

研 究 報 告 書  
一般課題：A  
(平成 27 年度)

平成 29 年 10 月 25 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 京都大学腫瘍生物学講座

住 所 京都市左京区吉田近衛町

研究者氏名 鈴木 啓道



(研究課題)

食道扁平上皮癌の発癌メカニズムの解明

平成 28 年 1 月 27 日付助成金交付のあった標記一般課題：A について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## <研究成果概要>

研究課題：食道扁平上皮癌の発癌メカニズムの解明

京都大学医学部 腫瘍生物学講座 鈴木啓道

### 【研究の背景】

食道癌は世界で6番目に死亡率の高い癌である<sup>1</sup>。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。多くの食道扁平上皮癌患者では広範囲に食道上皮が異型化しており、治療により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、本研究では同一患者から癌部・低/高異型度上皮内腫瘍のそれぞれを複数部位から採取し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子異常解析を行い食道扁平上皮癌の発生メカニズムを解明し、新規治療・予防の発展に寄与することを目的とする。

### 【方法】

合計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行い、同一患者の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2mm x 2mm x 2mmの統一サイズになるように分割した。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。残り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。正常対象として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(Figure 1)。

全エクソン解析はAgilent社SureSelect Human All Exon v5を使用してエクソン領域の濃縮を行い、イルミナ社HiSeq 2500を用いてpair-endシーケンスを行った。シーケンスリードはBurrows-Wheeler Aligner (Version 0.5.8)を用いてNCBI Human Reference Genome Build 37にマッピングを行い、Empirical Bayesian mutation Calling (EBCall)アルゴリズムを用いて変異同定を行った<sup>2</sup>。染色体コピー数変化は、hetero SNPのB allele frequencyを用いたinhouse-pipelineを使用し解析を行った。

同定された変異に対し、PCR ampliconを用いたamplicon deep sequenceを行い各変異のvariant allele frequencyを同定し、PyCloneソフトウェアを用いてサンプルごとにクローニング構造を決定した<sup>3</sup>。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<sup>4</sup>。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、食道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ニング構造解析を行うと、内視鏡的に单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

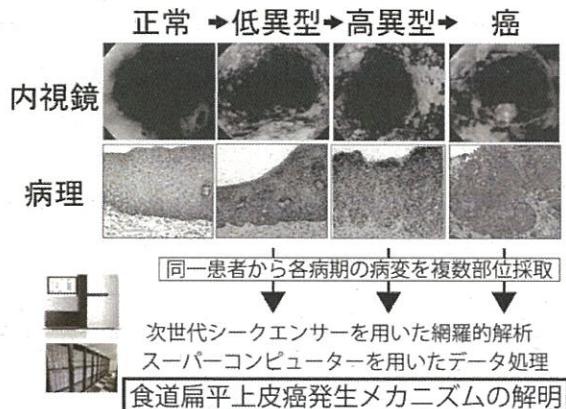


Figure 1: 研究の概略図

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(Figure 2A, 2B)。一方、同一患者内で複数の独立した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同定される共通の遺伝子変異は認めず、異なる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(Figure 2C)。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リ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多くなく、それぞれが独立してクローリン性増殖していると考えられた(Figure 2)。

癌部・非癌部とともにクローリ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ルに認められ、*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 細胞でも *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 細胞では *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(Figure 3)。健常人でも *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 箇所で認められる

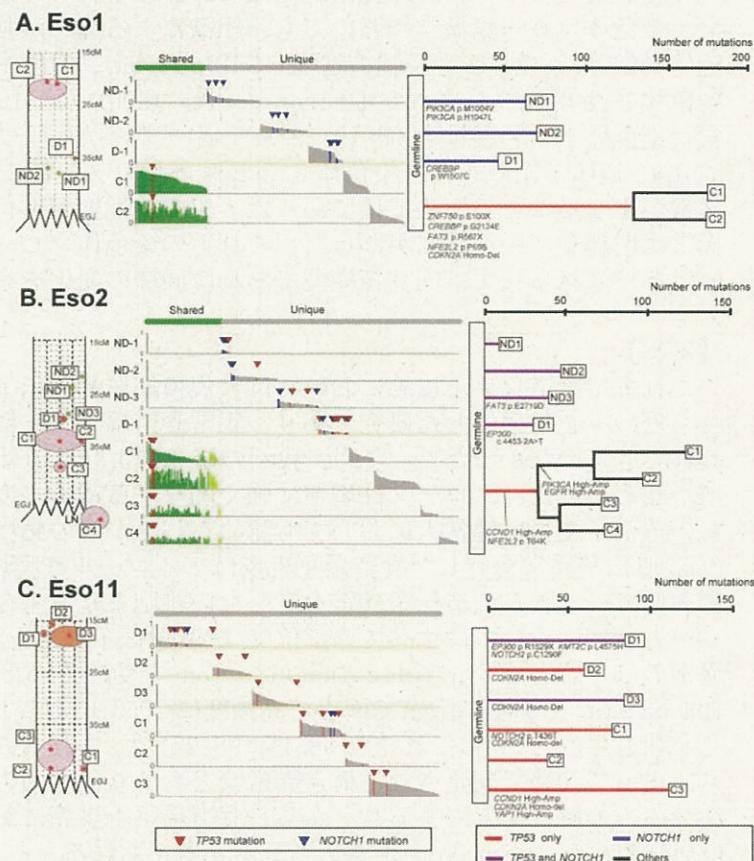


Figure 2: 食道癌患者における食道組織のクローリン構造

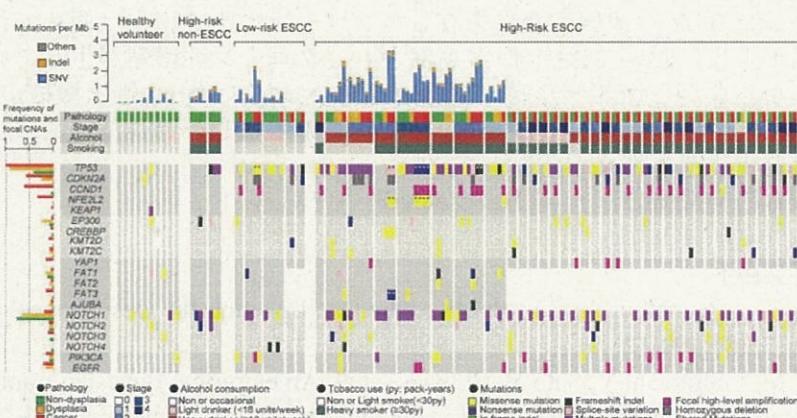


Figure 3: 非癌部食道扁平上皮および食道扁平上皮癌における遺伝子異常

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。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。

### 【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<sup>5-7</sup>。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 を受けている。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%)<sup>8,9</sup>。これらの遺伝子異常は全ゲノムシークエ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クエ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<sup>10</sup>。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。

本研究成果は医学雑誌に投稿準備中である。

### 【文献】

1. Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, Luketich JD. Oesophageal carcinoma. *The Lancet* 2013;381:400-12.
2. Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, et al. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic acids research* 2013;41:e89.
3. Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012;486:395-9.
4. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary

- Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013;30:2725-9.
5. Gao YB, Chen ZL, Li JG, et al. Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma. Nat Genet 2014;46:1097-102.
  6. Sawada G, Niida A, Uchi R, et al. Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Japanese Population. Gastroenterology 2016;150:1171-82.
  7. Lin DC, Hao JJ, Nagata Y, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma. Nat Genet 2014;46:467-73.
  8. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. Nat Genet 2015;47:458-68.
  9. George J, Lim JS, Jang SJ, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. Nature 2015;524:47-53.
  10. Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, et al. Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. Science 2015;348:880-6.

