺伝子とその制御機構解明を図り、新たな分子治療を開発する。

本研究において主な解析機器となる次世代シーケンサーはHiSeq2000 (Illumina)にて行う。本機器は国立遺伝学研究所に6台導入されており、専任のオペレーターによって常時稼働している。

(1) 食道癌切除標本の全ゲノムシーケンス

食道癌切除標本および同一標本における正常食道粘膜から抽出したDNAそれぞれの全ゲノム配列を決定する。

(2) 食道癌切除標本のエクソームシーケンス

食道癌切除標本、転移リンパ節および正常食道粘膜から抽出したDNAよりエクソン配列のDNA断片のみを濃縮、塩基配列を決定する。エクソンのDNA断片濃縮はSureSelect Human All Exon Kit (Agilent)を用いる。

(3) P53 癌抑制遺伝子など癌関連遺伝子群のアンプリコンシーケンス

p53, p16, EGFR, Her2, K-Ras, Bcl-2, Bax等癌においてこれまで報告された重要な遺伝子群ならびに当科で食道の浸潤、転移に関与することを明らかにしてきた Prdx-1, Fra-1 等の癌関連遺伝子および全ゲノムシーケンスおよびエクソームシーケンスから得られた新規癌関連遺伝子をパネル化し、多検体における大規模なスクリーニングをおこなう。パネル化には HaloPlex ターゲットエンリッチメントシステム(Agilent)を用い、最大 5Mb(200,000 以上のアンプリコン)までのゲノム領域をシングルチューブで増幅すると共に、最大 96 検体を同時に解析する。

(4) 食道癌関連変異の検出

癌転移、浸潤、抗癌剤、放射線、重粒子線の感受性と関連する変異を検出するため、研究計画 1)~3)で得られた食道癌切除標本または転移リンパ節と正常食道粘膜における塩基配列の比較から、点変異、コピー数変化および LOH などの体細胞変異を検出する。すなわち、BWA ならびに Samtools によりシーケンスリードをリファレンス配列 hg19 にアライメントし、変異を検出した後、ABSOLUTE による腫瘍組織中の正常細胞混入率の算出、腫瘍組織の純度を加味した VarScan による癌特異的な変異を抽出する

4. 研究成果

平成 25 年 1 月から平成 26 年 3 月までに千葉大学附属病院を受診した扁平上皮癌患者 21 名について腫瘍の生検サンプルを、4 名について手術標本より腫瘍部および正常食道組織をそれぞれ採取し、その腫瘍と食道正常組織それぞれから DNA と RNA を抽出した。すべての症例において抹消血液も採取し、コントロールとして用いる DNA を抽出した。

DNA については全エクソン領域および調節領域を含む DNA ライブラリーを作成し、RNA については poly A tail を有する mRNA を選択し cDNA の合成を行った。DNA および RNA ライブラリーについて次世代シーケンサー Illumina HiSeq2500 によるシーケンスを行った。

DNA の解析では 25 検体において 3 千以上の点突然変異および欠失・挿入変異が認められ、うち約 7 割以上の変異はアミノ酸置換あるいは終止・開始コドンへの置換を伴う変異であった。現在まで食道扁平上皮癌では TP53 遺伝子をはじめとする遺伝子変異に関する報告があるが、今回の解析においても TP53 変異が 8 割以上と最多であり、上皮の分化に係る遺伝子が約 2 割と次いで多く認められた。

TP53 変異と RNA の発現を比較すると、スプライシング領域や終止コドンへの変異では TP53 タンパクに発現低下が認められ、アミノ酸置換を伴う変異においては発現が維持されていることがわかった。アミノ酸置換を伴う変異の 6 割以上の症例において DNA における変異アレルの割合に対して RNA における変異アレルの割合が有意に増加していることがわかった。同様の傾向が ZNF750 においても認められ、RNA での変異アレル頻度が有意に増加していることが観察された。

TP53 について、それぞれの変異位置において DNA と RNA の変異アレルの検出頻度を比較すると、多くの症例で変異をもつアレルが優位に発現していることがわかった。また、同様の解析を検出された全体細胞変異に対して行くと、大部分の遺伝子において変異アレルは RNA として発現していない一方で、TP53 を始めとする細胞周期やアポトーシスといった癌抑制に関連する遺伝子においては変

異アレルが優位に発現しているものがあることがわかった。

アレル特異的発現について、Loss of Heterozygosity の影響を排除するために Copy number variation の解析を追加し、食道扁平上皮癌においてはそれぞれの変異位置において DNA と RNA の特異アレルの検出頻度を比較すると、多くの症例で変異をもつアレルが優位に発現していることを解明し、食道癌細胞ではアレル特異的な遺伝子発現が存在し、さらに癌の発生、維持に有利な遺伝子変異をもつアレルを発現している細胞が選択されている可能性が示唆された。

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 4 件)

1・Toyozumi T, Hoshino I, Takahashi M, Usui A, Akutsu Y, Hanari N, Murakami K, Kano M, Akanuma N, Suitoh H, Matsumoto Y, Sekino N, Komatsu A, Matsubara H. Fra-1 Regulates the Expression of HMGA1, Which is Associated with a Poor Prognosis in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Oncol. Nov 23 [Epubahead of print] 2016 Epub (査読あり)

2・Matsumoto Y, Kano M, Akutsu Y, Hanari N, Hoshino I, Murakami K, Usui A, Suito H, Takahashi M, Otsuka R, Xin H, Komatsu A, Iida K, Matsubara H. Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep.36, 2016;2535-2543 (査読あり)

3・Tochigi T, Shuto K, Kono T, Ohira G, Tohma T, Gunji H, Hayano K, Narushima K, Fujishiro T, Hanaoka T, Akutsu Y, Okazumi S, Matsubara H. Heterogeneity of Glucose Metabolism in Esophageal Cancer Measured by Fractal Analysis of Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Image: Correlation Between Metabolic Heterogeneity and Survival. Dig Surg. Dec 9. Epubahead of print 2016 Epub (査読あり)

4・Isozaki T, Fujita M, Yamada S, Imadome K, Shoji Y, Yasuda T, Nakayama F, Imai T, Matsubara H. Effects of carbon ion irradiation and X-ray irradiation on the ubiquitylated protein accumulation. Int J Oncol 49:2016;144-52 (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

1・Hisahiro Matsubara: Topics of surgical treatment for esophago-gastric junctional cancer. The JAPAN-CHINA gastroenterological Surgery Forum 2014 (招待講演) 2014 年 9 月 27 日 Dalian, China

2・松原久裕: 食道癌に対する新規治療開発 第 25 回広島食道疾患懇話会(招待講演)

2015 年 02 月 17 日 広島市 広島大学医学部 広仁会館

3・松原久裕: 食道癌治療の新たな展開 第 1301 回千葉医学会例会(招待講演) 2014 年 11 月 30 日 千葉京成ホテルミラマール

4・松原久裕: Current topics of junctional cancer. The JAPAN-CHINA Gastroenterological Surgical Forum 2015 (招待講演) 2015 年 05 月 29 日~2015 年 05 月 30 日 中国、上海

5・松原久裕: 消化管の癌治療 -最近の topics と治療開発- 第 2 回愛知県臓器・組織移植セミナー(招待講演) 2015 年 04 月 07 日~2015 年 04 月 07 日 名古屋 藤田保健衛生大学病院

6・松原久裕: 食道癌集学的治療における個別化の現状と展望 第 53 回日本癌治療学会 学術集会臓器別シンポジウム 2 (招待講演) 2015 年 09 月 29 日~2015 年 09 月 29 日 京都 国立京都府会館

7・松原久裕: 食道癌に対する集学的治療の展開 第 3 回北海道周術期管理フォーラム(招待講演) 2015 年 10 月 23 日~2015 年 10 月 23 日 札幌 京王プラザホテル札幌

8・高橋理彦, 細道一善, 星野敢, 阿久津泰典, 村上健太郎, 井ノ上逸朗, 松原久裕 Analysis of allele specific expression in esophageal squamous cell carcinoma using exome sequencing and mRNA sequencing. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancers Association 2015 年 10 月 08 日~2015 年 10 月 08 日 名古屋 名古屋国際会議場

9・Masahiko Takahashi, Hirofumi Nakaoka, Yasunori Akutsu, Naoyuki Hanari, Kentaro Murakami, Masayuki Kano, Yasunori Matsumoto, Ryota Otsuka, Nobufumi Sekino, Masaya Yokoyama, Itsuro Inoue, Hisahiro Matsubara. 'Analysis of allele specific expression in esophageal squamous cell carcinoma with combination of exome sequencing and mRNA Sequencing. AACR Precision Medicine Series: Opportunities and Challenges of Exploiting Synthetic Lethality in Cancer 2017 年 01 月 04 日~2017 年 01 月 07 日 San Diego, California, USA

10・Masayuki Kano, Yasunori Matsumoto, Masahiko Takahashi, Naoki Akanuma, Kentaro Murakami, Yasunori Akutsu, Hisahiro Matsubara. A paradoxical observation for its upregulation and the prognostic significance about miR-7 in esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2016 (国際学会) 2016 年 04 月 16 日~2016 年 4 月 20 日 New Orleans, Louisiana, USA

11・Yasunori Matsumoto, Masayuki Kano, Yasunori Akutsu, Naoyuki Hanari, Isamu Hoshino, Kentaro Murakami, Akihiro Usui, Hiroshi Saito, Masahiko Takahashi, Ryota

Otsuka, Hisahiro Matsubara.
Usefulness of exosome quantification by
cholesteryl ester transfer protein
activity as a biomarker for human
esophageal squamous cell carcinoma(ESCC).
AACR Annual Meeting 2016(国際学会)2016年
04月16日~2016年4月20日
New Orleans,Louisiana,USA
12・Ryota Otsuka, Yasunori Akutsu, Naoyuki
Hanari, Kentaro Murakami, Masayuki Kano,
Masahiko Takahashi, Yasunori Matsumoto,
Nobufumi Sekino, Masaya Yokoyama,
Hisahiro Matsubara. The expression
analysis of ZNF750 as biomarker in human
esophageal squamous cell carcinoma.
40th World Congress of the International
College of Surgeons(国際学会)2016年10月
23日~2016年10月26日 Kyoto.Japan
国立京都国際会館
13・松原久裕 上部消化管癌治療に対する新
規治療法の開発 第292回東海外科学会(招
待講演)2016年10月16日~2016年10月
16日 名古屋 じゅうろくプラザ

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

www.academic-surgery.jp/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 久裕(MATSUBARA, Hisahiro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20282486

(2) 研究分担者

井ノ上 逸郎(INOUE, Itsuro)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授
研究者番号：00192500

村上 健太郎(MURAKAMI, Kentaro)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40436382

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()