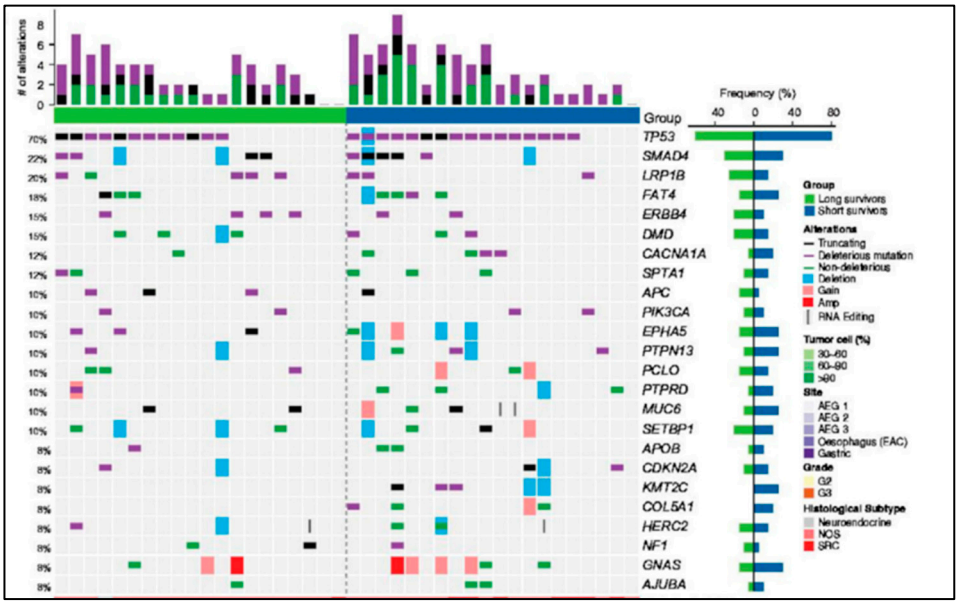
188　食道胃接合部癌の個別化医療を目指したゲノム解析	原田　和人

【目的】本邦において、食道腺癌の罹患率は急激に増加している。手術、化学療法、放射線療法を含む集学的治療の進歩にも関わらず、食道腺癌の 5 年生存率は 25%と不良である。切除可能な食道胃接合部癌に対しては、微小転移を制御し、術後の再発転移を予防するために術前治療が行われている。欧米では術前の化学放射線療法が術後の予後を延長することが報告されている（van Hagen et al. N Engl J Med 2012）。更なる予後の改善の為には、術前治療の感受性を予測するバイオマーカーの同定が必要であるが、その報告は少ない。切除不能食道胃接合部癌に対しても、癌細胞の分子生物学的特徴に基づいた個別化治療の研究が進んでいないのが現状である。本研究の目的は化学放射線療法で奏功した症例と治療耐性を示した症例の分子生物学的相違を Exome sequencing と RNA sequencing を用いて網羅的なゲノム解析を行うことである。治療が奏功した症例に特異的なゲノムの特徴を同定し、予後予測因子、抗癌剤感受性予測因子の同定を試みる。治療に耐性を示す症例に特異的なゲノムの特徴から抗癌剤耐性のメカニズムを解明することで、新規の分子標的治療薬のターゲットの同定、新規治療薬の創薬を進める。

【方法】切除不能なステージ 4 の食道胃接合部癌患者のうち、化学療法に奏功して 3 年以上生存した症例（longer survivors）と化学療法に奏功せずに半年以内に死亡した症例（shorter survivors）、それぞれ 20 例ずつを選択し NovaSeq6000 を用いて Whole-exome sequencing（WES）と bulk RNA sequencing（RNA-seq）を行った。

【結果】遺伝子変異解析では mutation burden は longer survivor と shorter survivors の両群で差は認めなかった。頻度の多い遺伝子変異は *TP53*（70%）、*SMAD4*（22%）、*LRP1B*（20%）、*ERBB4*（15%）、*APC*（10%）、*PIK3CA*（10%）、*PTPN13*（10%）、*KMT2C*（8%）であった。この中で *KMT2C* 変異は shorter survivors 群に有意に多く認められた（the Fisher exact test、$p<0.05$）。COSMIC mutational signatures を比較すると、sig2、sig12 の変異が有意に longer survivors で多く認められた。longer survivors と shorter survivors の copy number variations を比較すると、Chr4 の欠損が shorter survivors で有意に多く認められた。

longer survivors と shorter survivors の遺伝子変異



188. 食道胃接合部癌の個別化医療を目指したゲノム解析

原田　和人

熊本大学病院 次世代外科治療開発学寄附講座

Key words：食道胃接合部癌，ゲノム，次世代シーケンサー，個別化治療

緒　言

本邦において、食道腺癌の罹患率は急激に増加している。手術、化学療法、放射線療法を含む集学的治療の進歩にも関わらず、食道腺癌の 5 年生存率は 25%と不良である。切除可能な食道胃接合部癌に対しては、微小転移を制御し、術後の再発転移を予防するために術前治療が行われている。欧米では術前の化学放射線療法が術後の予後を延長することが報告されている［1］。更なる予後の改善の為には、術前治療の感受性を予測するバイオマーカーの同定が必要であるが、その報告は少ない。食道胃接合部癌の分野では癌細胞の分子生物学的特徴に基づいた個別化治療の研究が進んでいないのが現状である。

The Cancer Genome Atlas による癌細胞のゲノム解析が行われている。上部消化器癌のゲノム解析が行われ、食道腺癌は胃癌と比較すると、染色体不安定性（chromosomal instability：CIN）を有する症例が多いことが報告された［2］。しかし、食道胃接合部癌の症例数は少なく、食道胃接合部癌だけでの subtype 分類はされていない。また、術前治療の感受性や予後などの臨床学的特徴と分子生物学的特徴を比較検討するには症例数が十分ではない。つまり、他の癌種と比較してゲノム解析が進んでいないのが現状である。様々な癌腫において、様々な分子標的治療薬の有効性が示され臨床応用されている。現在では、食道胃接合部癌に対して有効な分子標的薬は Her2 陽性の食道腺癌に対する Her2 阻害剤だけであり、食道胃接合部癌に対する新たな分子標的治療薬の開発が望まれている。これまでに多くの分子標的治療薬が臨床試験で試されたが、食道胃接合部癌に有効性を示すことができていない。その理由としては、食道胃接合部癌のゲノム解析が進んでいないために、有効なバイオマーカーが無いことが原因と考えられる。

本研究の目的は化学放射線療法で奏功した症例と治療耐性を示した症例の分子生物学的相違を Exome sequencing と RNA sequencing を用いて網羅的なゲノム解析を行うことである。更に、化学放射線療法の感受性と分子生物学的特徴との関係を明らかにすることである。治療が奏功した症例に特異的なゲノムの特徴を同定し、予後予測因子、抗癌剤感受性予測因子の同定を試みる。治療に耐性を示す症例に特異的なゲノムの特徴から抗癌剤耐性のメカニズムを解明することで、新規の分子標的治療薬のターゲットの同定、新規治療薬の創薬を進める。

本研究の結果が食道胃接合部癌に対するゲノムに基づいた個別化術前治療に展開されていくことを期待している。バイオマーカーに基づいて症例毎に最適な化学療法のレジメン選択が可能となる。治療耐性のメカニズムを解明することで治療ターゲットの同定し、新たな分子標的治療薬の開発をすることができると考えている。

方法および結果

1. 臨床サンプルからの DNA／RNA 抽出

熊本大学消化器外科および共同研究施設である米国の MD Anderson Cancer Center で採取された治療前の食道胃接合部癌の凍結組織より凍結切片を作製し、組織の評価を行った。腫瘍細胞が 60%以上含まれている組織より、AllPrep DNA/RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いて DNA と RNA を抽出した。

2. Exome/RNA sequencing による網羅的ゲノム解析

切除不能なステージ 4 の食道胃接合部癌患者のうち、化学療法に奏功して 3 年以上生存した症例（longer survivors）と化学療法に奏功せずに半年以内に死亡した症例（shorter survivors）、それぞれ 20 例ずつを選択し NovaSeq6000 を用いて Whole-exome sequencing（WES）と bulk RNA sequencing（RNA-seq）を行った。遺伝子変異解析では mutation burden は longer survivor と shorter survivors の両群で差は認めなかった。頻度の多い遺伝子変異は *TP53*（70%）、*SMAD4*（22%）、*LRP1B*（20%）、*ERBB4*（15%）、*APC*（10%）、*PIK3CA*（10%）、*PTPN13*（10%）、*KMT2C*（8%）であった。この中で *KMT2C* 変異は shorter survivors 群に有意に多く認められた（the Fisher exact test、$p<0.05$）（図 1）。COSMIC mutational signatures を比較すると、sig2、sig12 の変異が有意に longer survivors で多く認められた（図 2）。longer survivors と shorter survivors の copy number variations を比較すると、Chr4 の欠損が shorter survivors で有意に多く認められた（図 3）。

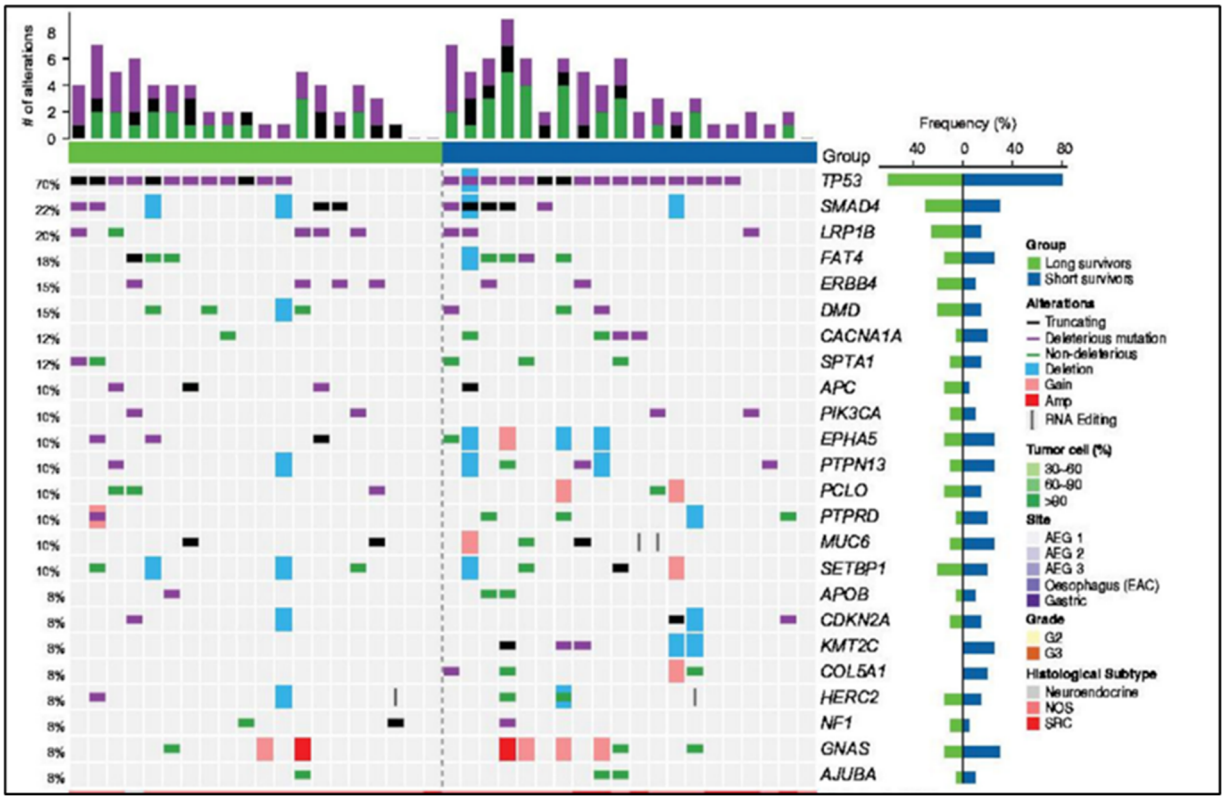


図 1. longer survivors と shorter survivors の遺伝子変異
頻度の多い遺伝子変異は *TP53*（70%）、*SMAD4*（22%）、*LRP1B*（20%）、*ERBB4*（15%）、*APC*（10%）、*PIK3CA*（10%）、*PTPN13*（10%）、*KMT2C*（8%）であった。

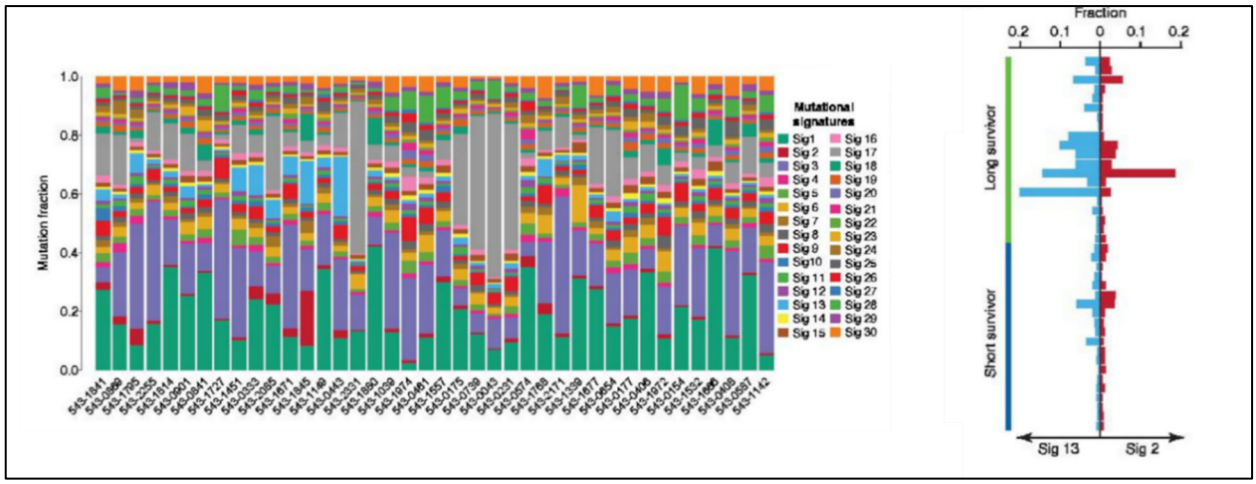


図 2. longer survivors と shorter survivors の COSMIC mutational signatures
sig2、sig12 の変異が有意に longer survivors で多く認められた。

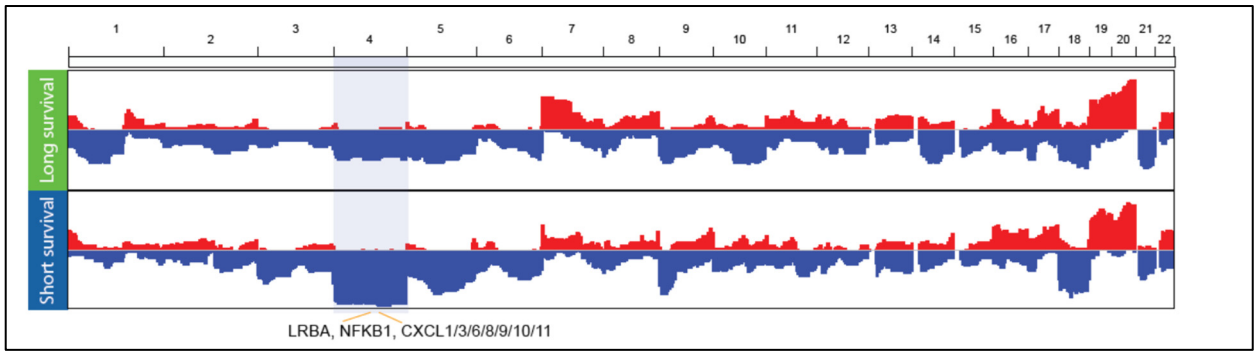


図 3. longer survivors と shorter survivors の copy number variations
Chr4 の欠損が shorter survivors で有意に認められた

考　察

本研究は食道胃接合部腺癌に対して初めて化学療法の奏功度別に網羅的なゲノム解析を行った研究である。本研究では食道胃接合部癌の化学療法奏功例では COSMIC mutational signatures の sig2、sig12 変異が多く、化学療法抵抗例では *KMT2C* 変異が有意に多く、copy number variations の Chr4 の欠損が多いことを明らかにした。更に、Chr4 の欠損症例では癌免疫が抑制されていることを明らかにしつつあり、Chr4 の欠損症例に対する免疫治療が期待される。現在、食道腺癌に対して PD-1 阻害薬が用いられている。奏功した症例では長期予後が期待できる治療ではあるが、その奏効率が低いことが問題である。チェックポイント阻害薬の効果を予測するバイオマーカーの同定が望まれているが、Chr4 欠損がバイオマーカーになりうる可能性がある。また、新規のチェックポイント阻害薬の開発に繋がる研究結果であると考えられる。

更なる検証が必要であるが、本研究結果が将来の食道胃接合部癌のゲノムに基づいた個別化治療の発展に寄与することが期待される。本研究ではまだ予後不良になる、抗がん剤抵抗性になるメカニズムを解明するには至っていない。治療耐性のメカニズムを解明することで治療ターゲットを同定し、新たな分子標的治療薬の開発をすることができると考えている。免疫寛容の阻害が新規治療の可能性の一つであることが明らかとなった。

共同研究者

本研究の共同研究者は、MD Anderson Cancer Center, Department of GI Medical Oncology の Ajani 教授である。

文　献

1） van Hagen, P., Hulshof, M.C., van Lanschot, J.J., , et al. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. N Engl J Med. 2012 366, 2074-2084.

2） Cancer Genome Atlas Research et al.　Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. Nature. 2017. 541:169-175

3） Hao D, He S, Harada K. Integrated genomic profiling and modelling for risk stratification in patients with advanced oesophagogastric adenocarcinoma. Gut. 2020 doi:10.1136/gutjnl-2020-322707