

83. 食道腺癌の分子機序の解明と治療標的の探索

渡邊 雅之

がん研究会 有明病院 消化器外科 食道外科

Key words : 食道胃接合部腺癌, 食道腺癌, 分子標的治療, *KRAS*, copy number variation

緒 言

食道胃接合部腺癌は、食道胃接合部の食道側 5 cm、胃側 5 cm以内に腫瘍中心を有する上皮性悪性腫瘍である。欧米では食道腺癌 (Esophageal adenocarcinoma) とも呼ばれ、欧米諸国においてここ 30 年で 6 倍に増加している¹⁾。しかしながら、その 5 年生存率は約 15%にとどまり非常に予後不良の疾患である。近年、我が国においても、①食生活の欧米化に伴う肥満による慢性的な腹圧の増加、②ピロリ菌感染率の低下に伴う胃酸過多、に伴う胃食道逆流症の増加を背景に、本疾患の増加が指摘されている²⁾。しかし、この食道胃接合部腺癌に対する有効な治療法は未だ開発途上であり、本疾患の治療標的分子の解明がまたれている。

食道胃接合部腺癌の発癌分子メカニズムについては、これまで *CDKN2A* 遺伝子や *TP53* 遺伝子のヘテロ接合性の喪失 (Loss of heterozygosity (LOH)) や遺伝子変異によって説明されてきた³⁾。さらに最近では、次世代シーケンサーの登場により、癌遺伝子の増幅 (amplification) が、食道胃接合部腺癌の発癌過程において極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった⁴⁾。この遺伝子増幅異常は、他の消化器癌のなかでも食道胃接合部腺癌に特徴的な遺伝子異常であることが報告された。しかしながら、すでに癌化した食道胃接合部腺癌細胞における癌遺伝子増幅の意義 (臨床病理学的特徴や予後との関連性) については未だ明らかになっておらず、本疾患の悪性度に与える影響についても明らかでない。

我々は、これまで新鮮凍結サンプルを用いた食道胃接合部腺癌 (食道腺癌を含む) における遺伝子コピー数異常の網羅的解析を行い、食道胃接合部腺癌に特異的な遺伝子増幅異常を同定してきた^{5,6)}。その中で、本疾患において癌遺伝子である *KRAS* の増幅異常が 21%にも及ぶことを初めて報告した⁶⁾。さらにこの *KRAS* 遺伝子増幅は RAS-MAPK 系遺伝子異常の中で最も頻度の高い変化であった。そこで我々は、本研究において、食道胃接合部腺癌における *KRAS* 遺伝子増幅異常の臨床病理学的特徴や予後に関わるかどうかを検討し、*KRAS* 遺伝子増幅が本疾患の治療標的となるかどうかを検討することとした。

方 法

1. 対象症例

2005 年から 2014 年の期間に、がん研有明病院消化器外科、熊本大学病院消化器外科、九州大学消化器・総合外科にて外科的切除を受けた食道胃接合部腺癌 (Siewert type I~III) を対象とした。いずれも術前化学療法や術前放射線化学療法がなされていない症例を選択し、パラフィン包埋切片から DNA 抽出し、以下の copy number assay が可能となった 147 症例を対象とした。

2. Copy number assay (遺伝子増幅検出)

KRAS 遺伝子増幅の評価は Real-time PCR 法にて、Taqman copy number assay (*KRAS*, Human, Cat. #4400291) を用いて検出した。Reference マーカーとして、TaqMan Copy Number Reference Assay (*RNaseP*, Human, Cat. #4403328)、および TaqMan Copy Number Reference Assay (*TERT*, Human, Cat. #4403316) を用い、*KRAS* copy number はその比率 (*KRAS/RNaseP*, もしくは *KRAS/TERT*) を用いて評価した。*KRAS/RNaseP* と *KRAS/TERT* の比較検討も行った。*KRAS* copy number は 3 回計測した平均値を採用し、カットオフ値は 2.7 とした。

3. 免疫組織化学染色

免疫染色には抗-KRAS モノクローナル抗体 (#415700, Life technology, 1 : 200) を用いて、臨床検体のパラフィン包埋切片の免疫染色を行った。免疫染色の評価は negative、weak、moderate、strong の4段階とし、30%以上 strong に染まった癌細胞を有するものを positive 群、それ以外を negative 群とした。

4. Fluorescent in situ hybridization (FISH)

FISH プローブは以下の BAC DNA を用いた。KRAS probe には、RP11-636P12、RP11-62I19、RP11-65C2 を、chromosome 12 centromere (CEN12) probe には、RP11-267D19、RP11-792O21、RP11-8P13 の部位を用いた。KRAS probe には Cy5 で、CEN12 probe には biotin で標識させた。切片は脱パラフィン後、0.1% ペプシン / 0.1N HCl で5分間処理を行った。PBS で中和処理後、洗浄し乾燥した。前処理した切片に上記プローブ溶液を滴下し、90℃のホットプレート上で切片とプローブを同時に10分間変成処理し、37℃で一晩 hybridize した。切片は37℃の50%ホルムアミド / 2×SSC および 1×SSC で stringency wash しシグナルを検出した。

5. Pyrosequencing 法による KRAS/BRAF 遺伝子変異の検出

RAS-RAF 系の遺伝子異常として重要な KRAS 及び BRAF の mutation の評価を、これまでの我々の報告と同様に Pyrosequencing 法を用いて行った⁷⁾。

6. 統計解析

全ての統計学的解析は JMP11(SAS) にて行った。P < 0.05 を有意差基準とした。多変量による生存解析では backward elimination = 0.2 に設定した。

結 果

1. Real-time PCR 法を用いた KRAS 遺伝子増幅検出法の確立

ランダムに抽出した45例を用い、RNasePをreferenceとしたKRAS copy number と、TERTをreferenceとしたKRAS copy number の比較を行った(図1)。カットオフ値2.7とすると、図1で示した4例(赤四角で囲んだ discordant cases)を除く41例(91.1%)で2つのKRAS遺伝子増幅の有無が一致した。TERTは悪性腫瘍においてコピー数異常が指摘されていることから⁸⁾、今回の検討においてはRNasePをreferenceと用いることとした。

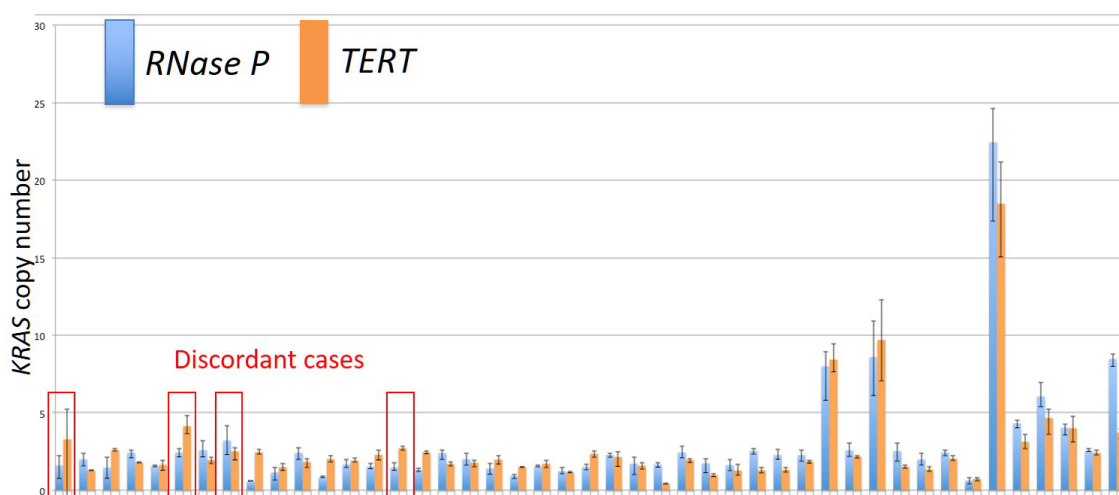


図1. RNasePをreferenceとしたKRAS copy number と、TERTをreferenceとした場合の比較 (N = 45)

赤四角で囲んだ discordant cases 4例を除く41例において、91.1%の高い一致率でRNasePとTERTを用いた2つのKRAS遺伝子増幅の有無(カットオフ = 2.7)が一致した。

次に、我々は、*KRAS* 遺伝子増幅が実際の *KRAS* タンパク発現に関与しているかどうかを検討した。*KRAS* 遺伝子増幅あり群 35 症例のうち、13 症例（38%）において免疫染色による *KRAS* タンパクの過剰発現を認め、*KRAS* 遺伝子増幅なし群の 16%と比較して有意な相関関係を認めた（ $P < 0.05$ ）。加えて、本法による *KRAS* 遺伝子増幅ありと判定された 5 症例を対象に FISH を追加したところ、4 例（80%）に明らかな *KRAS* 遺伝子増幅を認めた（図 2）。以上の結果より、我々の Real-time PCR 法による *KRAS* 遺伝子増幅検出方法は妥当であると考えられた。

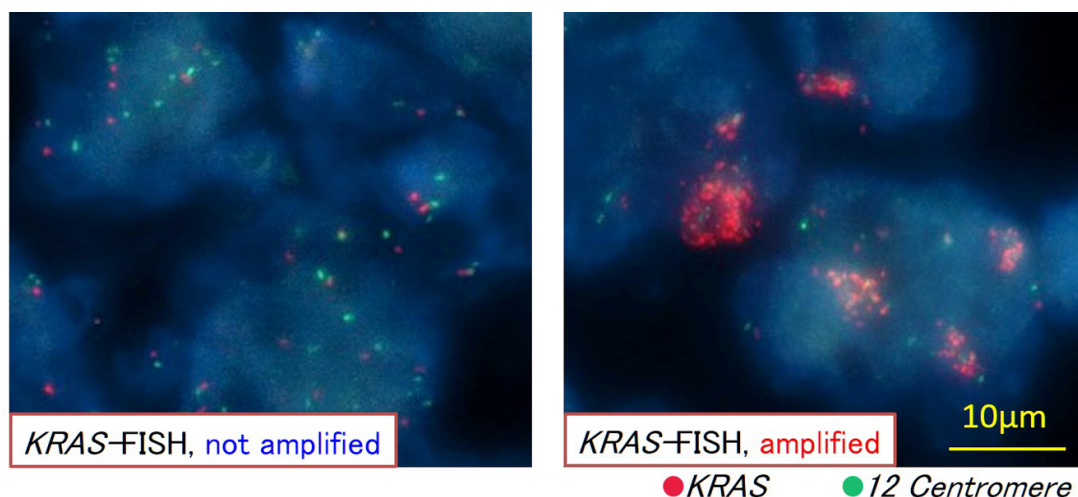


図 2. FISH における *KRAS* 遺伝子増幅の確認
左：*KRAS* 遺伝子増幅なし；右：*KRAS* 遺伝子増幅あり。

RNaseP を用いた *KRAS* copy number の分布を図 3 に示す。147 症例中、35 例（23.8%）に *KRAS* 遺伝子増幅を認めた。

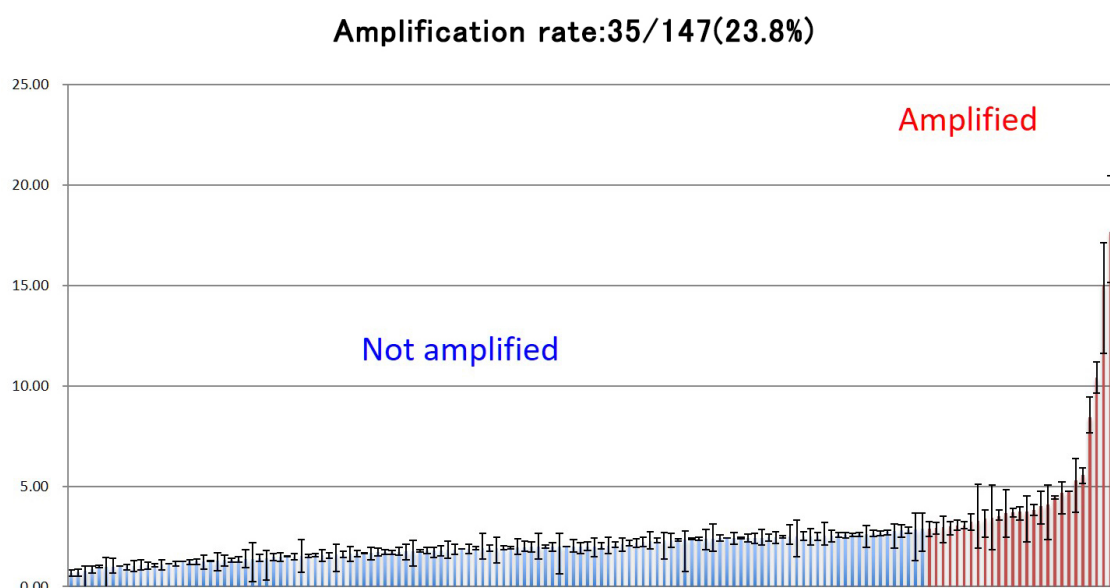


図 3. 全症例における *KRAS* copy number の分布（ $N = 147$ ）
147 症例中、35 例（23.8%）に *KRAS* 遺伝子増幅を認めた（カットオフ値 = 2.7 に設定）。

2. 臨床病理学的因子および予後との検討

全症例（N = 147）において、*KRAS* 遺伝子増幅あり群（N = 35）と *KRAS* 遺伝子増幅なし群（N = 112）を様々な臨床病理学的因子と比較検討を行った（表 1）。年齢、性別においては *KRAS* 遺伝子増幅の有無に差を認めなかった。特記すべきこととして、*KRAS* 遺伝子増幅は、腫瘍占居部位の食道側に位置する Siewert type I～II の腫瘍に多く（P = 0.0195）、より進行した病期（P = 0.0128）や低分化型（P = 0.0443）の腫瘍において高頻度に認められた。また、非常に興味深いことに、*KRAS* 遺伝子増幅あり群には、*KRAS*・*BRAF* 遺伝子変異が極めて少ないことも判明し、*KRAS* 遺伝子増幅と RAS-RAF 系遺伝子変異はお互い排反する遺伝子異常であることが示唆された（表 1）。

表 1. *KRAS* 遺伝子増幅の有無による臨床病理学的因子の比較

Clinicopathological or molecular characteristics	Total No. (%)	<i>KRAS</i> copy number		P (amplified vs. not amplified)
		Amplified no. (%)	Not amplified no. (%)	
Total no. of patients	147	35 (23.8%)	112 (76.2%)	
Sex				0.8587
Male	115 (78.2%)	27 (77.1%)	88 (78.6%)	
Female	32 (21.8%)	8 (22.9%)	24 (21.4%)	
Mean age (years $\pm$ SD)	68.2 $\pm$ 11.8	67.7 $\pm$ 11.3	68.4 $\pm$ 11.9	0.7482
Siewert classification				0.0195
I & II	99 (67.4%)	29 (82.9%)	70 (62.5%)	
III	48 (32.6%)	6 (17.1%)	42 (37.5%)	
Disease stage				0.0128
I	62 (42.2%)	9 (25.7%)	53 (47.3%)	
II	38 (25.8%)	8 (22.9%)	30 (26.8%)	
III	37 (25.2%)	12 (34.3%)	25 (22.3%)	
IV	10 (6.8%)	6 (17.1%)	5 (4.3%)	
Tumor differentiation				0.0443
Well to moderate	108 (73.5%)	21 (60.0%)	87 (77.7%)	
Poorly	39 (26.5%)	14 (40.0%)	25 (22.3%)	
<i>KRAS</i> mutation status				0.2472
Wild type	137 (93.2%)	34 (97.1%)	103 (92.0%)	
Mutant	10 (6.8%)	1 (2.9%)	9 (8.0%)	
<i>BRAF</i> mutation status				0.9355
Wild type	139 (94.6%)	33 (94.3%)	106 (94.6%)	
Mutant	8 (5.4%)	2 (5.7%)	6 (5.4%)	

SD, standard deviation

生存解析を行った結果、無再発生存率（disease-free survival, DFS）、癌特異的生存率（cancer-specific survival, CSS）、全生存率（overall survival, OS）のいずれにおいても、*KRAS* 遺伝子増幅あり群は *KRAS* 遺伝子増幅なし群と比較して、有意に予後不良であることが判明した（図 4, いずれも P < 0.05）。

All cases,
Siewert I-III (N=147)

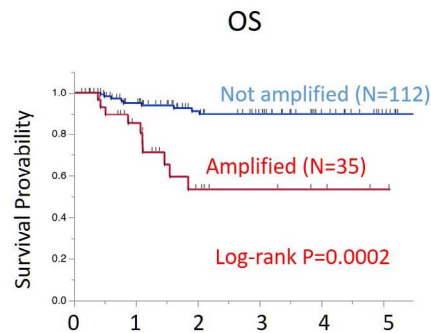
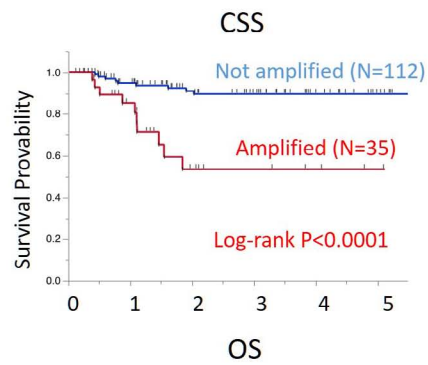
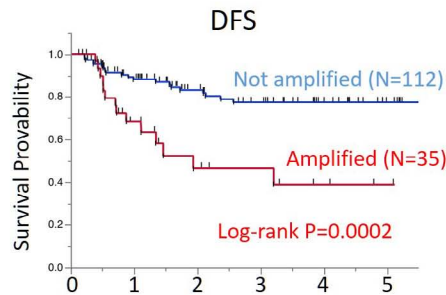


図 4. *KRAS* 遺伝子増幅の有無による生存曲線

無再発生存率 (Disease-free survival, DFS)、癌特異的生存率 (cancer-specific survival, CSS)、全生存率 (overall survival, OS)。

さらに、多変量解析を行った結果、*KRAS* 遺伝子増幅あり群は、DFS、CSS、OS のいずれにおいても有意に独立した予後不良因子であることが判明した (いずれも $P < 0.05$ 、表 2)。

表 2. 多変量解析による *KRAS* 遺伝子増幅と予後との関係

Variable	N	DFS			CSS			OS		
		No. of events	Univariate HR (95% CI)	Multivariate HR (95% CI)	No. of events	Univariate HR (95% CI)	Multivariate HR (95% CI)	No. of events	Univariate HR (95% CI)	Multivariate HR (95% CI)
<i>KRAS</i> copy number										
Not amplified	112	21	1 (referent)	1 (referent)	10	1 (referent)	1 (referent)	18	1 (referent)	1 (referent)
Amplified	35	14	3.44 (1.69-6.83)	3.02 (1.46-6.10)	11	5.98 (2.45-15.0)	6.11 (2.36-16.6)	13	3.65 (1.71-7.63)	3.11 (1.44-6.65)
P			0.001	0.0036		0.0001	0.0002		0.0011	0.0046

無再発生存率 (Disease-free survival, DFS)、癌特異的生存率 (cancer-specific survival, CSS)、全生存率 (overall survival, OS)。

考 察

RAS-MAPK 系の遺伝子異常は様々な悪性腫瘍において広く認められ、きわめて重要で強力な悪性化シグナル系である。特に大腸癌においてはこの遺伝子変異が抗 EGFR 抗体治療のバイオマーカーとなっており、その遺伝子異常は臨床上のバイオマーカーとしての役割は非常に大きい⁷⁾。本研究では、*KRAS* 遺伝子増幅についても、遺伝子変異 (mutation) と同様に、下流の悪性化シグナルに影響を及ぼしていると仮定し、遺伝子増幅頻度の高い食道胃接合部腺癌で検討した。その結果、食道胃接合部腺癌において *KRAS* 遺伝子増幅は 23.8% の頻度で認め、独立した予後不良因子であることが判明した。

これまで食道胃接合部腺癌の *KRAS* 遺伝子増幅 の報告はその頻度の報告にとどまり、臨床病理学的特徴や予後との関連性は全く議論されたことがない。今回我々の研究において、Real-time PCR 法を用いた *KRAS* 遺伝子増幅の検出方法を確立した。本法を用いれば、FISH 法よりも大量のサンプルをスピーディかつ容易に判定することが可能となる。この方法は、FISH による *KRAS* 遺伝子増幅や免疫染色による *KRAS* タンパク発現と有意に相関した。遺伝子増幅を直接確認できる FISH 法に比べると、本法は *RNaseP* を用いた相対的な検出方法であるという欠点を有する。しかしながら、本研究における *KRAS* 遺伝子増幅が 23.8% であったことは、次世代シーケンサーを用いた欧米での 21% という頻度に極めて近似し、信頼性が高いものと考えられる。

本研究において、食道胃接合部腺癌のなかで *KRAS* 遺伝子増幅は、胃側に存在する Siewert type III の腫瘍よりも、より食道側に存在する Siewert type I~II に高頻度に認められた。これは、欧米に多く認める Siewert type I~II の腫瘍の発癌過程において、遺伝子増幅異常は極めて重要であり、かつ高頻度で認められる遺伝子異常である。今回我々の研究においても同様の傾向を確認することができた。さらに、我々は、食道胃接合部腺癌において、RAS-MAPK 系の遺伝子異常の中で *KRAS* 遺伝子増幅が *KRAS/BRAF* 遺伝子変異とほぼ排反関係にあり、独立した予後不良因子であることを明らかにした。ゆえに、*KRAS* 遺伝子増幅は食道胃接合部癌の悪性度を進行させる重要な遺伝子異常であると考えられ、本疾患における分子標的治療のターゲットになりうると考えられた。

KRAS を標的とした癌治療は今だ発展途上である。今回我々が確認した免疫染色では、*KRAS* 遺伝子増幅あり群の約 40% にしか *KRAS* 過剰発現を認めなかった。*KRAS* 遺伝子増幅と *KRAS* タンパク過剰発現のメカニズムの解明が重要だと考えらえる。今後も精力的に研究を重ねていきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者はがん研有明病院食道外科の今村裕君と実験補佐員の原口郁実さん、熊本大学大学院生命科学研究部消化器外科学分野大学院生の中村健一君と実験補佐員の緒方陽子さんである。本稿を終えるにあたり、本研究にご支援いただき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) Reid BJ, Li X, Galipeau PC, Vaughan TL. Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(2):87-101. Epub 2010/01/23. doi: 10.1038/nrc2773. PubMed PMID: 20094044; PubMed Central PMCID: PMC2879265.
- 2) Kusano C, Gotoda T, Khor CJ, Katai H, Kato H, Taniguchi H, et al. Changing trends in the proportion of adenocarcinoma of the esophagogastric junction in a large tertiary referral center in Japan. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008;23(11):1662-5. Epub 2009/01/06. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05572.x. PubMed PMID: 19120859.
- 3) Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, Wong DJ, Galipeau PC, Paulson TG, et al. Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nature genetics*. 1999;22(1):106-9. Epub 1999/05/13. doi: 10.1038/8816. PubMed PMID: 10319873; PubMed Central PMCID: PMC1559997.
- 4) Stachler MD, Taylor-Weiner A, Peng S, McKenna A, Agoston AT, Odze RD, et al. Paired exome analysis of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Nature genetics*. 2015. Epub 2015/07/21. doi: 10.1038/ng.3343. PubMed PMID: 26192918.
- 5) Dulak AM, Schumacher SE, van Lieshout J, Imamura Y, Fox C, Shim B, et al. Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer research*. 2012;72(17):4383-93. Epub 2012/07/04. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3893. PubMed PMID: 22751462; PubMed Central PMCID: PMC3432726.
- 6) Dulak AM, Stojanov P, Peng S, Lawrence MS, Fox C, Stewart C, et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity.

- Nature genetics. 2013;45(5):478-86. Epub 2013/03/26. doi: 10.1038/ng.2591. PubMed PMID: 23525077; PubMed Central PMCID: PMC3678719.
- 7) Imamura Y, Lochhead P, Yamauchi M, Kuchiba A, Qian ZR, Liao X, Nishihara R, Jung S, Wu K, Nosho K, Wang YE, Peng S, Bass AJ, Haigis KM, Meyerhardt JA, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S. Analyses of Imamura Y, Lochhead P, Yamauchi M, Kuchiba A, Qian ZR, Liao X, et al. Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of KRAS codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Mol Cancer*. 2014;13:135. doi: 10.1186/1476-4598-13-135. PubMed PMID: 24885062; PubMed Central PMCID: PMCPMC4051153.
 - 8) Cancer Genome Atlas Research N, Analysis Working Group: Asan U, Agency BCC, Brigham, Women's H, Broad I, et al. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature*. 2017. doi: 10.1038/nature20805. PubMed PMID: 28052061.