

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462001

研究課題名(和文) 適切な個別化治療を目指した次世代シーケンサーによる食道がんゲノム解析

研究課題名(英文) Genome analysis of esophageal cancer by next generation sequencer aiming for appropriately-individualized treatment

研究代表者

鍋谷 圭宏 (NABEYA, Yoshihiro)

千葉県がんセンター(研究所)・食道・胃腸外科・部長

研究者番号：40322028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食道がん早期発見のためのバイオマーカー同定のため、コホートでの消化器がん発症例と健常者ならびに食道癌・非癌部組織で、がんで高頻度に変異が見られる領域に限定したエクソーム解析を行った。キャピラリーシーケンサーで癌部に確認した21の遺伝子変異のうち4カ所は非癌部にも確認した。さらに、蛋白質の構造や機能に影響を与え得る5遺伝子を確認し、Mutation Signatureの概念がマーカーとして有用である可能性を見出した。食道癌切除例の臨床データから、血清SCC抗原値が予後予測に有用であった。これらのバイオマーカー評価により、食道がんの早期発見と予後予測による治療の個別化・予後向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：To identify some useful biomarker for early diagnosis of esophageal cancer (EC), we have conducted exome analysis limited to the regions where mutations are found frequently in cancer, in the EC and the corresponding noncancerous tissues as well as in the cohort of gastroenterological cancer patients and healthy volunteers. Four of the 21 gene mutations confirmed in the EC with the next generation sequencer were also confirmed in the non-cancerous tissues as well. Furthermore, 5 genes that could affect the structure and function of the protein were confirmed. These findings suggest the concept of Mutation Signature may be useful as a biomarker of EC. Evaluating the clinical courses of EC surgical cases revealed that serum SCC-Ag monitoring may be useful as a prognostic indicator. Assessment of these potential biomarkers are expected to help the early diagnosis and individualized treatment of EC, to which surgical treatment is invasive, followed by improvement of the outcome.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道がん ゲノム 次世代シーケンサー 腫瘍マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

(1)いまだ難治のがんの一つである食道がんの主な治療は、内視鏡的切除、外科治療(リンパ節郭清を伴う食道切除再建術)、化学放射線治療、であり、臨床病理学的進行度や患者の状態により選択される。

(2)しかし、進行癌に適応されるはいずれも侵襲の高い治療であり、喫煙・飲酒歴のある高リスク患者に対して行われることが多い。

(3)特に の食道がん根治術は極めて侵襲の高い外科治療であり、術後合併症や在院死亡のリスクが高い手術の一つである。

(4)高度侵襲治療にも関わらず、予後不良の症例も多く、 で根治が期待できるような早期食道がんの発見、ならびに高度侵襲の外科治療が有益であるかどうか予後予測を行うことは、個別化医療を行う上で有用である。そのため、診断・患者個々に最適な治療法の選択や予後予測に有用なマーカーの同定が求められる。

(5)食道がん診療においては、がんの悪性度をより正確に判断し得るゲノム解析情報の有用性が期待される。既存のバイオマーカー探索では、主に単一の遺伝子変異や遺伝子産物を検討してきた。しかし近年、次世代シーケンサーによる網羅的な解析で、遺伝子変異のパターン自体をマスとしてバイオマーカーと考える Mutation Signature という概念が創出されている。

### 2. 研究の目的

(1)まず、次世代シーケンサーで限定されたゲノム領域をメガベースオーダーでシーケンシングする安価な包括的バイオマーカー変異解析により、食道がん Mutation Signature を同定し、このゲノム解析所見を既存の臨床病理学的所見と併せて評価することで、治療法選択や予後予測等の指標となるか否かを検討する。

(2)既知の食道がん腫瘍マーカーの予後予測における有用性を、過去の切除例の臨床経過から改めて検討する。

(3)これらのデータから、個々の食道がん患者に個別化された治療法の選択については予後向上に役立つような包括的な診断体系・予測マーカーの確立を試みる。

### 3. 研究の方法

(1)食道がん患者を早期発見できるバイオマーカーの同定を行うため、がんで高頻度に変異が見られる領域に限定したメガベースオーダーでのエクソーム解析をコホートスタディで追跡中の消化器がんを発症した 40 例と健常者コントロール 20 例で行った。さらに 5 例の食道がん及びその非癌部について同様の解析を行い、同定された 28 か所の遺伝子変異をキャピラリーシーケンサーで確認した。

さらに遺伝子変異や多型の解析を行うた

め、コホートでの消化器がん発症例を追加し、これまでの解析と合わせ、がん発症 83 症例と健常者 33 症例での解析を行った。

(2)現在の食道がんの多くを占めるステージ II・III 症例の標準治療は、術前化学療法後の食道切除再建術である。そこで、術前化学療法(neoadjuvant chemotherapy: NAC)無効例の推測と短・長期予後への影響をみる上で、既知の腫瘍マーカーである血清 SCC 抗原(以下、SCC と略す)値の推移に着目してその有用性を検討した。概要は、2009 年 1 月~2014 年 12 月に当院で cStageII/III の診断で NAC 後に切除を行った食道扁平上皮癌 65 例(男/女=53/12、年齢 48~77 歳中央値 70 歳、cStageII/III=30/35、FP/DCF =62/3)を対象とし、NAC 治療効果予測(ロジスティック解析)、予後予測(Cox 比例ハザード解析)、術後 6 か月以内に早期再発した予後不良例との関連、を検討し、SCC 値の surrogate marker としての有用性を検証した。術後観察期間は 12~77 か月(中央値 50 か月)であった。

### 4. 研究成果

(1)21 か所の遺伝子変異が確認され、4 か所のみが、非癌部にも同様の変異が確認された。未知の変異は 7 つ、うち一つがストップコドンを示すナンセンス変異として同定された。

さらに遺伝子変異や多型の解析を行った結果、アミノ酸置換を伴う体細胞および生殖細胞変異が認められ、蛋白質の構造や機能に影響を与えることが考えられる遺伝子として、5 遺伝子の変異が選択された。これらの遺伝子変異は、意義不明の変異(variant of unknown significance: VUS)として食道がんとの関連確認を進めている。

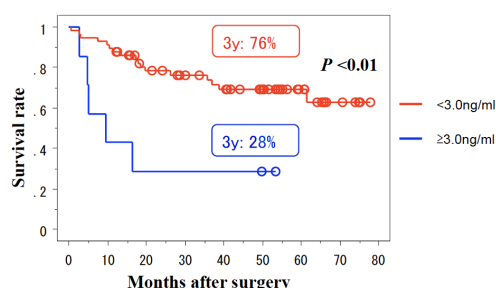
(2) RECIST での non-responder(SD/PD)には、初診時 SCC 値が基準値上限の倍である 3.0ng/ml 以上 ( $p=0.03$ )、NAC 後 SCC 値が基準値 1.5ng/ml 以上( $p<0.01$ )が有意に関連した。他の臨床病理学的因子(年齢、性別、体重減少の有無、好中球/リンパ球比(NLR)、腫瘍径、生検時組織型、PET-SUVmax、cStage)についても同様に検討すると、初診 cN2 以上(UICC 第 7 版)が有意に関連し、多変量解析では、NAC 後 SCC 値 1.5ng/ml 以上、cN2 以上が独立した関連因子となった。一方で、原発巣の組織学的効果には、SCC 値は関連しなかった。

初診時 SCC 値が 3.0ng/ml 以上(3 年生存率 28%vs76%、 $p<0.01$ 、図 1)、NAC 後 SCC 値が 1.5ng/ml 以上(3 年生存率 53%vs78%、 $p=0.02$ 、図 2)、術後 6 ヶ月以内の SCC 値が 1.5ng/ml 以上(3 年生存率 42%vs80%、 $p=0.02$ 、図 3)、の症例は有意に予後不良(単変量)であった。他の因子について同様に予後との関連を検討すると、75 歳以上、cStageIII、RECIST の non-responder (SD/PD)が有意に予後不良で、多変量解析を行うと、75 歳以上( $p<0.01$ )、cStageIII( $p<0.01$ )が独立した

予後不良因子となった。

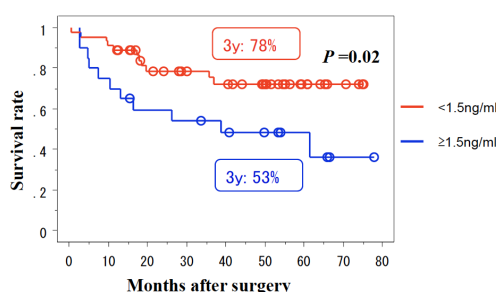
(図 1)

### OS in terms of Pre-treatment SCC



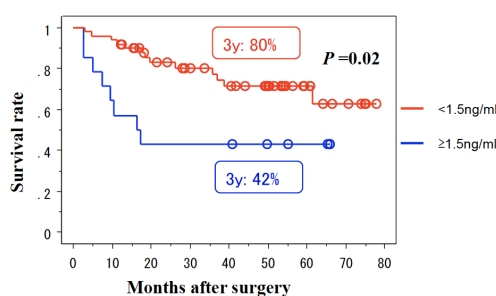
(図 2)

### OS in terms of SCC after NAC



(図 3)

### OS in terms of postoperative SCC



R1/2 または術後 6 か月以内の再発は 12 例だが、うち 10 例が NAC 後または術後 SCC 値が  $1.5\text{ng/ml}$  以上であり(10/25, 40%)、これは感度:83%/特異度:71%で手術後予後が不良であることの推測因子であった。

(3)以上から、食道がん(わが国で多い扁平上皮癌)患者に特異的なバイオマーカーとして、次世代シーケンサーによる網羅的な解析で得られた Mutation Signature の概念が有用である可能性が示唆された。この遺伝子変異パターンは、食道がんの早期診断に有用と思われるが、これからパターンごとの予後との関連を今後さらに検討することで予後因子

としての有用性も明らかにしたい。一方で、血清 SCC 抗原(SCC)値は、独立性は示せなかったが強力な予後予測因子であることが確認された。さらに症例を重ね、術前・NAC 後・術後の値を組み合わせることで、より鋭敏な予後指標となる可能性があり、検討していきたい。

(4)次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異パターンと簡単に測定可能な血清 SCC 抗原値のモニタリングを組み合わせることで、食道がん早期発見と予後予測がともに可能になり、治療の個別化と予後向上が期待される。

## 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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

中村洋子、丸 喜明、巽 康年、奥村和弘、横井左奈、大平美紀、鍋谷圭宏、深沢 賢、片山 稔、永瀬浩喜、三上春夫・前向きコホート研究によるがんの高リスク群でのアミノ酸変化を伴う多形の解析．第 75 回日本癌学会学術総会．2016. 10. 8 横浜

越川信子、秋元美穂、植田 健、飯笹俊彦、鍋谷圭宏、井内俊彦、永瀬浩喜、竹永啓三．mtDNA 変異が制御する転移の予測因子としての乳酸トランスポーター-MCT4 の核局在．第 75 回日本癌学会学術総会．2016. 10. 7 横浜

Nabeya Y, Kobayashi R, Imanishi S, Takiguchi N, Ikeda A, Soda H, Tonooka T, Arimitsu H, Chibana T, Ishige F, Nagata M. Importance of serum SCC-Ag level as a surrogate marker in esophageal cancer patients undergoing esophagectomy after neoadjuvant chemotherapy. 15<sup>th</sup> World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2016. 9. 21, Singapore.

小林亮介、鍋谷圭宏、今西俊介、滝口伸浩、池田 篤、貝沼 修、早田浩明、外岡亨、山本 宏、永田松夫．術前化学療法施行後の食道癌切除例における SCC 値は surrogate marker として有用．第 71 回日本消化器外科学会総会．2016. 7. 15 徳島

中村洋子、丸 喜明、巽 康年、横井左奈、大平美紀、中村友紀、高山喜美子、稲田潤子、田中尚武、山本尚人、鍋谷圭宏、滝口伸浩、植田 健、片山 稔、永瀬浩喜、三上春夫．半導体次世代シーケンサーによるリスク集団特異的ながん関連遺伝子多型解析．日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015. 10. 14 東京

小林亮介、鍋谷圭宏、齋藤洋茂、廣中秀一、三梨桂子、新井裕之、滝口伸浩、山本 宏、永田松夫． cStageII/III 食道癌の術前化学療法の現状と課題：無効例の推測と短・長期予後への影響． 第 69 回日本食道学会学術集会． 2015. 7. 2 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔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

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鍋谷 圭宏 (NABEYA Yoshihiro)  
千葉県がんセンター (研究所)・  
食道・胃腸外科・部長  
研究者番号：40322028

### (2) 研究分担者

永瀬 浩喜 (NAGASE Hiroki)  
千葉県がんセンター (研究所)・  
がん遺伝創薬研究室・研究所長  
研究者番号：90322073

### (3) 連携研究者

なし