

124. 食道扁平上皮癌の発癌メカニズムの解明

鈴木 啓道

京都大学 医学部 腫瘍生物学講座

Key words : 食道扁平上皮癌, クローン進化, *TP53*, *NOTCH1*

緒言

食道癌は世界で6番目に死亡率の高い癌である¹⁾。食道は外膜を持たない構造であることから周囲に浸潤しやすく予後が悪い。わが国では90%以上が扁平上皮癌であり、アルコール・タバコが危険因子とされている。食道扁平上皮癌は前癌病変と考えられている低/高異型度上皮内腫瘍を経て段階的に進展し最終的に癌化すると考えられている。

近年、治療の進歩とともに扁平上皮癌の予後も改善してきた。しかしながら、多くの食道扁平上皮癌患者では長年のリスク因子への暴露から広範囲に食道上皮が異型化しており、治療により癌が完治しても数年後に別の箇所より新たな癌が発生してしまう。つまり食道扁平上皮癌患者において異常は癌細胞だけに起きているのではなく、食道全体にすでに起きていると考えられる。そのため、癌だけでなく前癌病変である上皮内腫瘍に生じている異常を解明することは食道癌発生に至るメカニズムを解明することになり、しいては食道癌の治療・予防に発展すると考えられる。

方法

11例の食道扁平上皮癌患者、2例の飲酒歴・喫煙歴とともに認める食道扁平上皮癌ハイリスク非担癌患者から内視鏡的に非癌部食道を含めたマルチサンプリングを行った。マルチサンプリングは内視鏡下に生検鉗子を用いて検体採取を行い、同一患者において複数の異なった部位から検体を採取した。13例から合計61検体採取し、採取した検体は一方が2 mm×2 mm×2 mmの統一サイズになるように2分割した。統一サイズに分割した検体からDNA抽出を行い、全エクソン変異解析を行った。もう一方の検体を用いて病理標本を作製し、WHO Classification of Tumours of the Digestive System (4th Edition) に準拠して病理診断を行い、各組織を Non-dysplasia、Dysplasia、Cancer に分類した。正常対照として10例の健常人から正常食道上皮を採取し、同様の方法で全エクソン変異解析を行った。

全エクソン解析は Agilent 社 SureSelect Human All Exon v5 を用いてエクソン領域を濃縮し、イルミナ社 HiSeq 2500 を用いてシーケンスを行った。得られたシーケンス配列は Burrows-Wheeler Aligner (Version 0.5.8) を用いて NCBI Human Reference Genome Build 37 にマッピングし、Empirical Bayesian mutation Calling (EBCall) アルゴリズムを用いて変異同定を行った²⁾。さらに、inhouse-pipeline を用いた染色体コピー数異常の解析も行った。

同定された変異の variant allele frequency から、PyClone ソフトウェアを用いてサンプルごとにクローン構造を決定した³⁾。症例ごとに、MEGA6 を使用し、最大節約法を用いた進化系統樹を作成した⁴⁾。

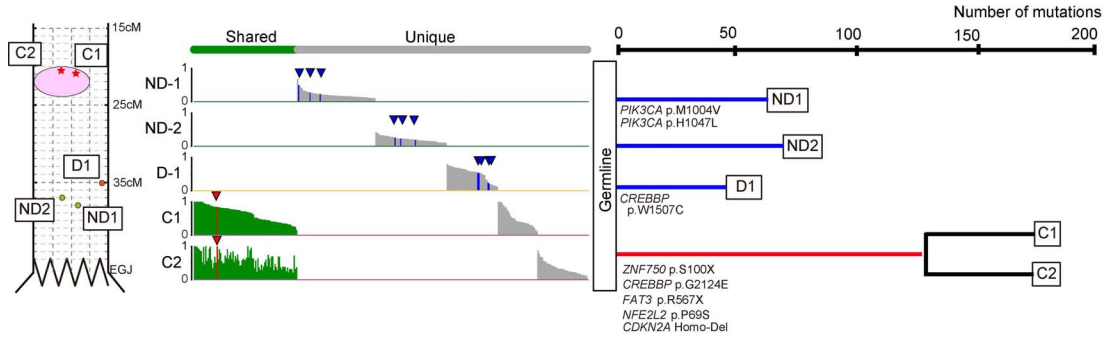
追加コホートとして31例の食道癌患者から Non-dysplasia、Cancer 組織を一か所ずつ採取し、癌関連遺伝子をターゲットとした標的シーケンスを行った。

結果

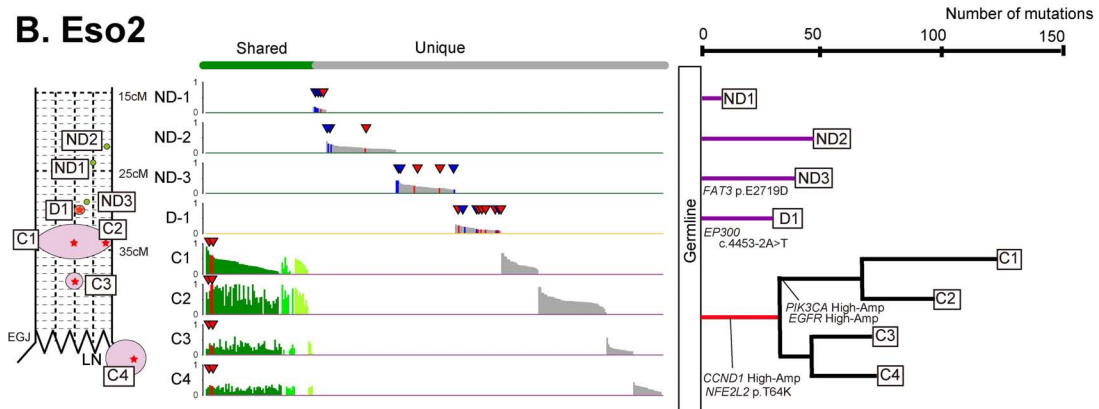
マルチサンプリングを行った13症例において合計3,255個の Single nucleotide variants と204個の insertions/deletions を同定した。

マルチサンプリング症例においてクローン構造解析を行うと、内視鏡的に単一病変と考えられた症例においては、腫瘍間において共通して存在する遺伝子変異を複数認め、単一の起源細胞からの発癌と考えられた (図 1A、1B)。一方、複数の病変を認めた症例においては、複数のサンプリング箇所でも同定される共通の遺伝子変異は認めず、異なった起源細胞からそれぞれ癌化していると考えられ、同時多発癌であると考えられた (図 1C)。

A. Eso1



B. Eso2



C. Eso11

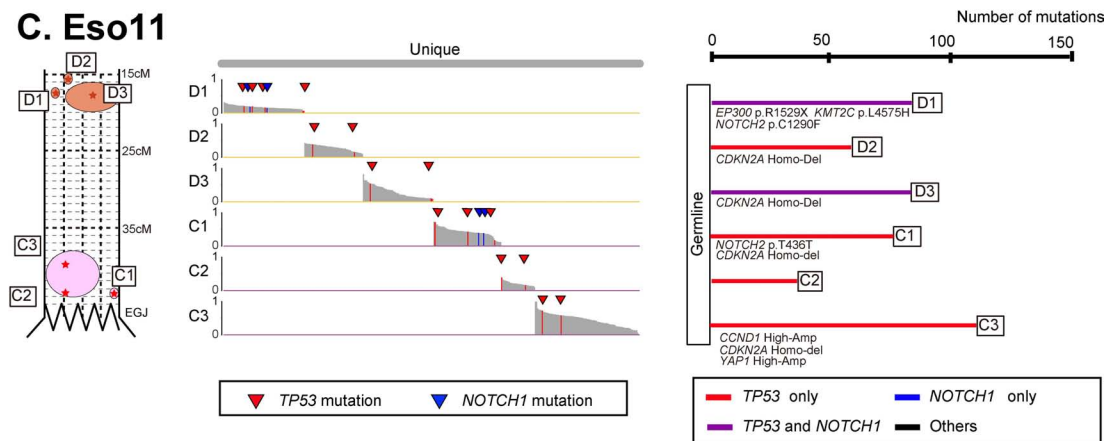


図1. マルチサンプリング代表例におけるクローン構造

左) サンプリング部位の概略図。ピンク色は癌部、オレンジ色は異形成を示す。EGJ: esophagogastric junction, LN: lymph node.

中) 各部位で同定された遺伝子変異。縦軸は染色体コピー数異常を補正した Variant allele frequency を示す。横軸は各遺伝子変異を共通する変異から variant allele frequency に基づいて並べている。緑色は複数の部位で認められた遺伝子変異。TP53 遺伝子変異と NOTCH1 遺伝子変異はそれぞれ三角形で示している。

右) 遺伝子変異に基づいた進化系統樹。各枝は TP53 遺伝子変異と NOTCH1 遺伝子変異の有無にて色をわけている。食道扁平上皮癌においてこれまで報告されている有意遺伝子異常が認められた場合、各枝の下に示している。High-Amp: High-level focal amplification, Homo-del: Homozygous deletion, ND: Non-dysplasia, D: Dysplasia, PC: Cancer.

さらに、各症例の非癌部食道上皮においても遺伝子変異が同定され、癌のみならず非癌部食道上皮においてもクローン性増殖が生じていることが確認された。非癌部食道上皮における変異は同一患者の他部位の変異と共通しているものがなく、それぞれが独立してクローン性増殖していると考えられた (図 1)。

癌部・非癌部ともにクローン性増殖が認められたが、認められる変異遺伝子は組織間において違いが見られた。癌部では全例に *TP53* 遺伝子の変異が確認された。*TP53* 遺伝子変異は癌部では常にクローナリに認められ、*TP53* 遺伝子変異は最も早期に生じていることが示唆された。Non-dysplasia 組織でも *TP53* 遺伝子変異が 63% (19/30) の確率で認められたが、それよりも *NOTCH1* 遺伝子変異の頻度が高く、77% (23/30) で認められた。一方、癌における *NOTCH1* 遺伝子変異はわずか 10% (2/19) であった。

31 例の Validation コホートでも同様の傾向が見られ、Non-dysplasia 組織では *NOTCH1* 遺伝子変異、癌部では *TP53* 遺伝子変異が最も多く同定された (図 2)。健康人でも *TP53* 遺伝子変異、*NOTCH1* 遺伝子変異は同定されたが、担癌患者およびハイリスク患者と比較しその頻度は低かった。また、*CDKN2A* 遺伝子変異および Homozygous deletion、*NFE2L2* 遺伝子変異、*CCND1* 遺伝子と *EGFR* 遺伝子の focal high-level amplification は癌部で高頻度に同定されたが、Non-dysplasia では 1 箇所まで認められるのみであった。一方、Dysplasia 組織におけるこれらの遺伝子異常の頻度はその中間であった。

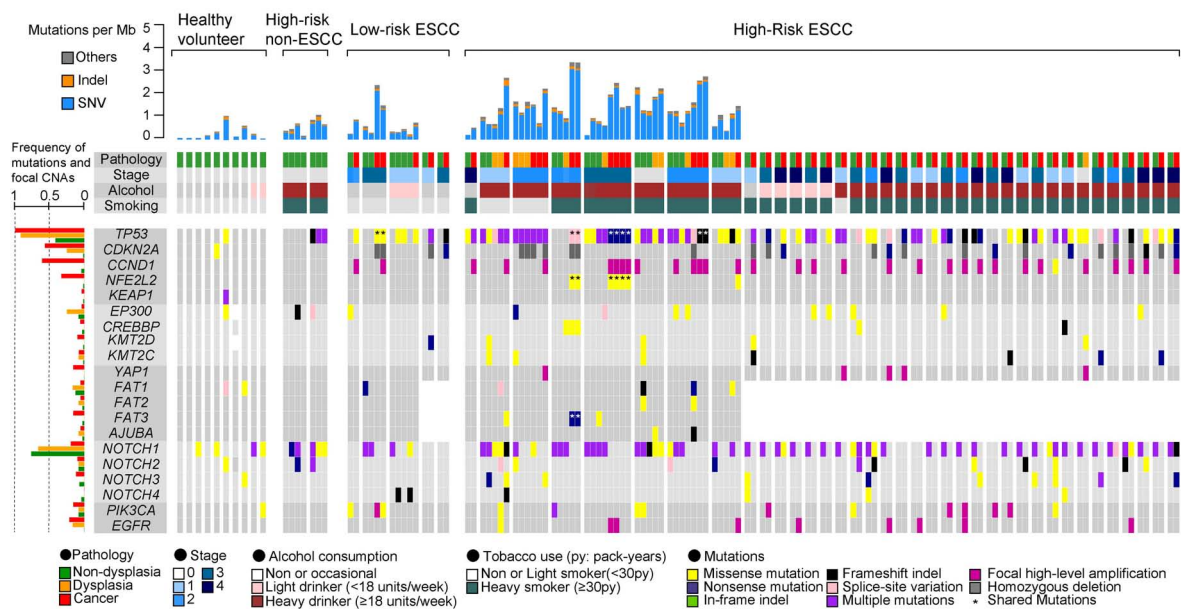


図 2. 非癌部食道扁平上皮および食道扁平上皮癌における遺伝子異常同定された遺伝子異常の全体図。

染色体コピー数異常においても、組織による違いが強く見られた。癌部で頻度の高い染色体異常は、染色体 3 番長腕の増幅 (15/19, 78.9%)、染色体 3 番短腕の欠失 (15/19, 78.9%)、染色体 9 番短腕の Loss of Heterozygosity (LOH) (10/19, 47.4%) であり *TP53* 遺伝子領域を含む染色体 17 番短腕の LOH (9/19, 47.4%) であった。一方、Non-dysplasia 組織においては *NOTCH1* 遺伝子領域を含む染色体 9 番長腕のテロメア側における LOH 以外に染色体コピー数異常が生じることは極めて稀であった。組織悪性度が進行するにしたがい、染色体コピー数異常は増加していく傾向があった。これらの染色体コピー数異常の多くは、症例間による違いはあまり見られず、同じ組織型であれば同様の変化を有している傾向が確認された (図 3)。

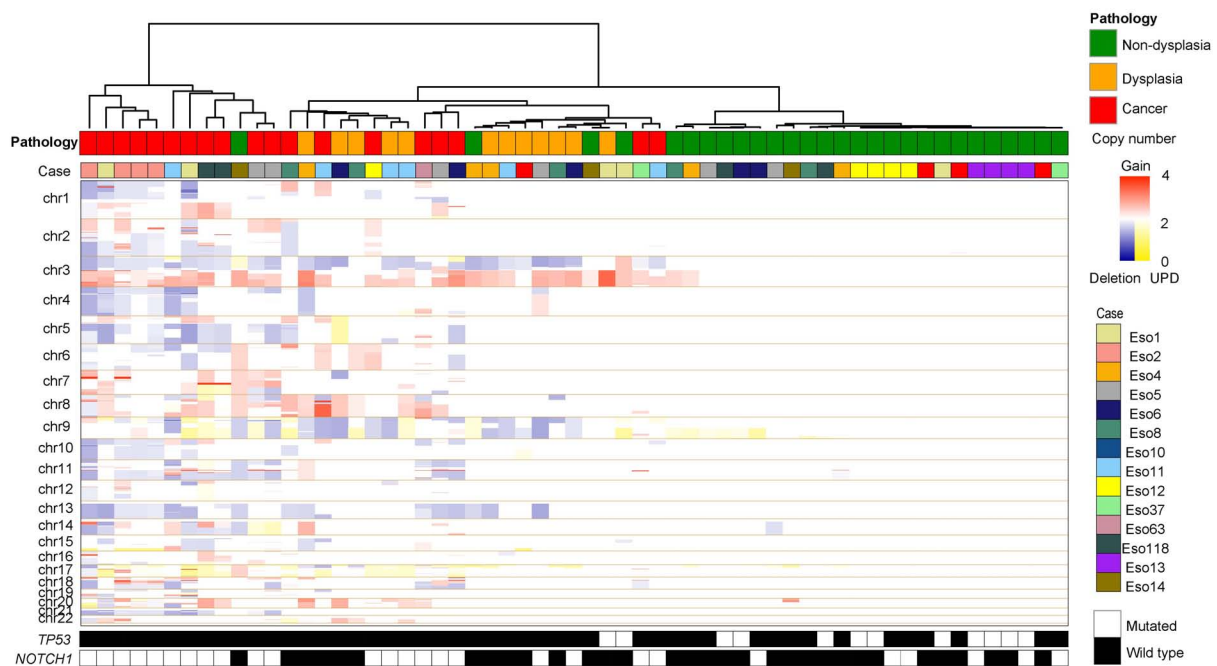


図3. マルチサンプリング症例における染色体コピー数異常
 同定された染色体コピー数異常をピアソン類似度をもちいてクラスタリングを行った。組織ごとに集積する傾向を認めた。

考 察

これまで食道扁平上皮癌においては大規模網羅的遺伝子異常解析が行われてきたが、いずれも癌のみを対象にした研究であり、正常食道扁平上皮における遺伝子異常解析は十分に行われてきていなかった^{5,6)}。

今回、我々の研究により食道扁平上皮の非癌部でもクローン性増殖が認められた。クローン性増殖に強く関与する遺伝子変異は *NOTCH1*、*TP53* であった。これらの遺伝子変異は健常人においても認められるがその頻度は低かった。そのため、*NOTCH1*、*TP53* 遺伝子異常を有した食道扁平上皮はアルコールや喫煙といった危険因子の慢性暴露下において、これらの遺伝子異常を有しない細胞よりも生存に有利と考えられた。

一方、癌においては今回のコホートのすべての部位で *TP53* 遺伝子異常を認めた。癌部における *TP53* 遺伝子異常のほとんどは biallelic inactivation を受けていた。これまで Diffuse astrocytoma, IDH-mutant や肺小細胞癌で極めて高頻度に *TP53* biallelic inactivation を受けていることが報告されている（それぞれ 98.1%, 98.2%）^{7,8)}。これらの遺伝子異常は全ゲノムシーケンスによって初めて同定される構造異常などもあり、今回のコホートでは全エクソンシーケンスのみの解析にとどまることから、食道扁平上皮癌においてもほぼ全ての症例で *TP53* の biallelic inactivation が認められると考えられる。

癌部では *CCND1* high-level amplification や *CDKN2A* の homozygous deletion といった Cell cycle regulator の異常が認められた。これらは Non-dysplasia 組織に認められることは稀であり、Dysplasia 組織にて初めて同定されてくる。食道扁平上皮が癌化するためには *TP53* 遺伝子変異を有したクローンが、Cell cycle regulator の異常を獲得することが必須と考えられる。

一方、非癌部食道においては *NOTCH1* 遺伝子異常を高頻度に認める。これはこれまで報告されている非癌部眼瞼上皮組織における遺伝子異常の結果と同様であった⁹⁾。非癌部組織におけるクローン選択は恒常的に生じていると考えられる。しかしながら、食道扁平上皮癌における *NOTCH1* 遺伝子異常はわずか 20%にとどまり、*NOTCH1* 遺伝子異常を有するほとんどの症例で *TP53* 遺伝子変異も認められる。このことから、*NOTCH1* 遺伝子変異のみを有したクローンは *TP53* 遺伝子変異を有したクローンに比べ癌化は極めて稀であると考えられた。

食道扁平上皮においては癌部・非癌部とも、クローン性増殖が生じていることが明らかとなった。しかしながら癌部と非癌部において異なったクローン選択機構が生じていた。食道扁平上皮は *TP53* の biallelic inactivation に加え Cell cycle regulator の異常が生じることにより発生すると考えられた。

共同研究者

本研究の共同研究者は京都大学医学部腫瘍薬物治療学の武藤学、横山顕礼である。

文 献

- 1) Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, Luketich JD. Oesophageal carcinoma. The Lancet. 2013;381(9864):400-12. doi: 10.1016/s0140-6736(12)60643-6.
- 2) Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, et al. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. Nucleic acids research. 2013;41(7):e89. doi: 10.1093/nar/gkt126. PubMed PMID: 23471004; PubMed Central PMCID: PMC3627598.
- 3) Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. Nature. 2012;486(7403):395-9. doi: 10.1038/nature10933. PubMed PMID: 22495314; PubMed Central PMCID: PMC3863681.
- 4) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30(12):2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197. PubMed PMID: 24132122; PubMed Central PMCID: PMC3840312.
- 5) Gao YB, Chen ZL, Li JG, Hu XD, Shi XJ, Sun ZM, et al. Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma. Nat Genet. 2014;46(10):1097-102. doi: 10.1038/ng.3076. PubMed PMID: 25151357.
- 6) Lin DC, Hao JJ, Nagata Y, Xu L, Shang L, Meng X, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma. Nat Genet. 2014;46(5):467-73. doi: 10.1038/ng.2935. PubMed PMID: 24686850; PubMed Central PMCID: PMC4070589.
- 7) Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. Nat Genet. 2015;47(5):458-68. doi: 10.1038/ng.3273. PubMed PMID: 25848751.
- 8) George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretic L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. Nature. 2015;524(7563):47-53. doi: 10.1038/nature14664. PubMed PMID: 26168399; PubMed Central PMCID: PMC4861069.
- 9) Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, Ellis P, Van Loo P, McLaren S, et al. Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. Science. 2015;348(6237):880-6. doi: 10.1126/science.aaa6806. PubMed PMID: 25999502; PubMed Central PMCID: PMC4471149.