

182. 大腸癌の網羅的遺伝子解析と治療効果予測

三吉 範克

大阪府立成人病センター 外科

Key words : 大腸癌, 遠隔転移, 遺伝子変異

緒言

近年増加の一途をたどる悪性腫瘍・癌・なかでも消化器癌は非常に罹患率の高い疾患である。特に日本においては、大腸癌の罹患率は死亡率とともに年々増加しており、男性では肺癌、胃癌に次いで第三位、女性では肺癌を抜いて第一位となった¹⁾。今後も増加するものと考えられており、2015年には第一位となることが予想されている。欧米諸国においても大腸癌は肺癌に次ぐ第二位の死因でもあることから、大腸癌の診断や治療に関わる研究は非常に重要なものと考えられる。

大腸癌において、予後を反映、すなわち癌死を規定する最も大きな要因は遠隔臓器への「転移」や化学放射線療法などに対する「治療抵抗性」である。この癌の特徴ともいえるべき「転移」や「治療抵抗性」には、癌そのものの分子メカニズムに基づく生物学的特性が関与していると考えられる。現行の癌の治療法については、外科切除に加えて抗癌剤や分子標的治療薬を使用する集学的治療が主であり、その薬剤の選択については、実臨床では Kras の遺伝子検索だけを行って、使用する薬剤を選択しているのが現状である。近年、固形癌における多様性（癌組織の多様性）というものが指摘され、この「多様性」が治療困難例や再発症例における問題点となっている可能性が提唱されはじめている。我々はこれまでに悪性腫瘍における遺伝子変異について、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行い報告している²⁾。本研究では、遠隔転移を伴う大腸癌組織について、単一の遺伝子の変異をみるだけにとどまることなく、網羅的遺伝子解析を次世代シーケンサーを用いて行い、治療効果の予測や予後マーカーについて検討を行った。

方法および結果

当院で手術を行った 200 例の手術標本のサンプルについて、この中で遠隔転移を伴う stage IV 大腸癌について症例を集積した。

まず原発巣と遠隔転移巣での遺伝子変異の相違を確認するために必要な組織量を確認するべく、QIAGEN All Prep (株式会社キアゲン、東京) を用いて DNA の抽出を行い、組織量と回収率について検討した。その結果、大腸原発巣と遠隔転移巣としては肝転移巣が安定して DNA の抽出が行えたことから、組織の対象を大腸癌と肝転移巣に絞った。しかし肝転移巣では中心部は壊死を起していることが多く、腫瘍体積に反して解析に足る十分な DNA 量を取ることが困難な症例も多かったため、解析に必要十分な DNA 量を抽出するために適切と考えられる肝転移巣の術前画像検査所見の特徴を捉え、原発巣と複数の肝転移巣のサンプルが抽出できる外科切除の対象となる症例を選別した。

同一大腸癌組織における遺伝子変異の多様性について評価するため、原発巣 3 か所と肝転移巣 3 か所について DNA を抽出し、quality check を行った。また正常大腸粘膜からも DNA を抽出して、これをコントロールとした。quality check によって次世代シーケンサーの解析にすすめることのできるサンプルを抽出し、原発巣と遠隔転移巣のそれぞれの組織検体の遺伝子変異の相違を解析するために、Ion AmpliSeq Exome kit (ライフテクノロジーズ、サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社、神奈川) を用いてライブラリーを作製し、次世代シーケンサーとして Ion Torrent Proton を用いて解析を行った。

stage IV の大腸癌の手術サンプル(正常組織 1 か所、原発巣 3 か所、遠隔転移巣 3 か所) 検体に対して、Ion Torrent Proton システムを用いて、genome wide で遺伝子解析を行った。データの解析は Ion Reporter (サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社) を用いた。

まず raw data については bam ファイルを作成し、Integrative Genomic Viewer (Broad Institute)を用いて遺伝子変異のマッピングを行った。十分なリードを保ち、臨床的に癌の生物学的特性を反映する遺伝子座について、その変異の有無と各サンプル間での相違について検討した (図1)。

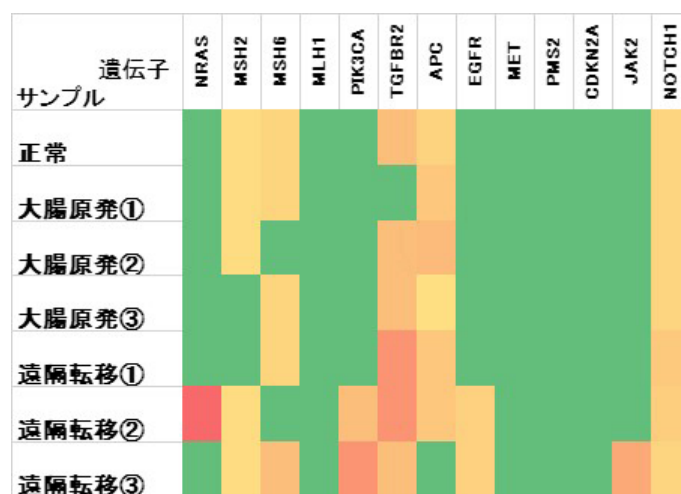


図1. Genome wide で遺伝子解析

正常、大腸原発巣、遠隔転移巣のそれぞれの遺伝子変異の集積を示すヒートマップ。その結果、同一患者の組織からさまざまな変異の多様性が認められた。具体的には、APC、NOTCH1、TP53、JAK3において、大腸原発巣内と肝転移巣内での変異を認めるエクソン領域の違いが明らかとなった。Kras 遺伝子変異については正常大腸粘膜においては認めなかったが、原発大腸癌3か所と遠隔転移巣3か所とも exon2 の変異 (G12D) を認めた。

同一患者の組織からさまざまな変異の多様性が認められた。具体的には、APC、NOTCH1、TP53、JAK3において、大腸原発巣内と肝転移巣内での変異を認めるエクソン領域の違いが明らかとなった。Kras 遺伝子変異については正常大腸粘膜においては認めなかったが、原発大腸癌3か所と遠隔転移巣3か所とも exon2 の変異 (G12D) を認めた。

考 察

従来のマイクロアレイ等の網羅的解析では検出することのできなかった多彩な遺伝子変異について解析することができた。癌遺伝子 Kras の変異に関しては遺伝子多型 (SNP) を含めると正常でも2か所の変異を認めていたが、exon2 領域の変異は認めていなかった。また、同変異部位については原発大腸癌組織と肝転移組織のすべてにおいて Kras の変異を認めていた。これらのことから、癌組織の中で主体的な役割を示す変異については、今後血液サンプルの中に遊離される癌細胞由来 DNA (cell-free DNA) の解析などの対象とすることで、悪性腫瘍の生物学的特性を示す有用なバイオマーカーとなりうることを示唆された。

我々はまた同様に大腸癌と大腸腺腫の患者についても検討を行っている。このなかで広範な腺腫の中に癌病巣を伴う病変について次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行ったところ、腺腫および腺癌に特徴的な遺伝子変異のパターンが明らかとなってきている。今後は本研究で得られた遺伝子変異解析によって明らかとなった特徴的かつ普遍的なターゲットについて、血液中の cell-free DNA の治療期間中における変化についても検討を行いながら、これに連動するようなエクソソームを含めた transcriptome 解析、マイクロ RNA 解析についても検討をすすめていく^{3, 4)}。特徴的な遺伝子発現についてはこれが新規バイオマーカーとなりうるのみならず、制御することで新規の癌治療につながることで、治療効果の予測因子となりうるが期待される。われわれはこれまでにいくつかの臨床病理学的因子を用いた予後予測式の構築を行っており、これに組み込むことで治療効果予測の精度が高められることが期待される (図2)。

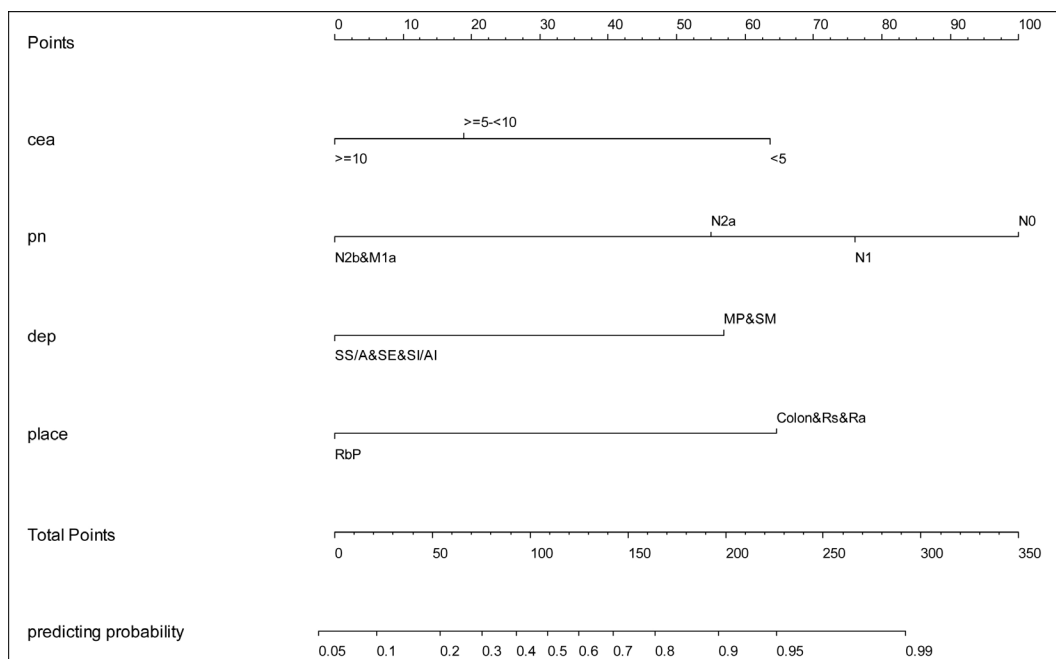


図2. 臨床病理学的因子を用いた大腸癌術後の予後予測式

当院での大腸癌 376 例を対象にした臨床病理学的因子を用いた根治切除後の再発予測式。prediction probability として 5 年以内の再発率を示している。cea、血清 CEA 値; pn、UICC 7th に基づいた N 因子; dep、腫瘍深達度; place、腫瘍の局在。

最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) がん情報サービス最新がん統計 2013. Available from URL:http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
- 2) Niederst MJ, Sequist LV, Poirier JT, Mermel CH, Lockerman EL, Garcia AR, Katayama R, Costa C, Ross KN, Moran T, Howe E, Fulton LE, Mulvey HE, Bernardo LA, Mohamoud F, Miyoshi N, VanderLaan PA, Costa DB, Jänne PA, Borger DR, Ramaswamy S, Shioda T, Iafrate AJ, Getz G, Rudin CM, Mino-Kenudson M, Engelman JA. RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun.* 2015 Mar 11;6:6377. doi: 10.1038/ncomms7377. PMID: 25758528.
- 3) Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013 Mar 28;368(13):1199-209. doi: 10.1056/NEJMoa1213261. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23484797.
- 4) Melo SA, Sugimoto HI, O'Connell JT2, Kato N2, Villanueva A3, Vidal A4, Qiu L5, Vitkin E5, Perelman LT5, Melo CA6, Lucci A7, Ivan C8, Calin GA9, Kalluri R10. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2014 Nov 10;26(5):707-21. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.005. Epub 2014 Oct 23. PMID: 25446899.