

Title	大腸癌の原発巣、転移巣及びFOLFOX療法後の再発巣における体細胞遺伝子変異の比較検討
Author(s)	原田, 一顕
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12571号
Issue Date	2017-03-23
DOI	10.14943/doctoral.k12571
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/75032
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:2312
File Information	Kazuaki_Harada.pdf



学位論文

大腸癌の原発巣、転移巣及び FOLFOX 療法後の 再発巣における体細胞遺伝子変異の比較検討

(Comparative sequence analysis of patient-matched primary colorectal cancer, metastatic, and recurrent metastatic tumors after adjuvant FOLFOX chemotherapy)

2017年3月

北海道大学

原田 一顕

学位論文

大腸癌の原発巣、転移巣及び FOLFOX 療法後の 再発巣における体細胞遺伝子変異の比較検討

(Comparative sequence analysis of patient-matched primary colorectal cancer, metastatic, and recurrent metastatic tumors after adjuvant FOLFOX chemotherapy)

2017年3月

北海道大学

原田 一顕

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
緒言	
略語表	7
実験方法	
実験結果	21
総括および結論	
謝辞	
引用文献	

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Kazuaki Harada, Wataru Okamoto, Sachiyo Mimaki, Yasuyuki Kawamoto, Hideaki Bando, Satoshi Yuki, Takayuki Yoshino, Yoshito Komatsu, Atsushi Ohtsu, Naoya Sakamoto, Katsuya Tsuchihara

Comparative sequence analysis of patient-matched primary colorectal cancer, metastatic, and recurrent metastatic tumors after adjuvant FOLFOX chemotherapy

British Journal of Cancer (投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Kazuaki Harada, Wataru Okamoto, Sachiyo Mimaki, Yasuyuki Kawamoto, Hideaki Bando, Satoshi Yuki, Takayuki Yoshino, Yoshito Komatsu, Atsushi Ohtsu, Naoya Sakamoto, Katsuya Tsuchihara

Comparative sequence analysis between primary colorectal cancer, metastasis and recurrent metastasis after adjuvant FOLFOX chemotherapy

the 28th EORTC-NCI-AACR symposium on Molecular targets and Cancer therapeutics (Abstract#356) November 29 - Dec 2, 2016 International Congress Center Munich, Munich, Germany

緒言

大腸がん(結腸がん、および直腸がん)は全世界のがん死亡率の第4位を占める疾 患であり¹、わが国においても、その罹患率および死亡率は著しく増加している。 がん研究振興財団の「がんの統計 '15」²によると、本邦における 2015 年の「部位別 がん予測死亡数|は男性で 27200人、女性で 23400人であり、それぞれがん死亡全体 の12%、15%を占めるに至っている。また、大野らは、2020年には大腸がん罹患患者は 15万人を超え、胃がん、肺がんを抜いて第一位になると予測している³。 大腸がん診療においては、壁深達度、領域リンパ節転移個数、遠隔転移の有無により ステージI-IVに大別する臨床病期分類に応じて治療方針が選択され 4.5、本邦では主 に内視鏡的切除を含む外科的切除や化学療法が単独、もしくはそれらの組み合わせで 実施されている。しかし、唯一の根治的な治療である外科的切除が実施されたとして も、目に見えない潜在的な微小がん細胞や微小転移をすべて取り除くことは不可能な ため再発が見られ、これら再発例の予後は不良である。本邦における再発率は臨床病 期分類ごとに、ステージⅠで 3.8%、ステージⅡで 13.3%、ステージⅢで 30.8%と報告 されている4。切除後に再発した症例や、診断時にすでに遠隔転移を有しているステー ジIVの症例においては、一部の肝転移や肺転移を除き根治的な切除は不可能であり、 延命や症状緩和を目的とした全身化学療法の適応となる。殺細胞性抗がん剤や分子標 的薬を始めとする新規薬剤の登場により切除不能大腸がんの治療成績は向上を続けて いるが、依然として5年生存率は13%程度4であり、更なる治療方法の開発は世界的 な急務である。

近年、新たながん遺伝子・がん抑制遺伝子の探索や、発がんメカニズムの全貌を明 らかにする目的で網羅的なゲノム解析が世界的に進行している。大腸がんにおいても、 Cancer Genome Atlas⁶ など大規模なゲノム解読プロジェクトが進められるとともに、 がんゲノム情報に基づいた治療戦略の構築が加速しており、治療成績の向上に寄与し ている。以下にその一部を述べる。

抗 epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体薬である cetuximab ^{7,8}、 panitumumab⁹は単剤、あるいは既存の殺細胞性抗がん剤との併用療法において良好な 治療成績が報告されており、大腸がん治療における key drug の一つと考えられてい る。抗EGFR抗体薬は細胞膜上にあるEGFRのリガンド結合部位のエピトープに結合し、 リガンドと EGFR の結合を競合的に阻害し内在化することで、がん細胞の分化発達、増 殖を抑制する。KRAS および NRAS は RAS-RAF-MAPK 経路において EGFR の下流に位置し、

3

HRAS とともに RAS ファミリーを構成する重要な蛋白質であるが、これらの遺伝子に変 異が起こると、RAS 蛋白が恒常的に GTP と結合した活性型となり、下流にシグナルが 送り続けられることで抗 EGFR 抗体薬に不応になると考えられている。大規模な臨床 試験の追加解析^{10,11}においても *RAS*変異が抗 EGFR 抗体薬の負の効果予側因子であるこ とが報告され、大腸がんで特に変異頻度が高い *KRAS* exon2、3、4、および *NRAS* exon2、 3、4 の変異測定は、抗 EGFR 抗体薬の適応決定に際し現在必須の検査となっている。 また、効果予測因子としての *RAS* 遺伝子変異の応用は、治療効果を高めるだけでなく、 効果が得られない患者に無用な治療を回避することで医療経済にも大きなメリットを 与えている。

BRAFはRAS-RAF-MAPK 経路において KRAS の下流に位置するセリンスレオニンキナー ゼである。BRAF 変異は大腸癌の約 10%に認められ,90%が codon 600 のバリンから グルタミン酸への変異(V600E)である。BRAF 変異は大腸がんにおいて強い予後不良因 子であることが示されており、BRAF 変異を有する大腸がん症例ではより強度の高い治 療が必要となることが示唆されている^{12,13}。

また、今後大腸がんへの臨床応用が期待される免疫チェックポイント阻害薬の効果 予測因子として、がん組織における遺伝子変異数(mutation burden)が注目されてい る。免疫チェックポイント阻害薬はPD-1やCTLA-4といった免疫チェックポイント分 子を阻害することで、抑制されていた腫瘍免疫を再度活性化し、高い抗腫瘍効果をも たらすとされている。変異遺伝子は「非自己」を示す免疫原生抗原(neoantigen)をコ ードしているため、腫瘍組織における変異数が多いほど免疫系に補足されやすくなり、 免疫チェックポイント阻害薬が高い有効性を発揮すると想定されている¹⁴。Le DT ら は、抗 PD-1 阻害薬である pembrolizumab の臨床活性を評価するために第2 相臨床試 験を行い、体細胞変異数と治療効果の関連を報告している¹⁵。本試験では、DNA 複製の 際に生じる塩基対合のミスマッチ修復に関連する4遺伝子(MLH1、MSH2、MSH6、PMS2) の転写産物について免疫染色を行い、ミスマッチ修復機構が欠損している(dMR)大腸 がんと、ミスマッチ修復機構が正常に作用する(pMMR)大腸がんに分類しているが、こ れらの検体の全エクソームシークエンスを行い体細胞変異数を比較したところ、dMR 大腸がんでは平均 1782 個、対する pMMR 大腸がんでは平均 73 個と有意な差を示し (p=0.007)、体細胞変異が多いことは無増悪生存が長いことと有意な関連を示した $(p=0.02)_{\circ}$

2015年には4つの大規模シークエンスデータから、遺伝子変異、遺伝子コピー数、 DNA のメチル化、マイクロ RNA、およびプロテオミクス情報を統合した Consensus Molecular Subtype (CMS)が提唱された¹⁶。これは、分子生物学的特徴に基づいた新た な大腸がんのサブタイプ分類として注目されており、予後予測や新規治療開発への応 用が期待されている。 このように、がんゲノム情報の応用は現代の大腸がん診療、並びに新規治療開発に おいて重要な位置を占めており、今後も網羅的なゲノム解析や遺伝子変異測定に基づ いた治療戦略の構築が進められていくものと考えられる。しかしながら、例え同一の 症例であっても、腫瘍におけるがんゲノムが治療経過中の全ての時点において同一の 遺伝子変異を有しているのかは未だ十分に検討されていない。近年、複数のがん種に おいて、変異原性を有する化学療法により新たな遺伝子変異が導入されることが報告 されている。

急性骨髄性白血病の初発時、および化学療法後の再発時とで、白血病細胞が有する 遺伝子変異を比較した報告¹⁷では、再発腫瘍におけるがんゲノムに transversion 変 異の増加を特徴的に認めていた。治療薬として全対象症例に cytarabine、および anthracycline が投与されていたことから、これら細胞毒性を持つ化学療法が白血病 細胞の DNA 障害を生じさせることで、再発時の遺伝子変異スペクトラムに大きな影響 を与えうることが示唆された。Johnson らは低悪性度神経膠腫の初発・再発時のゲノ ム比較解析を報告¹⁸しているが、この検討において、神経膠腫に対する標準的な抗が ん剤である temozolomide が投与された半数程度の症例では、再発時に初発時には検 出されなかった非常に多くの体細胞変異を獲得しており、臨床的な悪性度が増してい ることが明らかとなった。再発腫瘍ではAKT-mTOR 経路や RB 経路といった、がん細胞 の増殖に関与するシグナル伝達経路に体細胞変異がみられ、増殖や生存に有利な遺伝 子変異を獲得した細胞が選択的に生き残り、増殖したものと考えられた。

このように化学療法ががんゲノムに加える修飾はがん種や薬剤によって異なり、大腸がんにおいても、がんゲノムが化学療法により修飾を受ける可能性があるものと考えられる。

今回、我々は大腸がんゲノムと FOLFOX 療法による術後補助化学療法の関連に注目した。FOLFOX 療法は代表的な殺細胞性抗がん剤である、5-FU、Leucovorin、oxaliplatin からなる併用化学療法であり、大腸がんに対する術後補助化学療法に標準的に用いられている^{4,5,19}。術後補助化学療法とは、切除が行われた症例に対して再発を抑制し、 生存期間を延長させる目的で施行されるものであるが、FOLFOX による術後補助化学療法が施行されたとしても、再発を完全に予防することはできず、特にステージIVでは、術後 5 年 DFS は 30-40%と報告^{20,21} されている。

FOLFOX 療法に用いられる oxaliplatin は DNA 二本鎖内及び二本鎖間に架橋を形成し、連続したグアニン塩基間に付加体 (Pt-GG adduct) を形成して DNA 損傷を引き起

こすことが知られている²²⁻²⁴が、培養細胞実験系による研究では、oxaliplatinに曝露 されることによって遺伝子変異が促進する変異原性が報告²⁵されている。このことか ら、FOLFOX 療法による術後補助化学療法では、再発巣に新たな遺伝子変異が導入され ている可能性が考えられる。そこで、我々の研究室では、大腸がん原発巣、FOLFOX 投 与前に存在した転移巣、FOLFOX 施行後に出現した再発巣それぞれの手術検体を用い、 抗 EGFR 抗体薬の効果予測因子と考えられる *KRAS、NRAS、BRAF、*および *PIK3CA* のホッ トスポット変異を比較したが²⁶、FOLFOX 療法の施行前後で変化はみられなかった。し かし、oxaliplatin がこれら以外の遺伝子に与える影響については未だ不明である。

再発巣に新たな遺伝子変異が導入されているとすれば、FOLFOX 療法による治療歴を 有する症例と未治療の症例において、がんゲノム情報に基づいた治療方針が異なる可 能性がある。さらに、患者への侵襲性から頻回ながん組織の採取が困難である実地臨 床現場において、がんゲノム情報を検索する際に FOLFOX 療法前後のどちらのがん組 織が適切かを再考する必要がある。また、がんゲノムの変化は FOLFOX 療法の治療反応 性と関連している可能性があり、その詳細な検討は有益な情報をもたらすと考えられ る。

今回我々は、大腸がん4症例について、原発巣、 転移巣及び FOLFOX 療法による術 後補助化学療法施行後に出現した再発巣のそれぞれから DNA を抽出し、次世代シーク エンサー(New generation sequencer : NGS)による全エクソンシークエンスを行っ た。得られたシークエンスデータから、体細胞変異数と変異遺伝子、一塩基置換パタ ーン及びコピー数変化(Copy number alterations : CNAs)を比較し、FOLFOX 療法に よる術後補助化学療法が再発巣に新たな遺伝子変化を導入しているかを検討した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ARMS: amplification refractory mutation system CNAs: copy number alterations ctDNA: circulating tumor DNA DNA: deoxyribonucleic acid dsDNA: double strand DNA DFS: disease free survival dMMR: deficient mismatch repair DW: dry water EGFR: epidermal growth factor receptor FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded GTP: guanosine triphosphate GO: gene ontology indel: insertion /deletion ITH: intra tumor heterogenighty MST: median survival time PCR: polymerase chain reaction pMMR: proficient mismatch repair P-gp MDR: P-glycoprotein multiple drug resistance RNA: ribonucleic acid SNVs: single nucleotide variants SNP: single Nucleotide Polymorphism TE: tris EDTA buffer VEGF: vascular endothelial growth factor

5-FU: 5-fluorouracil

実験方法

症例選択:

診療録情報を元に、国立がん研究センター東病院で2006年1月から2009年12月 の間に大腸がん原発巣、および転移巣に対し根治的な切除が行われ、術後補助化学療 法としてFOLFOX療法が施行された症例を抽出した。その後、化学療法前の転移巣と同 ーの臓器に再発を認め、再切除が行われた症例を選択し、全てのがん組織からDNAが 十分量抽出可能な症例を適格とした。

2010年1月以降については、国立がん研究センター東病院で臨床研究として原発巣の切除前に術前化学療法や術前化学療法が試みられていたことから、症例検索期間から除外した。また、腫瘍が存在する臓器により変異遺伝子が異なるかは明らかとなっておらず^{27,28}、臓器による影響を除くために、転移巣、再発巣を同一臓器に生じた症例のみを選択した。

研究倫理:

本研究は「疫学研究に関する倫理指針(平成14年6月17日制定、平成25年4月 1日一部改正)」に従って計画され、国立がん研究センターの研究倫理審査委員会で研 究実施計画書が承認された後に実施された(研究課題番号2014-306)。

本研究に関係する全ての研究者は、ヘルシンキ宣言(世界医師会)の精神、および 「疫学研究に関する倫理指針」に従って本研究を行った。

ゲノム DNA の抽出:

大腸癌原発巣、転移巣及び FOLFOX 療法後の再発巣の手術切除組織のホルマリン固 定パラフィン包埋(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)ブロックを 10µm の 厚さで薄切し、がん細胞が 70%以上を占める領域を用手的に剔出した(macrodissection 法)。また、生殖細胞変異を除外して体細胞変異を絞り込むためのコント ロールとして使用するため、同一症例の正常大腸組織も同様に剔出した。

組織サンプルからのゲノム DNA 抽出は EZ1 advanced XL and EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen)を用いて、製品取扱書に基づいて下記のように行った。

- 1. サンプルチューブ内で、パラフィン包埋組織切片に 2ml の Buffer G2 を 380µl を加える。
- 2. 75℃のサーモミキサー内で5分間混和した後に56℃まで冷却し、20µ1の

proteinase Kを加え、56℃のサーモミキサー内で混合しながら終夜分解する。

- 3. サンプルチューブを短時間遠心し、ピペッティングを繰り返してサンプルをホ モジナイズした後、300G で1分間の遠心を行う。
- 上清を EZ1 キット付属の新しい 2ml チューブに移し、抽出機器 EZ1 Advanced XL (Qiagen) にセットし磁性ビーズを用いた DNA 抽出を自動的に行う。

核酸の濃度測定:

核酸の濃度測定は超微量分光光度計である Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)を 用い、製品取り扱い説明書に基づき下記の通り行った。NanoDrop により吸光度の波形 を確認し、260nm の吸光度が 280nm の 1.7~1.9 倍になっていれば(A260/280 が 1.7~ 1.9 であれば)、純度が保たれた核酸が抽出されていることとした。

- 1. Nanodrop1000 ソフトウェアを起動する。
- 2. Nanodrop1000の測定部アーム清拭した後に、2µ1の蒸留水を測定部に乗せる。
- 3. アームを閉じ、sample typeをDNA-50 (二重鎖DNA)と選択する。
- 4. アームを開いて蒸留水を拭き取り、ブランク溶液として1×TE(Invitrogen)2µ1 を乗せ吸光度を測定し、検量線のゼロ点を設定する。
- 5. ブランク溶液を拭き取り、サンプルを乗せ核酸濃度を測定する。
- 測定終了後は測定部を70%エタノール、その後蒸留水で拭い、最後に乾拭きし 次のサンプル測定に移る。

double strand DNA の定量:

dsDNAの定量はQuant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Reagent (Thermo Scientific)を用 い、製品取り扱い説明書に基づき下記の通り行った。

- PicoGreen®原液をTE で 200 倍に希釈し、必要量(100µ1 /ウェル)を 調製する。希釈後の溶液は、アルミホイル等で遮光する。
- 2. 濃度既知の DNA 溶液としてラムダ-DNA、100µg/ml (Invitrogen) を用い、1×TE で 希釈して検量線用標準 DNA を調製する。
- 3. 標準 DNA 濃度と対応するようにサンプル DNA を1×TE で希釈する。
- 4. 96 ウェル平底型黒色ポリスチロールマイクロプレート (Greiner Bio-One) に PicoGreen®溶液を 100µl ずつ分注する。
- 5. 標準 DNA、サンプル DNA を 100µl ずつ添加し、ピペッティングで混和する。
- 6. 室温で5分間インキュベートした後、蛍光測定を行う。

リアルタイム PCR 法による DNA の品質確認:

リアルタイム PCR 法による DNA の品質確認には、LightCycler 480 Ⅱ (Roche Diagnostics)を用いた∠Cp値の測定を用いた。

- 1. DNA サンプルを lng/µl になるように 1×TE を用いて調整する。
- 2. QCT (positive control)を室温で融解させ、10µ1 取り 990µ1 のDW と混合して 100 倍希釈する。negative control にはDW を使用した。
- 3. 2×qPCR マスターミックス(Qiagen) 52ul と DNA サンプル、QCT、DW それぞれ 13µl を混合する。
- 4. それぞれ 20µl ずつ、ABI MicroAmp プレートの各ウェルに分注する。
- 5. 表1の条件でPCR 反応を実行する。

	温度	時間
Denature	95°C	5minutes
PCR (40 サイクル)	95°C	30seconds
	57°C	30seconds
	72°C	3seconds
Melting	95°C	5seconds
	65°C	1minutes
	95°C	Continuous
Cool	50°C	30seconds

表 1. PCR サイクルプログラム

全エクソンシークエンス:

全エクソンシークエンスのための DNA ライブラリー作成、エクソン領域のキャプ チャには、Illumina 社のマルチプレックスペアエンドシークエンスに対応した SureSelect[™] 自動化対応キット(Agilent)を使用した。また、この行程は Agillent SureSelect[™] 自動化システムを利用して行った。全エクソンシークエンスは、 Illumina 社の次世代シークエンサーである HiSeq2000 を用いて 100bp ペアエンドシ ークエンスを行った。

- 1. DNA の断片化:
- 1.5mL LoBind tube を用い、DNA サンプルを1×LowTE Buffer で130µl の容量 になるように調整しマイクロチューブ(M&S Instruments Inc.)に気泡が混入し ないように移し入れる。

- 2) 超音波破砕装置である、CovarisS220 (M&S Instruments Inc.)を起動し、マイ クロチューブをセットしてサンプル DNA を断片化する。
- 3) 断片化したサンプル DNA、AMPure XP ビーズ懸濁液(Beckman Coulter)、nucleasefree water20ml、70% エタノール 45ml を SureSelect^{XI} 自動化システム(Agilent) にセットする。
- 4) 自動化システムにてサンプル DNA と AMPure XP ビーズを混和、攪拌し、ビーズに 結合した DNA を抽出し洗浄、溶出する。
- 2. 断片化された DNA の末端修復:
- SureSelect Automated Library Prep Kit-GA(Agilent)を用い、氷上で末端修復マ スターミックス(表 2)、A オーバーハング付加マスターミックス(表 3)、およびア ダプターライゲーションマスターミックス(表 4)を調整し、よく攪拌する。

SureSelect ^{xT} 試薬	1 カラム中の量
Nuclease free water	448.8 µl
10 × End-repair Buffer	127.5 µl
dNTP mix	20.4 µ1
T4 DNA polymerase	1 2.8 µl
Klenow DNA polymerase	25.5 µl
T4 polynucleotide kinase	28 .1µl
トータル量	663µl
表 2. 末端修復マスターミックスの調整	

SureSelect ^{XT} 試薬	1 カラム中の量
Nuclease free water	187.0µl
10 × Klenow DNA polymerase Buffer	25 .5µ1
dATP	17.0µl
Exo(-) Klenow DNA polymerase	51.0 µl
トータル量	340 µl

表3. Aオーバーハング付加マスターミックスの調整

SureSelect ^{xT} 試薬	1 カラム中の量
Nuclease free water	197.6 µl
5 × T4 DNA Ligase Buffer	1 27.5 µl
SureSelect Adaptor oligo mix	127.5µl
T4 DNA ligase	19.1µl
トータル量	471.7 µl

表 4. アダプターライゲーションマスターミックスの調整

2) DeepWell プレート(Nunc)に、1) で調整したマスターミックスを図1のように分注 する。

	1	2	3	4	5	6	7	8
Α	78 µl	40 µl	55.5µl					
В	78 µl	40 µl	55.5 µl					
С	78 µl	40 µl	55.5µl					
D	78 µl	40 µl	55.5 µl					
Е	78 µl	40 µl	55.5µl					
F	78 µl	40 µl	55.5µl					
G	78 µl	40 µl	55.5 µl					
Н	78 µl	40 µl	55.5 µl					

	Aオーバ	アダプタ
末端修復	ーハング	一ライゲ
マスター	付加マス	ーション
ミックス	ターミック	マスター
	ス	ミックス

図1 マスターミックスソースプレートの位置 枠線は Nunc DeepWell ソースプレートの各ウェルを 表す

- 3) シールした DeepWell プレートを 30 秒間、1000G で遠心し気泡を除く。
- 室温に戻した AMPure XP ビーズ懸濁液(Beckman Coulter)を 370µl ずつ、Nunc DeepWell ソースプレートの使用する各ウェルに分注する。
- 5) 30mlのnuclease-free water をいれたThermo Scientific リザーバーを準備する。
- 6) 150ml の 70% ethanol をいれた Thermo Scientific リザーバーを準備する。
- 7) 3)、4)、5)、6)、②で精製したサンプルDNAをSureSelect^{XT}自動化システム(Agilent)

にセットし、ターゲットエンリッチメントに必要な DNA 末端修飾を自動で行う。

3. アダプター付き DNA ライブラリーの増幅:

 SureSelect Library Prep Kit、SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box #2、Herculase II Fusion DNA Polymerase (いずれ も Agilent)を用いて、Pre-capture PCR マスターミックスを表5のように調整 する。

SureSelect ^{xT} 試薬	1 カラム中の量
Nuclease free water	267 .8µ1
Herculase II 5 × Reaction Buffer	127.5 µl
dNTP mix	6.4 µ1
SureSelect primer (Forward)	15.9µl
SureSelect Indexing Pre-Capture PCR (Reverce) Primer	15.9µl
Herculase II polymetase	1.0µl
トータル量	446.3 µl

表 5. Pre-capture PCR マスターミックスの調整

- DeepWell ソースプレート(Nunc)のカラム4にPre-capture PCR マスターミック スを 57.5µl ずつ分注し、シールした後 30 秒間、1000G で遠心し気泡を除く。
- 3) DNA サンプル、Pre-capture PCR マスターミックスが入った Nunc DeepWell プレ ートを SureSelect[™]自動化システム (Agilent)にセットし、自動混合する。混合 が終了すると PCR マスターミックスと混合されたアダプター付き DNA サンプル は ABI MicroAmp プレートに入った状態で取り出される。
- 4) 30 秒間、1000G で遠心し気泡を除いた後、ABI MicroAmp プレートを Veriti®サー マルサイクラ (Thermo Scientific) にセットし、表 6 の通り PCR 増幅を行う。

セグメント	サイクル数	温度	時間
1	1	98°C	2minutes
2	4~6	98°C	30seconds
		65°C	30seconds
		72°C	1minutes
3	1	72°C	10minutes
4	1	4°C	Hold

表 6. Pre-Capture PCR サイクルプログラム

5) PCR 増幅プログラム終了後、AMPure XP ビーズ懸濁液(Beckman Coulter)、

nuclease-free water、70% エタノールとともに SureSelect^{XT} 自動化システム (Agilent)にセットし、自動でサンプル DNA と AMPure XP ビーズを混和、攪拌 し、ビーズに結合した DNA を抽出し洗浄、溶出する。

- 4. ペアエンドアダプター付き DNA ライブラリとオリゴキャプチャライブラリとの ハイブリダイゼーション
- 1) ABI MicroAmp プレートの各ウェルに3. で精製したペアエンドアダプター付き DNA ライブラリを 750µg ずつ分取する。
- 2) ABI MicroAmp プレートにゴム蓋をし、30 秒間、1000G で遠心し気泡を除く。
- 3) ABI MicroAmp プレートを真空乾燥機へセットし、1時間かけ乾燥させる。
- 4) 乾燥したら、各ウェルに 3. 4µl の nuclease free water を注ぎ、8 連ピペットを 用いてペアエンドアダプター付き DNA ライブラリを十分に溶解する。
- 5) SureSelect^{XT} Automated Hybridization Kit Box #1、および SureSelect^{XT} Automated Hybridization Kit Box #2 (いずれも Agilent)を用い、表7の如く、 Hybridization Buffer マスターミックスを調整する。調整後 65℃で5分加熱し、 沈殿がないことを確認する。その後 25℃に設定したサーモブロックで保管する。

SureSelect ^{xT} 試薬	1カラム中の量
SureSelect Hyb #1	234 µ1
SureSelect Hyb #2	9.4 µl
SureSelect Hyb #3	93.5 µl
SureSelect Hyb #4	15.9µl
SureSelect Indexing Pre-Capture PCR (Reverce) Primer	1 22 µl
トータル量	458.9 µl

表 7. Hybridization Byffer マスターミックスの調整

6) SureSelect^{XT} Automated Hybridization Kit Box #2 (Agilent) を用い、SureSelect Block マスターミックスを表8のように調整する。

SureSelect ^{xT} 試薬	1 カラム中の量
Nuclease-free water	76. 5µl
SureSelect Indexing Block #1	31.9 µl
SureSelect Block #2	31.9 µl
SureSelect Indexing Block #3	7.7µl
 トータル量	1 47.9 µl

表 8. SureSelect Block マスターミックスの調整

7) Capture Library マスターミックスを表9のように調整する。

SureSelect ^{xT} 試薬	1カラム中の量
Nuclease-free water	2 5.5µl
RNase Block	8.5µl
SureSelect Capture Library	85.0 µl
トータル量	119.0µl

表 9. Capture Library マスターミックスの調整

8) 6)、7)を図2のように96ウェル Eppendorf プレートに分注する。

	1	2	3	4	5	6	7	8
А	17.4 µl	14.0 µl						
В	17.4 µl	14.0 µl						
С	17.4 µl	14.0 µl						
D	17.4 µl	14.0 µl						
Е	17.4 µl	14.0 µl						
F	17.4µl	14.0 µl						
G	17.4µl	14.0 µl						
Н	17.4 µl	14.0 µl						

Capture Block マ スターミ ックス ックス

図 2. Hybridization マスターミックスの配置 枠線は 96 ウェル Eppendorf プレートの各ウェルを表す

- 9) 96 ウェル Eppendorf プレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer を用い、 165℃、1.0 秒でシールする。
- 10) DNA ライブラリ、SureSelect Block マスターミックス、Hybridization Buffer マ スターミックス、Capture Library マスターミックス、空の ABI MicroAmp プレ ートを SureSelect^{XT} 自動化システム(Agilent)にセットする。
- 11) SureSelect^{XT} 自動化システム(Agilent)により、Hybridization Buffer マスターミックスと Capture Library マスターミックスが 25℃を保ちながら混合される。
- 12) 11) と同時に DNA ライブラリと SureSelect Block マスターミックスが自動混合さ れる。混合が終了すると、サンプルは ABI MicroAmp プレートに入った状態で取り 出される。

 取り出された ABI MicroAmp プレートを MicroAmp Clear Adhesive Filmを用い てきつくシールし、Veriti®サーマルサイクラ(Thermo Scientific)にセットす る。サーマルサイクラは表 10 のように設定し、ハイブリダイゼーション前のサ ンプル変性を行う。

ステップ	温度		時間	
	1	95°C	5minute	s
	2	65°C	Hole	d

表 10. Hybrdization 前のサンプル変性に 使用するサーマルサイクラプログラム

- 14) サンプル変性後、DNA ライブラリと SureSelect Block マスターミックスが混合 された ABI MicroAmp プレートを、65℃以下に冷めないよう迅速に、SureSelect^{XT} 自動化システム(Agilent)に再度セットする。Hybridization Buffer マスターミ ックスと Capture Library マスターミックスと自動混合する。
- 15) 混合が終了したら、DNA ライブラリの入った ABI MicroAmp プレートを MicroAmp Clear Adhesive Film を用いてきつくシールし、Veriti®サーマルサイクラ (Thermo Scientific)にセットする。サーマルサイクラは65℃に設定し、16時間 かけてハイブリダイゼーションさせる。
- 5. 磁性ビーズによる DNA の回収
- Dynabeads Myone Streptavidin T1 (Invitrogen) 磁性ビーズをボルテックスミ キサでよく混和する。
- コニカルチューブ中で表 11 の如く磁性ビーズと Buffer を混合し、Dynal Magnetic separater (Invitrogen Dynamag-50)のマグネットにコニカルチュー ブをセットして、上清を取り除いて捨てる。この行程を3回繰り返し、磁性ビー ズを洗浄する。

試薬	1 カラム中の量
Dynabeads MyOne Streptavidin T1 ビーズ混濁液	425 µl
SureSelect Binding Buffer	1.7µl
トータル量	2 .1 2 5µl

表 11. 磁性ビーズ洗浄作業で使用する試薬

3) 洗浄した磁性ビーズを 200ul ずつ、DeepWell ソースプレートに DNA ライブラリ

と対応したウェルに入れ、SureSelect^{XT}自動化システム(Agilent)にセットする。

- ⑤で作成した DNA ライブラリの入った ABI MicroAmp プレートをサーマルサイク ラから取り出し、65 度を保ったまま素早く SureSelect^{XT} 自動化システム (Agilent)にセットする。
- 5) 約3時間後、エクソン領域がキャプチャされた DNA ライブラリが Eppendorf プレートに入った状態で取り出される。
- 6. キャプチャライブラリの増幅とインデックスタグの付加
- 1) 表 12 のように氷上でインデックスプライマー希釈液を調整し ABI MicroAmp プレートに分注する。

SureSelect ^{XT} 試薬	インデックス1サンプル中の容量
Nuclease-free water	8.0µ1
Index PCR primer (reverse)	1. 0 µl
トータル量	9.0µ1

表 12. インデックスプライマー希釈液の調整

- 1)のABI MicroAmp プレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer を用い 165℃、1.0秒でシールし、30秒間、1000Gで遠心し氷上に保管する。
- 3) 表13の如くPCRマスターミックスを調整し、よく混和した後に氷上に保管する。

SureSelect ^{xr} 試薬	1 カラム中の量
Nuclease free water	184.9 µl
Herculase II 5 × Reaction Buffer	127.5 µl
dNTP mix	6.4µl
SureSelect Indexing Post-Capture PCR (Forward) Primer	12.8 µl
Herculase II polymetase	1 2.8 µl
トータル量	344.3 µ1

表 13. Post-capture indexing PCR マスターミックスの調整

- 4) 3) で調整した PCR マスターミックスを Nunc DeepWell プレートのカラム4に
 40.5ul ずつ分注し、シールした後に遠心する。
- 5) 2)のインデックスプライマーが入った ABI MicroAmp プレート、4)の PCR マスタ ーミックスが入った Nunc DeepWell プレート、およびエクソン領域がキャプチャ された DNA ライブラリが入った Eppendorf プレートを SureSelect^{XT} 自動化システ

ム(Agilent)にセットする。

- 6) 約15分後、PCRマスターミックスが混合した ABI MicroAmp プレートに入った DNA ライブラリが取り出される。
- 6)をVeriti®サーマルサイクラ(Thermo Scientific)にセットし、PCR 増幅を 行う。PCR 増幅プログラムは表 14 の通り行う。

セグメント	サイクル数	温度	時間
1	1	98°C	2minutes
2	10~16	98°C	30seconds
		57°C	30seconds
		72°C	1minutes
3	1	72°C	10minutes
4	1	4°C	Hold

表 14. Post-Capture PCR サイクルプログラム

- 8) PCR 増幅プログラム終了後、AMPure XP ビーズを用いた DNA の精製を行う。
- 7. 全エクソンシークエンス

調整した DNA ライブラリ、TruSeq Rapid SBS Kit、TruSeq Rapid Paired-End Cluster Kit(いずれも Illumina)を用い、Illumina 社の次世代シークエンサーである HiSeq2000 を用いて 100bp ペアエンドシークエンスを行った。

がん組織由来の体細胞変異の同定:

得られたシークエンス情報から、下記のようにがん細胞由来の体細胞変異を同定 した。

- Burrows-Wheeler Aligner (BWA、http://bio-bwa.sourceforge.net/)²⁹を 用いて、ヒトゲノムリレファレンス配列 GRCh37/hg19 にマッピングする。
- 遺伝子変異同定をより正確にするため、Picard tool kit (http://picard.sourceforge.net) を用いて、DNA ライブラリ作成時の PCR バイアスを考慮した duplicate(全く同じ配列のリード)やクオリティの低いリ ードを除外した。
- 3. SNV および indel の検出には、Genome Analysis ToolKit version 1.6 (GATK、 http://www.broadinstitute.org/gatk/)³⁰を用いた。このソフトウェアによ

り、体細胞変異および生殖細胞変異を含んだ全遺伝子変異を網羅的に検出し た。

- 検出された SNV および indel から、下記のフィルタリングクライテリアを用いて 体細胞変異を絞り込んだ。
 - 1) がん組織においてそれぞれのゲノム上の部位にマッピングされたリード数の 10%以上のリードにより同定されたもの
 - 2) GATK confidence score³⁰が50以上のもの
 - 3) forward、reverse 方向のリードがそれぞれ少なくとも1本以上あるもの
- 5. さらに一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms : SNPs)などの生殖細胞 変異やPCRエラーを除外した。オンライン上のデータベースである 1000genome (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/)、 dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) と、in-house データを利用した SNPs の除外を行った。
- 6. 同一症例の正常組織のシークエンスで得られた遺伝子変異を全てまとめ、癌部の データから除外した。
- 最終的に残った SNV および indel について、Broad Institute の Integrative Genomics Viewer (IGV)を用いてマッピングされたリードを目視確認し、体細胞 変異と同定した。

Gene ontology 解析:

Gene Ontology (GO) とは、遺伝子の生物的プロセス、細胞の構成要素および分子 機能に着目して、遺伝子に付けられるアノテーションであり、ある遺伝子に付けられ た GO を調べることによって、その遺伝子の機能が推定できる。

本検討における GO 解析には National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) によって提供されるオンライン上のデータベースである Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID、 http://david.abcc.ncifcrf.gov)³¹を用いた。

また、本検討では、アミノ酸置換がタンパク質に与える影響を予測するソフトウ ェアである PolyPhen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)³²を用いて、体細 胞変異の中でも特に転写産物の機能に大きな影響を与えていると推測される遺伝子変 異、即ち PolyPhen2 にて"probably damaging"、"possibly damaging"、もしくは

"damaging" と判定されるミスセンス変異を解析対象とした。indel およびナンセンス変異に関しては "probably damaging"として評価し GO 解析の対象とした。

DAVID により P<0.05 と判断される GO を、解析された遺伝子群の中で有意に多く含まれる GO と判断した。

Copy number alterations 解析:

GATK-Depth of Coverage tool および the Exome CNV R package ³³を用い、がん組織、および同一症例の正常組織の depth of the coverage を算出し、対応する領域を比較してその対数比を算出した。 depth of coverage の対数比が 2 を越える領域を、 がん組織で有意な遺伝子の増幅がある領域と判断した。

統計学的事項:

原発巣、転移巣及びFOLFOX療法後の再発巣から検出された体細胞遺伝子変異数と 一塩基置換パターンの比較にはウィルコクソンの符号順位検定を用いた。これらの統 計学的解析は全てMicrosoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation)を用いて 行った。

実験結果

診療録からの症例選択:

国立がん研究センター東病院において、2006年1月から2009年12月の間にステージ III/IV 期大腸がん151 症例に対して根治的な切除が施行され、FOLFOX 療法による 術後補助化学療法が施行されていた。

FOLFOX 療法は、全例で標準的治療である mFOLFOX6 療法、計 12 回施行が計画されて いたが、治療中に画像検査により再発が認められた症例や、不耐性の有害事象発生に より治療中止となった症例を認めた。 FOLFOX 療法施行後の再発は 66 症例で確認さ れ、その内 26 症例で再発巣に対する切除が行われていた。転移・再発臓器の違いが、 がんゲノム情報に影響を及ぼす可能性を考慮し、FOLFOX 療法前後の転移・再発臓器が 同一の症例のみを抽出したところ、14 症例が該当した。切除が他院で行われたため、 国立がん研究センター東病院内に組織検体が保管されておらず利用不可能であった 6 症例を除外し、8 症例を選択した。

DNA 品質評価による症例選択:

該当8症例のFFPEから全エクソンシークエンスが可能なDNAが十分量抽出できているか、DNAの定量を行った。該当8症例の原発巣、転移巣及びFOLFOX療法後の再発巣と、各症例の正常大腸組織から抽出したDNAサンプルにおける、核酸濃度とdsDNAの定量結果を表15に記す。

症例番号	組織検体	臓器	液量(ul)	核酸濃度(ng/ul)	A260/280	dsDNA 濃度(ng/ul)	dsDNA 収量(ng)
	原発巣	S 状結腸	157.5	20.0	1.64	4.4	693.0
1	転移巣	肝	177.5	24.4	1.52	5.9	1047.3
	再発巣	肝	145.0	14.8	1.41	3.3	478.5
	正常組織	S 状結腸	99.0	176.1	1.90	12.6	1243.5
	原発巣	直腸Rs	68.0	27.2	1.54	10.6	720.8
0	転移巣	肝	138.0	20.3	1.46	7.4	1021.2
2	再発巣	肝	50.0	8.1	1.16	5.3	265.0
	正常組織	直腸Rs	99.0	142.2	1.91	13.8	1370.9
	原発巣	直腸Rs	147.0	51.4	1.67	11.6	1705.2
2	転移巣	肝	149.0	64.0	1.70	21.4	3188.6
5	再発巣	肝	139.0	57.9	1.73	16.5	2293.5
	正常組織	直腸Rs	49.0	174.7	1.87	6.4	312.3
	原発巣	直腸Rb	178.0	44.3	1.65	13.4	2385.2
4	転移巣	肺	178.0	42.6	1.66	12.2	2171.6
4	再発巣	肺	138.0	41.9	1.65	14.6	2014.8
	正常組織	直腸Rb	99.0	99.3	1.82	6.6	657.6
	原発巣	上行結腸	150.0	9.8	1.30	3.7	555.0
F	転移巣	肝	148.0	31.7	1.59	4.1	606.8
5	再発巣	肝	95.0	1.4	0.42	1.1	104.5
	正常組織	上行結腸	99.0	151.6	1.83	9.0	889.9
	原発巣	直腸Ra	158.0	40.8	1.64	9.1	1437.0
c	転移巣	軟部組織	70.0	1.5	0.59	1.0	70.0
0	再発巣	軟部組織	80.0	1.0	0.64	2.0	160.0
	正常組織	直腸Ra	99.0	183.9	1.91	15.7	1556.2
	原発巣	直腸Rs	178.0	33.2	1.58	8.3	1477.4
7	転移巣	肺	145.0	16.5	1.38	5.0	725.0
/	再発巣	肺	120.0	5.3	0.93	0.9	108.0
	正常組織	直腸Rs	99.0	105.5	1.83	11.3	1123.6
	原発巣	S 状結腸	157.5	23.6	1.67	3.7	582.8
0	転移巣	肺	125.0	6.7	1.20	2.4	300.0
°	再発巣	肺	60.0	9.4	1.37	1.4	84.0
	正常組織	S 状結腸	99.0	163.4	1.89	17.3	1717.4

表 15. 核酸および dsDNA 定量結果

症例 6 の転移巣、および症例 5、6、7 の再発巣から抽出した DNA サンプルでは A260/280 値が極端に低値であった。また、dsDNA が 200-300ng 程度確保できれば本研究の実験 方法に基づいた全エクソンシークエンスが可能と考えられたが、これらのサンプル、 および症例 8 の再発巣からの抽出 DNA サンプルにはいずれも 100ng 程度の dsDNA しか 含まれておらず解析から除外することとした。

これらの計5病変ついては、再度FFPEからDNAの再抽出を行うこととした。FFPEの取り寄せに時間を要した症例6の再発巣を除く、その他の組織から抽出した核酸およびdsDNAの定量結果を表16に示す。

組織	液量	核酸濃度	A260/280	dsDNA 濃度	dsDNA 収量	dsDNA/核酸比
	(ul)	(ng/ul)		(ng∕ul)	(ng)	(%)
症例5 再発巣	96.5	91.4	1.8	3.0	292.0	3.3
症例6 転移巣	96.5	107.8	1.9	3.0	285.7	2.7
症例7 再発巣	96.5	163.5	1.8	4.5	438.2	2.8
症例8 再発巣	96.5	103.3	1.9	2.7	256.1	2.6

表 16. 核酸および dsDNA 定量結果(再抽出)

dsDNA/核酸比は全組織で10%を下回り、1000ng以上のdsDNAを採取するに十分と考 えられる組織量を用いたにも関わらず、dsDNA 収量は250-440ug 程度に留まった。こ のことから、FFPE 検体内でのDNA の断片化、分解が強く進んでいると考えられた。

再抽出した DNA の品質確認を目的とし、リアルタイム PCR 法にて∠Cp 値を測定した。positive control と比較した∠Cp 値がいずれのサンプルでも明らかに低値であり、これらの再抽出した DNA サンプルでは今後の DNA ライブラリ調整にあたり十分な PCR 反応が期待できないと判断した(表 17)。FFPE 検体内での DNA 分解が進んでいるの であれば、再抽出を繰り返しても高品質の DNA 抽出は不可能であるため、症例 5、6、7、8 は解析から除外することとした。症例 6 が解析対象外となったため、症例 6 の再発巣からは DNA の再抽出は行わなかった。

冬日冬季		⊿Cp 值					
术且栉政	Cp 值	Cp 値	(最大值-最小值)	Cp 值 平均	⊿Cr	∠Cp to control	
广 例 5 百	23.16						
企内して	23.16	0.04	<0.5	23.15	-4.70	-5<⊿Cp<5	
元未	23.12						
庁 例 6 転	23.48						
症例6 転 我崩	23.47	0.01	<0.5	23.47	-5.03	⊿Cp≦-5	
197	[*] 23.47						
症例7再 登単	27.11						
	27.12	0.03	<0.5	27.12	-8.68	⊿ Cp≦-5	
元未	27.14						
広向の市	25.31						
1111例 0 円 222 岡	25.29	0.16	<0.5	25.25	-6.81	⊿Cp≦-5	
光未	25.15						
	18.46						
Posi	18.44	0.3	<0.5	18.44	0.00	-5<⊿Cp<5	
	18.43						
	35.00						
Nega	35.00	0	<0.5	35.00	-16.56	⊿Cp≦-5	
	35.00						

表 17. ⊿Cp值 測定結果

対象患者背景:

診療情報録から抽出した該当8症例のうち、最終的に十分なdsDNAが利用可能と判断されたその他の4症例、16検体からの抽出DNAを用いて、DNAライブラリーの調整および全エクソンシークエンスを行うこととした。解析に用いた4症例の臨床背景を表18に示す。

中间			主た病理	百杂	南二 52	FOLFOX	無増悪生	FOLFOX 療法最終
亚口	年齢	性		示尤 →□/⊥	半ム作夕	療法施行	存期間	日から再発までの
奋亏		和極空	理 部位 顺奋	サイクル	(日)	日数(日)		
	60	Ħ	中分化型	S状	ят	Α	07	16
1 69	艻	腺癌	結腸	ߍ	4	57	-10	
0	0 00	ш	高分化型	直腸	ат	0	100	00
2 68	カ	腺癌	Rs	ЯΤ	9	109	-00	
2	64	+-	中分化型	直腸	RT.	11	220	120
3	3 64	X	腺癌	Rs	ЯŦ		320	120
4 68	60		高分化型	直腸	n+-	10	EEC	064
	女	腺癌	Rb	դր	IZ	000	204	

表 18. 患者背景

全エクソンシークエンス結果:

腫瘍組織の depth of coverage は平均 124×であり、10%の変異頻度で存在する SNV および indel を検出するのに十分な depth of coverage が得られているものと判断し た。また、同一症例の腫瘍組織での depth of coverage に差はなく、体細胞変異数を 比較する際に depth of coverage の影響は無視できるものと考えた。(表 19)

库例				Depth of	30 リード以上が
亚网		総リード数	マッピンクリート致	coverage	マッピングされた
借丂			(%)	(×)	領域(%)
1	原発巣	129688354	117280277(90)	107	88
	転移巣	155911639	146120828(94)	133	92
	再発巣	139140040	130679237(94)	120	90
	正常大腸組織	79896452	67706003(85)	63	73
2	原発巣	134836510	125840818(93)	116	90
	転移巣	162944490	153056513(94)	138	93
	再発巣	151797377	142228257(94)	131	93
	正常大腸組織	66644389	55677492(84)	52	64
3	原発巣	110537232	99867931(90)	90	89
	転移巣	122293726	103284130(84)	92	87
	再発巣	159538251	120242373(75)	96	92
	正常大腸組織	93750792	62725539(67)	57	70
4	原発巣	191365912	179461845(94)	154	96
	転移巣	190768908	177500885(93)	155	95
	再発巣	188543254	180997406(96)	151	96
	正常大腸組織	104084725	84818452(81)	77	81
	平均(腫瘍組織)	153113808	139713375	124	92
	平均(正常組織)	86094090	67731872	62	72

表 19. depth of coverage

がん組織由来の体細胞遺伝子変異の絞込み:

検出された全遺伝子変異から、実験方法に記載した方法でがん組織由来の体細胞性 変異の絞込みを行った。検出された遺伝子変異の内、大多数が既知の SNP として除外 された。最終的ながん組織固有の体細胞変異数を表 21、22、23 に示す。SNV と indel を合わせた体細胞変異数、SNV のうちアミノ酸置換をもたらす non-synonymous 変異と 変化しない synonymous 変異の比率は、これまでに報告されている大腸がんの全エク ソンシークエンス結果^{6 28 34} と矛盾せず、妥当な数値と判断した。

			フィルタリングク		正常組織との比較によ
症例 番号		検出総数	ライテリアによる 絞込み	SNPナータヘース による絞込み	る絞込み (=体細胞変異数)
		(個)	(個)	(個)	(個)
	原発巣	27172	24015	329	107
1	転移巣	27282	23901	340	124
	再発巣	27411	24119	355	130
	原発巣	27362	25213	428	163
2	転移巣	27423	25235	439	175
	再発巣	27299	25218	494	230
	原発巣	26839	23948	299	67
3	転移巣	26892	24262	305	72
	再発巣	26679	23878	311	95
	原発巣	27190	14586	351	125
4	転移巣	27414	24795	342	119
	再発巣	27194	24647	364	138

表 20. 体細胞性変異の絞込み: SNV

			フィルタリングク	SNDデータベーフ	正営組織とのと訪にと
症例		検出総数	ライテリアによる		
番号			絞込み	ーよる教込み	৯গ্যেত্র্বস
		(個)	(個)	(個)	(=体細胞変異数)
	原発巣	742	668	10	4
1	転移巣	752	663	12	5
	再発巣	783	675	8	4
	原発巣	842	732	14	11
2	転移巣	841	716	13	9
	再発巣	842	724	18	13
	原発巣	770	672	10	4
3	転移巣	809	707	8	6
	再発巣	774	678	9	6
	原発巣	758	669	11	8
4	転移巣	795	672	16	9
	再発巣	800	684	14	9

表 21. 体細胞性変異の絞込み: indel

症例番号		SNV 総数	non-synonymous 変異数(%)	synonymous 変異数(%)
	原発巣	107	80(74.8)	27(25.2)
1	転移巣	124	89(71.8)	35(28.2)
	再発巣	130	93(71.5)	37(28.5)
	原発巣	163	104(63.8)	59(36.2)
2	転移巣	175	118(67.4)	57(32.6)
	再発巣	230	146(63.5)	84(36.5)
	原発巣	67	37(55.2)	30(44.8)
3	転移巣	72	42(58.3)	30(41.7)
	再発巣	95	56(58.9)	39(41.1)
	原発巣	125	79(63.2)	46(36.8)
4	転移巣	119	81(68.1)	38(31.9)
	再発巣	138	93(67.4)	45(32.6)

表 22. SNVにおける synonymous/non-synonymous 変異

体細胞遺伝子変異数の比較:

FOLFOX 療法により新たな遺伝子変異が導入されるのであれば、FOLFOX 療法施行後の再発巣では、それ以前の病変に比し体細胞変異数が増加していると考えられる。そこで我々は、原発巣、転移巣及び再発巣での体細胞変異数を比較した。結果、原発巣よりも転移巣、転移巣よりも再発巣でより多くの体細胞変異が検出される傾向がみられたが、統計学的な有意差は見られなかった(Wilcoxon signed rank test P > 0.05)。(図 3)



図3. 体細胞変異数の比較: 4 症例の原発巣、転移巣、および FOLFOX 療法後の再発巣について、体細胞 変異数の最大値、最小値、中央値、並びに 25/75 パーセンタイル値を示す。いずれも統計学的な有意 差は見られなかった(P>0.05)

一塩基置換パターンの比較:

過去の *in vitro* の検討では、oxaliplatin に暴露された細胞では、C>A/G>T、もし くは T>A/A>T の transversion 変異が特徴的に増加すると報告²⁵されている。また、 oxaliplatin を含む白金製剤の架橋形成により、C>A/G>T 変異は、CpC/GpG 配列により 多く誘導されることが示されている³⁵。

oxaliplatin が再発巣のがんゲノムに遺伝子変異を導入するのであれば、FOLFOX 療 法後の再発巣で見られる遺伝子変異の一塩基置換パターンは上述した特徴を有してい ると考えられる。そこで一塩基置換パターンを FOLFOX 療法の前後の病変で比較し、 FOLFOX 療法後の再発巣で C>A/G>T、もしくは T>A/A>T の transversion 変異が増加し ているか検討した。

各病変で検出された SNV における、一塩基置換パターンの比率を図4に示す。いず れの病変でも C>T/G>A の transition 変異が最多(46-72%)であった。FOLFOX 療法後の 再発巣で検出された一塩基置換パターンは同一症例の原発巣、転移巣と同一であり、 oxaliplatin により誘導されると考えられる C>A/G>T、T>A/A>T の transversion 変異 の増加は認められなかった。



図 4. 一塩基置換パターンの比較:全 SNV

次に FOLFOX 療法により導入された可能性がある、FOLFOX 療法後の再発巣でのみ検 出される遺伝子変異(再発巣の unique 変異)を抽出し、CpC/GpG 配列における C>A /G>T 変異が増加しているかを検討した。しかし、同一症例における原発巣、転移巣それぞ れの unique 変異と比較して統計学的有意差はみられなかった(Wilcoxon signed rank test、原発巣 vs 再発巣 P=0.72、転移巣 vs 再発巣 P=0.42、図 5)



図 5. 塩基置換パターンの比較 : unique 変異を対象とした前後を含めた 3 塩基配列での比較

CNAs の比較:

術後 FOLFOX 療法が CNAs を誘導するか検討するため、再発巣でみられる CNAs を同 一症例の原発巣、FOLFOX 療法前の転移巣と比較した。各症例での原発巣、転移巣、再 発巣のそれぞれと、正常組織の depth of coverage の対数比をグラフ化したものを図 6 に示す。

症例3の再発巣では、7q21、10q22、および10q23で正常大腸組織でのdepth of coverage との対数比が2を越えており、この領域では遺伝子の増幅があると判断した。同領域は症例3の原発巣、転移巣でも同様に増幅していた。同領域に含まれる遺伝子については表23に列挙する。症例3の他の領域および症例1、2、4では、原発巣、転移巣、再発巣のいずれでも正常大腸組織のdepth of coverage との対数比が0-2以内であり、明らかな遺伝子の増幅、減失はないものと考えられた。4症例の全てで原発巣、転移巣、再発巣のグラフは一致しており、再発巣のCNAsは同一症例の原発巣及びFOLFOX療法施行前の転移巣と同一であった。



図 6. CNAs の比較: 横軸にゲノム上の位置を、縦軸にがん組織のコピー数と対応領域の正常 組織との対数比で示す。対数比≧2を有意な遺伝子の増幅とした。

				原発巣
chromosome	start	end	ratio	遺伝子名
abr7(x21.12)	06460107	97705047	2.69	BC035377 TP53TG1 ABCB4 ABCB1 SLC25A40 DMTF1
GHF7(q21,12)	00400197	67705047		DBF4 KIAA1324L CROT RUNDC3B TMEM243
aby7(~01.12_				MTERF AKAP9 ANKIB1 RBM48 GATAD1 LRRD1 KRIT1
crir/(q21,13)	90584968	92463045	2.66	ERVW-1 PEX1 CYP51A1 AL133568 MGC16142
qz1.z)				FAM133B
chr10(q22,3)	80285107	81115142	4.09	ZMIZ1-ASI ZMIZ1 BC128552 AX747983
				AK302451 EIF5AL1 SFTPA1 SFTPA2 BEND3P3
chr10(q22,3-	01140000	92005675	2 0 2	DQ586890 AX747158 LOC642361 LOC100288974
q 2 3.1)	01142023	82005075	2.03	MBL1P SFTPD TME254 TME254-AS1 PLAC9 ANXA11
				LINC00857
chr10(q23,1)	82012430	82348687	2.99	MAT1A DYDC1 DYDC2 FAM213A TSPAN14
abr(a22.1)	01100066	00070000	2.02	U6 GHITM RGR BC051760 C10orf99 CDHR1 LRIT2
chr10(q23,1)	04490200	002/0303	Ζ.9Ζ	LRRC21 LINC00858 DD413707

表 23. 症例 3 で増幅がみられる遺伝子: 原発巣

chromosome	start	end	ratio	遺伝子名		
chr7(q21,11)	81328341	84751276	2.18	AK055932 PCLO SEMA3E SEMA3A BX647900		
chr7(q21,12)	06460107	97705047	4.00	BC035377 TP53TG1 ABCB4 ABCB1 SLC25A40		
	00400197	87705047	4.00	DMTF1 DBF4 KIAA1324L CROT RUNDC3B TMEM243		
ahr7(a2112-				MTERF AKAP9 ANKIB1 RBM48 GATAD1 LRRD1		
a^{21} 2	90584968	92463045	3.92	KRIT1 ERVW-1 PEX1 CYP51A1 AL133568 MGC16142		
Υ Ζ Τ.Ζ/				FAM133B		
			4.31	ZMIZ1AS1 ZMIZ1 BC128552 AX747983 PPIF ZCCHC24		
abr10(a222-				AK302451 EIF5AL SFTPA2 SFTPA1 BEND3P3		
$\frac{2}{2}$	80285107	82005675		AX747158 DQ586890 LOC642361 LOC100288974		
yz3.1)				MBL1P SFTPD TMEM254-AS1 TMEM254 PLAC9		
				ANXA11		
chr10(q23,1)	82012430	82348687	4.17	MAT1A DYDC1 DYDC2 FAM213A TSPAN14		
abr10(a22.1)	01100066	00070000	4 16	U6 GHITM RGR BC051760 C10orf99 CDHR1 LRIT2		
chr10(q23,1)	04490200	002/0303	4.10	LRRC21 LINC00858 DD413707		

表 24. 症例3で増幅がみられる遺伝子:転移巣

	FOLFOX 療法後の再発巣						
chromosome	start	end	ratio	遺伝子名			
chr7(q21,11)	81328341	84751276	2.49	AK055932 PCLO SEMA3E SEMA3A BX647900			
	00400107	07705047	4.40	BC035377 TP53TG1 ABCB4 ABCB1 SLC25A40 DMTF1			
chr/(q21,12)	86468197	87705047	4.42	DBF4 KIAA1324L CROT RUNDC3B TMEM243			
L 7(01 10				MTERF AKAP9 ANKIB1 RBM48 GATAD1 LRRD1 KRIT1			
cnr/(q21,13-	90584968	92463045	4.30	ERVW-1 PEX1 CYP51A1 AL133568 MGC16142			
q21.2)				FAM133B			
				ZMIZ1AS1 ZMIZ1 BC128552 AX747983 PPIF ZCCHC24			
abr10(a222-				AK302451 EIF5AL SFTPA2 SFTPA1 BEND3P3			
$\frac{2}{2}$	80285107	82348687	4.53	AX747158 DQ586890 LOC642361 LOC100288974			
yz3.1)				MBL1P SFTPD TMEM254-AS1 TMEM254 PLAC9			
				ANXA11 DYDC1 DYDC2 FAM213A TSPAN14			
abr10(a22.1)	01100066	06070000	4.62	U6 GHITM RGR BC051760 C10orf99 CDHR1 LRIT2			
cnr10(q23,1)	04490200	80278303	4.03	LRRC21 LINC00858 DD413707			

表 25. 症例 3 で増幅がみられる遺伝子: FOLFOX 療法後の再発巣

変異遺伝子の比較:

同一症例の原発巣、転移巣、再発巣において、検出された体細胞変異遺伝子を比較 すると、検討した4症例の全てで相違がみられた。

同一症例において、原発巣、転移巣及び再発巣の3病変全てに共通して検出される 体細胞変異を common 変異、2病変で検出されるものを shared 変異、1病変のみで検 出されるものを unique 変異と定義し、分類した結果を表 26 に示す。検出された体細 胞変異は common 変異が最多であり、多くの遺伝子変異が原発巣、転移巣及び再発巣で 共通していた。その一方、FOLFOX 療法後の再発巣から検出される体細胞変異のうち、 9.5-52.3% (症例1で14.2%、症例2で52.3%、 症例3で24.8%、症例4で9.5%)の 体細胞変異は、同一症例の原発巣及び転移巣から検出されなかった。一検体から検出 される体細胞変異の総数に占める unique 変異の割合は再発巣でより増加する傾向に あった。

	症例	common 変異数(%)	shared 変異数(%)			unique 変異数(%)	体細胞変異数(%)
			原発巣−	原発巣−	転移巣−		
			転移巣	再発巣	再発巣		
1	原発巣	99(89.2)	7(6.3)	4(3.6)	-	1(0.9)	111(100)
	転移巣	99(76.7)	7(5.4)	-	12(9.3)	11(8.5)	129(100)
	再発巣	99(73.9)	-	4(3.0)	12(9.0)	19(14.2)	134(100)
2	原発巣	98(56.3)	30(17.2)	9(5.2)	-	37(21.3)	174(100)
	転移巣	98(53.3)	30(16.3)	-	9(4.9)	47(25.5)	184(100)
	再発巣	98(40.3)	-	9(3.7)	9(3.7)	127(52.3)	243(100)
3	原発巣	63(88.7)	3(4.2)	3(4.2)	-	2(2.8)	71(100)
	転移巣	63(80.8)	3(3.8)	-	10(12.8)	2(2.6)	78(100)
	再発巣	63(62.4)	-	3(3.0)	10(8.9)	25(24.8)	101(100)
4	原発巣	105(78.9)	5(3.8)	11(8.3)	-	12(9.0)	133(100)
	転移巣	105(82.0)	5(3.9)	-	17(13.3)	1(0.8)	128(100)
	再発巣	105(71.4)	_	11(7.5)	17(11.6)	14(9.5)	147(100)

表 26.変異遺伝子の比較

Mut-Driver 遺伝子変異の比較:

Vogelsteinらは遺伝子変異によって発がんのドライバーとなり得る遺伝子をMut-Driver 遺伝子と定義し、125種の遺伝子がこれに該当すると提唱している³⁴。これら の遺伝子に着目し、原発巣、転移巣及び再発巣で比較した結果を表27に示す。

我々が検討した4症例においては、125種のMut-Driver遺伝子のうち、14種の遺伝 子に変異を認めた。大腸がんにおいて変異頻度が高いAPC、 KRAS、 FBXW7、 TP53、 および PIK3CAにおいては、同一症例の原発巣、転移巣及び再発巣で高率に同じ体細 胞変異を有していた。症例2においては、原発巣と転移巣でPIK3CA遺伝子 E542Kおよ びE88Q変異を認めたが、FOLFOX療法後の再発巣ではこれらの体細胞変異は検出されな かった。その一方、再発巣ではPIK3CAと同じPI3K-AKT経路に位置するMut-Driver 遺 伝子である、AKTJ遺伝子に変異を認めた。

		症例1			症例2			症例3			症例4	
	原発巣	転移巣	FOLFOX 療法後の 再発巣	原発巣	転移巣	FOLFOX 療法後の 再発巣	原発巣	転移巣	FOLFOX 療法後の 再発巣	原発巣	転移巣	FOLFOX 療法後の 再発巣
APC	R232*	R232*	R232*									
FBXW7				H342N H460N H380N	H342N H460N H380N	H342N H460N H380N						
TP53	A159P	A159P	A159P				R158G	R158G	R158G	H179R	H179R	H179R
KRAS	G12D	G12D	G12D	A146V	A146V	A146V	G12V	G12V	G12V	G12D	G12D	G12D
PIK3CA	Q546R	Q546R	Q546R	R88Q E542K	R88Q E542K							
AKT1						E17K						
MLL2				R3491H	R3491H	R3491H						
MLL3	D348N	D348N	D348N									
BRCA2		S2373N										
SMARCA4	R1203H	R1203H	R1203H									
CDKN2A				R80* P94L								
EP300						P708S						
MED12						S476F						
RUNX1												S448*

表 27. Mut-Driver 遺伝子の比較

common 変異

shared 変異

unique 変異

Gene Ontology(GO)解析:

再発巣のがんゲノム情報はFOLFOX療法への耐性機構を反映している可能性がある ことから、各症例の再発巣のみで検出されるunique変異のGene Ontologyに着目し、 FOLFOX療法への耐性メカニズムとの関連を検討した。

本解析では、アミノ酸置換がタンパク質に与える影響を予測するソフトウェアで あるPolyphen2³²を用い、unique変異の中でも特に転写産物の機能に大きな影響を与 えていると推測される遺伝子変異を有しているSNV、およびindelを抽出して解析を行 った。結果、4症例の再発巣から検出された計185個のunique変異の内、ナンセンス変 異7個、Polyphen2にて"damaging"、"possibly damaging"、および "probably damaging"と判定されたミスセンス変異51個、indel 7個の計65個の体細胞遺伝子変 異を抽出しG0解析を行った。(表28)

症例番号	遺伝子名	アミノ酸変異		POLYPHEN スコア
1	ATG2A	A1885T	1	PROBABLY DAMAGING
1	CACNA1E	R1182C,R1182C,R1163C	1	PROBABLY DAMAGING
1	CSPG4	R477H	0.513	POSSIBLY DAMAGING
1	IGLON5	R237C	1	PROBABLY DAMAGING
1	OR2T11	I46T	0.994	PROBABLY DAMAGING
1	OR2T11	I46L	0.987	PROBABLY DAMAGING
2	AFF2	P882L,P849L,P523L	1	PROBABLY DAMAGING
2	AKAP3	D712Y	0.999	PROBABLY DAMAGING
2	AKT1	Е17К	1	PROBABLY DAMAGING
2	BCLAF1	S205L,S203L,S205L	0.879	POSSIBLY DAMAGING
2	C1orf129	A398V,A398V	0.725	POSSIBLY DAMAGING
2	C1QB	T196I	0.998	PROBABLY DAMAGING
2	CAPN7	A14T	1	PROBABLY DAMAGING
2	CCDC108	V1232M	0.994	PROBABLY DAMAGING
2	CD177	N222T	0.972	PROBABLY DAMAGING
2	CDH9	D592N	0.999	PROBABLY DAMAGING
2	COL22A1	P1581H	1	PROBABLY DAMAGING
2	DDI1	Q264H	1	PROBABLY DAMAGING
2	DOCK1	E1693del	-	Deletion
2	DQX1	Q173*	-	Nonsense
2	FRMD7	P482H	1	PROBABLY DAMAGING
2	HIST2H2AB	H124fs	_	Deletion

2	HIVEP2	R882W	1	PROBABLY DAMAGING
2	IQCH	E35Q,E35Q	0.993	PROBABLY DAMAGING
2	IQSEC1	R776Q	1	PROBABLY DAMAGING
2	KIF1A	R1571Q	1	PROBABLY DAMAGING
2	MED12	S476F	0.603	POSSIBLY DAMAGING
2	MPEG1	T148I	1	PROBABLY DAMAGING
2	MUC19	K50fs	-	Deletion
2	NLGN4X	G271C	1	PROBABLY DAMAGING
2	NUSAP1	E7Q,E7Q,E7Q	1	PROBABLY DAMAGING
2	ODZ4	E2270Q	0.935	POSSIBLY DAMAGING
2	PASD1	Q533H	0.991	PROBABLY DAMAGING
2	PCDH17	R203H	1	PROBABLY DAMAGING
2	PTPRJ	L738V	1	PROBABLY DAMAGING
2	RASD2	D107N	0.781	POSSIBLY DAMAGING
2	RASSF7	C73Y,C73Y,C73Y	0.876	POSSIBLY DAMAGING
2	RICTOR	G798E	0.994	PROBABLY DAMAGING
2	RXRB	G327fs	-	Deletion
2	SH3RF3	R225C	1	PROBABLY DAMAGING
2	SLC24A6	G502D	1	PROBABLY DAMAGING
2	SLITRK3	R477*	-	Nonsense
2	SLITRK6	N818fs	-	Deletion
2	ST6GAL2	R256W,R256W	0.534	POSSIBLY DAMAGING
2	TBC1D9	P350L	0.97	PROBABLY DAMAGING
2	TMEM132C	S1028*	-	Nonsense
2	TRPM7	H363N	0.988	PROBABLY DAMAGING
2	TRPV5	Q128H	0.998	PROBABLY DAMAGING
2	UBR5	E389*	-	Nonsense
2	ZNF560	R750C	1	PROBABLY DAMAGING
3	CDC20B	A360fs,A360fs,A360fs	-	Insertion
3	DEDD	E15K	0.993	PROBABLY DAMAGING
3	LRTM2	A336V	1	PROBABLY DAMAGING
3	PCDHA9	L805*	-	Nonsense
3	PDZD2	T668M	1	PROBABLY DAMAGING
3	PLCB3	R137Q,R204Q	0.831	POSSIBLY DAMAGING
3	SEMA5B	C172R	1	PROBABLY DAMAGING

3	VPS13B	S941A,S941A	0.994	PROBABLY DAMAGING
4	DOC2A	E214D	0.974	PROBABLY DAMAGING
4	JPH3	P144_A145insAAA,C16_L17insLLL	-	Insertion
4	PDE1C	A668T,A728T	0.999	PROBABLY DAMAGING
4	RUNX1	S448*	-	Nonsense
4	TBC1D12	R705*	-	Nonsense
4	TDRD6	V86M,V86M	1	PROBABLY DAMAGING
4	TLR8	R338H	0.982	PROBABLY DAMAGING

表.28 GO解析に用いた体細胞変異一覧

症例間で共通した遺伝子変異はみられなかったが、"cell adhesion" "GTPaseregulator activity" "calcium ion transport" "calcium ion binding"の4種のGO を持つ遺伝子が再発巣に特異的なunique変異に有意に多く含まれていることが明らか となった。これは、原発巣、転移巣のunique変異ではみられない特徴であった(表 29)。

	Corres Orthology	遺伝子名			
	Gene Untology	症例 1	症例 2	症例3	症例 4
原発巣	GO:0006355~ regulation of transcription, DNA-dependent		CDKN2A IRX3 TULP4 SP2 ZNF675 TCF15	MAPK8IP1	HOXA3
	GO:0006469~ negative regulation of protein kinase activity		CDKN2A ZNF675	MAPK8IP1	
転移巣	GO:0007283~ Spermatogenesis	BRCA2 MORC1	CYLC1 MAST2		
	GO:0005856~ Cytoskeleton	BRCA2 KRTAP4-1	CYLC1 MAST2 INA RBM39		
FOLFOX 療法 後の 再発巣	GO:0007155 [~] cell adhesion		CDH9 TRPM7 COL22A1 NLGN4X PCDH17	PCDHA9 PDZD2	
	GO:0030695~ GTPase regulator activity		DOCK1 TBC1D9 RICTOR IQSEC1		TBC1D12
	GO:0006816~ calciumion transport	CACNA1E	TRPM7 TRPV5 SLC24A6		JPH3
	GO:0005509~ calcium ion binding	CACNA1E	CDH9 TRPM7 TBC1D9 TRPV5 SLC24A6 PCDH17	PDCHA9 PLCB3	DOC2A RUNX1

表 29. Gene Ontology の比較

今回我々は、同一症例の大腸がん原発巣、転移巣及びFOLFOX療法による術後補助 化学療法後に出現した再発巣から抽出したDNAを用いて全エクソンシークエンスを行 い、体細胞変異を比較することで、FOLFOX療法が再発大腸がんゲノムに与える影響を 検討した。本検討は、FOLFOX療法と大腸がんゲノム変化の関連を詳細に検討した世界 初の報告である。

原発巣及び転移巣と比較して、FOLFOX療法後の再発巣において体細胞変異数の有 意な増加はみられなかった。また、再発巣から検出された体細胞変異の一塩基置換パ ターンは原発巣及び転移巣と比較して変化がみられず、FOLFOX療法投与後にも関わら ずoxaliplatinによる遺伝子変異に特徴的なG>T/C>A, A>T/T>Aのtransversion変異の 増加^{25,35}を認めなかった。CNAsについても原発巣、転移巣及び再発巣で変化がみられ なかった。このように我々の研究結果からは、術後補助化学療法としてのFOLFOX療法 による再発大腸がんゲノムへの新たな変異導入は示されなかった。

しかしながら、今回の我々の検討結果とは相反して、過去の培養細胞実験系による 研究では oxaliplatin による変異原性が示されている。この理由として *in vitro* で の実験系と生体内では、大腸がん細胞が暴露される oxaliplatin の濃度が異なってい ることが考えられる。Silva らは CHO-K1 細胞株を 10-40 μ M の oxaliplatin に暴露す ることで、G>T/C>A, A>T/T>A の transversion 変異を特徴とする遺伝子変異が誘導さ れ、かつ用量依存的に遺伝子変異頻度が上昇することを示している ²⁵。一方、本検討 の対象となった4 症例では FOLFOX 療法として oxaliplatin が 85 mg/m² で投与されて いるが、既報では同用量で oxaliplatin が投与された際の最高血中濃度 (maximum drug concentration : Cmax) は 3.6 μ M であったと報告されている ³⁶。薬物動態に個人差が 存在するとしても、本検討の4 症例における oxaliplatin の Cmax は *in vitro* の検討 で変異原性を示した濃度を下回っていることが想定され、このことが FOLFOX 療法後 の再発巣であっても oxaliplatin による遺伝子変異導入がみられない一因と推察され た。

本検討の問題点として4 症例という限られた症例数であり十分な統計学的解析が行 えていない可能性がある。少ない症例数の要因として、大腸がんの転移巣の切除の後、 さらにその後の再発巣へも再切除が行われた症例を対象としたが該当する症例が少数 であったこと、さらに FOLFOX 療法前後で同一の臓器に転移・再発を来たした症例のみ を対象としたことが挙げられる。ただ、近年では遠隔転移の切除により長期生存が得 られるとの報告が増加している^{20 21}。本研究の対象に該当する症例が増加し、更なる 検討が行われることが期待される。

oxaliplatinによる再発巣への遺伝子変異導入は否定的であった一方で、大腸がん 原発巣、転移巣及び再発巣から検出される体細胞変異の相違が存在し、一例として原 発巣や転移巣には見られないにも関わらず再発巣でのみ検出されるunique変異が存在 した。このことを説明し得る理論背景として、Sottorivaらが提唱する大腸がんの発 がんモデルである"ビッグバン・モデル""に着目した。大腸がんでは、一つの腫瘍 内に異なる遺伝子変異を有する多数のサブクローンが混在する腫瘍内不均一性 (intra-tumor heterogenighty: ITH) が存在すること知られている³⁸。"ビッグバ ン・モデル"では、発がんの極めて初期に起こる1回の爆厳的な事象で、各々異なる 体細胞変異を有する多彩なサブクローンが生じ、それらが混在したまま増殖すること によりITHがもたらされるとしている。さらに、ITHの存在下で抗腫瘍効果を有する薬 剤に曝されると、薬剤に耐え得るサブクローンのみが選択的に増殖していくため、化 学療法により腫瘍を構成するサブクローンの比率が変化していくとしている。化学療 法によるがん細胞のサブクローン選択については、前述したJohnsonらの報告¹⁸に加 え、慢性リンパ性白血病の初発・再発例のエクソーム比較解析3%でも、多くの症例で 化学療法を契機として特定の遺伝子変異をもつサブクローンが選択されて増大するこ とが報告されている。

ビッグバン・モデルに従えば、本検討の4症例においてもFOLFOX療法が施行される 以前の原発巣及び転移巣には多数のサブクローンが混在していたものと推察される。 ITHの存在下では、同一の腫瘍であっても部位によって腫瘍を構成するサブクローン が異なるため、いずれの部位の組織切片を用いるかによって検出される遺伝子変異が 異なると考えられる。本検討では手術組織検体の一部の切片を用いて全エクソンシー クエンスを行っているため、このことが原発巣、転移巣及び再発巣で検出される遺伝 子変異の相違に繋がった可能性がある。真にITHが今回の実験結果に影響を与えたか を検証するには、同一症例の腫瘍検体から、今回解析に用いた切片とは離れた部位の 別切片を採取して体細胞変異を比較する方法が考えられ、今後の検討課題である。ま た、再発巣ではFOLFOX療法によるクローンの選択の結果、原発巣及び転移巣とは腫瘍 を構成するサブクローンの比率が変化していると考えられるが、これがFOLFOX療法後 の再発巣でunique変異が増加する傾向がみられた一因と推察される。

特に再発巣のunique変異が突出して多い症例2では、原発巣及び転移巣でPIK3CA遺 伝子変異、再発巣ではAKT1 遺伝子変異と、異なる変異だがいずれもPI3K/AKT/mTOR経 路を活性化するMut-driver遺伝子変異⁴⁰が検出された。異なる系統のサブクローンが 環境要因などで同様の選択圧に曝されることにより、異なるが同様の結果をもたらす 変異を獲得するような進化を収斂進化(convergent evolution)と呼ぶ³⁸が、*PIK3CA* 遺伝子変異とAKTI 遺伝子変異が同一症例の別腫瘍組織から検出されたことは、症例2 における収斂進化の存在と、FOLFOX療法前後での腫瘍構成サブクローンの変化を示唆 するものと考えられる。

抗EGFR抗体薬の効果予測因子である*KRAS*については、検討した4症例ともに、原発 巣、転移巣及び再発巣の全てで一致した遺伝子変異を有していた。*KRAS*遺伝子変異 はがん化の極早期の段階で起きるとされており、多数のサブクローンに共通して受け 継がれていくため、原発巣、転移巣、再発巣の全てで一致した遺伝子型であったもの と考えられる。本検討から、現在抗EGFR抗体薬の適応を検索する際の*KRAS*遺伝子変異 測定に、FOLFOX療法前後のどちらの腫瘍組織も用いることができるという先行研究²⁶ の結果が改めて確認された。しかし、多くの遺伝子変異については原発巣、転移巣、 再発巣でITHに由来すると思われる相違が存在しており、これらを標的としたがんゲ ノム情報検索においては、腫瘍組織の違いを考慮する必要があると考えられる。

我々はFOLFOX療法前後での体細胞遺伝子変異の相違が、FOLFOX療法の耐性に関連 しているものと考え、再発巣に特徴的なunique変異遺伝子についてGO解析を行った。 結果、再発巣のunique変異遺伝子には、"calcium ion transport"のアノテーション を有する遺伝子が有意に多く含まれており、その内、TRPM7⁴¹、CACWA1E²、TRPV5⁴³、 SLC24A6⁴⁴の転写産物は、細胞内のカルシウムイオン濃度の恒常性維持に関与するこ とが知られている。また、これまでの*in vitro*の報告では、細胞内カルシウムイオン 濃度の変化と、oxaliplatinの耐性機構の一つと推察⁴⁵されるP糖蛋白質による多剤耐 性 (P-glycoprotein mediated multi drug resistance : P-gp mediated MDR) との関 連も示唆されている⁴⁶。我々の検討結果から、カルシウムイオン濃度の恒常性維持に 関与する遺伝子に変異が起こることで、oxaliplatinの感受性が低下したサブクロー ンがFOLFOX療法を機に優勢となり増殖し、再発巣を形成した可能性が示唆され興味深 い結果であった。しかしながら、これら4つの遺伝子変異とP-gp MDRの関連について 未だ十分な検討は行われておらず、我々が見出した遺伝子変異とFOLFOX療法耐性機序 との直接的な関連については今後の検討課題である。

総括および結論

- 1. 術後補助化学療法としての FOLFOX 療法による大腸がん再発巣への新たな体細胞遺 伝子変異導入は認められなかった。
- 2. 大腸がんの原発巣、転移巣及び FOLFOX 療法後の再発巣における体細胞変異遺伝子 に相違が生じる原因として、ITH 存在下で FOLFOX 療法によるクローンの選択が起 こり、サブクローンの構成比率が変化した可能性が示唆される。
- 3. 本検討は、FOLFOX 療法と大腸がんゲノム変化の関連を詳細に検討した世界初の報告であり、今後の FOLFOX 療法の耐性機序解明や新規治療開発に向けた検討の一助となるものである。

謝辞

本研究は、著者が北海道大学大学院医学研究科医学専攻博士課程在籍中の研究成果をまとめたものである。

稿を終えるにあたり本研究の機会を賜りました、同大学院医学研究科内科学講座消 化器内科学分野、坂本 直哉 教授、国立がん研究センター 先端医療開発センターゲ ノムトランスレーショナルリサーチ分野 土原 一哉 分野長、国立がん研究セン ター東病院 大津 敦 病院長、北海道大学病院腫瘍センター 小松 嘉人 准教授 に深甚なる謝意を表します。

さらに実際の研究の場となった国立がん研究センター 先端医療開発センターゲノ ムトランスレーショナルリサーチ分野 岡本 渉 先生、三牧 幸代 先生、国立がん 研究センター東病院 消化管内科科長 吉野 孝之 先生に研究デザインや手技、論 文作成に至るまで、多大なるご協力を頂き、心より感謝申し上げます。

また、研究技法をご指導いただきました同研究部のスタッフの皆様に心からお礼申 し上げます。

引用文献

- DeSantis, C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer,
 J. L., Alteri, R., Robbins, A. S. & Jemal, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* 64, 252-271 (2014).
- 2 公益財団法人がん研究振興財団. *がんの統計'15*, <<u>http://ganjoho.jp/data/reg_stat/statistics/brochure/2015/cancer_statistics_2</u> <u>015.pdf</u>>(2015).
- 3 大野ゆう子,中村隆,村田加奈子 & 他. がん・統計白書-罹患/死亡/予後-2004: 第5章 日本のがん罹患の将来推計-ベイズ型ポワソン・コウホートモ デルによる解析に基づく2020年までの予測-. 篠原出版新社. 202-17(2004).
- Watanabe, T., Itabashi, M., Shimada, Y., Tanaka, S., Ito, Y., Ajioka, Y., Hamaguchi, T., Hyodo, I., Igarashi, M., Ishida, H., Ishihara, S., Ishiguro, M., Kanemitsu, Y., Kokudo, N., Muro, K., Ochiai, A., Oguchi, M., Ohkura, Y., Saito, Y., Sakai, Y., Ueno, H., Yoshino, T., Boku, N., Fujimori, T., Koinuma, N., Morita, T., Nishimura, G., Sakata, Y., Takahashi, K., Tsuruta, O., Yamaguchi, T., Yoshida, M., Yamaguchi, N., Kotake, K. & Sugihara, K. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* **20**, 207-239 (2015).
- 5 New NCCN Guidelines Include Evidence Blocks to Illustrate Value in Breast, Colon, Kidney, and Rectal Cancers. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN.* **14**, xxxiv-xxxv (2016).
- 6 Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330-337 (2012).
- Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Karapetis, C. S., Zalcberg, J. R., Tu, D., Au,
 H. J., Berry, S. R., Krahn, M., Price, T., Simes, R. J., Tebbutt, N. C., van Hazel,
 G., Wierzbicki, R., Langer, C. & Moore, M. J. Cetuximab for the treatment of
 colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 2040-2048 (2007).
- 8 Van Cutsem, E., Kohne, C. H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C. R., Makhson, A., D'Haens, G., Pinter, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J. K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J. & Rougier, P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1408-1417 (2009).

- 9 Van Cutsem, E., Peeters, M., Siena, S., Humblet, Y., Hendlisz, A., Neyns, B., Canon, J. L., Van Laethem, J. L., Maurel, J., Richardson, G., Wolf, M. & Amado, R. G. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 25, 1658-1664 (2007).
- 10 Douillard, J. Y., Oliner, K. S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocakova, I., Ruff, P., Blasinska-Morawiec, M., Smakal, M., Canon, J. L., Rother, M., Williams, R., Rong, A., Wiezorek, J., Sidhu, R. & Patterson, S. D. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1023-1034 (2013).
- Van Cutsem, E., Lenz, H. J., Kohne, C. H., Heinemann, V., Tejpar, S., Melezinek, I., Beier, F., Stroh, C., Rougier, P., van Krieken, J. H. & Ciardiello, F. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 33, 692-700 (2015).
- 12 Yuan, Z. X., Wang, X. Y., Qin, Q. Y., Chen, D. F., Zhong, Q. H., Wang, L. & Wang, J. P. The prognostic role of BRAF mutation in metastatic colorectal cancer receiving anti-EGFR monoclonal antibodies: a meta-analysis. *PloS* one 8, e65995 (2013).
- 13 Loupakis, F., Cremolini, C., Masi, G., Lonardi, S., Zagonel, V., Salvatore, L., Cortesi, E., Tomasello, G., Ronzoni, M., Spadi, R., Zaniboni, A., Tonini, G., Buonadonna, A., Amoroso, D., Chiara, S., Carlomagno, C., Boni, C., Allegrini, G., Boni, L. & Falcone, A. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1609-1618 (2014).
- 14 Robbins, P. F., Lu, Y. C., El-Gamil, M., Li, Y. F., Gross, C., Gartner, J., Lin, J. C., Teer, J. K., Cliften, P., Tycksen, E., Samuels, Y. & Rosenberg, S. A. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat. Med.* **19**, 747-752 (2013).
- 15 Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., Bhaijee, F., Huebner, T., Hruban, R. H., Wood, L. D., Cuka, N., Pardoll, D. M., Papadopoulos, N.,

Kinzler, K. W., Zhou, S., Cornish, T. C., Taube, J. M., Anders, R. A., Eshleman, J. R., Vogelstein, B. & Diaz, L. A., Jr. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509-2520 (2015).

- 16 Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reynies, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa, E. M. F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., Homicsko, K., Maru, D., Manyam, G. C. & Broom, B. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature* 21, 1350-1356 (2015).
- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., Ritchey, J. K., Young, M. A., Lamprecht, T., McLellan, M. D., McMichael, J. F., Wallis, J. W., Lu, C., Shen, D., Harris, C. C., Dooling, D. J., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Chen, K., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., Magrini, V. J., Cook, L., McGrath, S. D., Vickery, T. L., Wendl, M. C., Heath, S., Watson, M. A., Link, D. C., Tomasson, M. H., Shannon, W. D., Payton, J. E., Kulkarni, S., Westervelt, P., Walter, M. J., Graubert, T. A., Mardis, E. R., Wilson, R. K. & DiPersio, J. F. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 481, 506-510 (2012).
- Johnson, B. E., Mazor, T., Hong, C., Barnes, M., Aihara, K., McLean, C. Y., Fouse, S. D., Yamamoto, S., Ueda, H., Tatsuno, K., Asthana, S., Jalbert, L. E., Nelson, S. J., Bollen, A. W., Gustafson, W. C., Charron, E., Weiss, W. A., Smirnov, I. V., Song, J. S., Olshen, A. B., Cha, S., Zhao, Y., Moore, R. A., Mungall, A. J., Jones, S. J., Hirst, M., Marra, M. A., Saito, N., Aburatani, H., Mukasa, A., Berger, M. S., Chang, S. M., Taylor, B. S. & Costello, J. F. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science (New York, N.Y.)* 343, 189-193 (2014).
- 19 Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., Tabah-Fisch, I. & de Gramont, A. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2343-2351 (2004).
- 20 Adam, R., Wicherts, D. A., de Haas, R. J., Ciacio, O., Levi, F., Paule, B., Ducreux, M., Azoulay, D., Bismuth, H. & Castaing, D. Patients with initially unresectable colorectal liver metastases: is there a possibility of cure? *J. Clin. Oncol.* 27, 1829-1835 (2009).
- 21 Hernandez, J., Molins, L., Fibla, J. J., Heras, F., Embun, R. & Rivas, J. J.

Role of major resection in pulmonary metastasectomy for colorectal cancer in the Spanish prospective multicenter study (GECMP-CCR). *Ann. Oncol.* **27**, 850-855 (2016).

- 22 Hah, S. S., Sumbad, R. A., de Vere White, R. W., Turteltaub, K. W. & Henderson, P. T. Characterization of oxaliplatin-DNA adduct formation in DNA and differentiation of cancer cell drug sensitivity at microdose concentrations. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1745-1751 (2007).
- 23 Woynarowski, J. M., Faivre, S., Herzig, M. C., Arnett, B., Chapman, W. G., Trevino, A. V., Raymond, E., Chaney, S. G., Vaisman, A., Varchenko, M. & Juniewicz, P. E. Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol. Pharmacol.* 58, 920-927 (2000).
- 24 Sharma, S., Gong, P., Temple, B., Bhattacharyya, D., Dokholyan, N. V. & Chaney, S. G. Molecular dynamic simulations of cisplatin- and oxaliplatind(GG) intrastand cross-links reveal differences in their conformational dynamics. *J. Mol. Biol.* **373**, 1123-1140 (2007).
- 25 Silva, M. J., Costa, P., Dias, A., Valente, M., Louro, H. & Boavida, M. G. Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 46, 104-115 (2005).
- 26 Kawamoto, Y., Tsuchihara, K., Yoshino, T., Ogasawara, N., Kojima, M., Takahashi, M., Ochiai, A., Bando, H., Fuse, N., Tahara, M., Doi, T., Esumi, H., Komatsu, Y. & Ohtsu, A. KRAS mutations in primary tumours and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* 107, 340-344 (2012).
- 27 Vermaat, J. S., Nijman, I. J., Koudijs, M. J., Gerritse, F. L., Scherer, S. J., Mokry, M., Roessingh, W. M., Lansu, N., de Bruijn, E., van Hillegersberg, R., van Diest, P. J., Cuppen, E. & Voest, E. E. Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin. Cancer. Res.* 18, 688-699 (2012).
- Brannon, A. R., Vakiani, E., Sylvester, B. E., Scott, S. N., McDermott, G., Shah, R. H., Kania, K., Viale, A., Oschwald, D. M., Vacic, V., Emde, A. K., Cercek, A., Yaeger, R., Kemeny, N. E., Saltz, L. B., Shia, J., D'Angelica, M. I., Weiser, M. R., Solit, D. B. & Berger, M. F. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome. Biol.* 15, 454 (2014).

- 29 Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760 (2009).
- 30 DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl,
 C., Philippakis, A. A., del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., McKenna, A.,
 Fennell, T. J., Kernytsky, A. M., Sivachenko, A. Y., Cibulskis, K., Gabriel, S.
 B., Altshuler, D. & Daly, M. J. A framework for variation discovery and
 genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* 43, 491-498 (2011).
- 31 Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. protoc.* 4, 44-57 (2009).
- 32 Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S. & Sunyaev, S. R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods.* 7, 248-249 (2010).
- 33 Sathirapongsasuti, J. F., Lee, H., Horst, B. A., Brunner, G., Cochran, A. J., Binder, S., Quackenbush, J. & Nelson, S. F. Exome sequencing-based copynumber variation and loss of heterozygosity detection: ExomeCNV. *Bioinformatics* 27, 2648-2654 (2011).
- 34 Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr.
 & Kinzler, K. W. Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546-1558 (2013).
- 35 Meier, B., Cooke, S. L., Weiss, J., Bailly, A. P., Alexandrov, L. B., Marshall, J., Raine, K., Maddison, M., Anderson, E., Stratton, M. R., Gartner, A. & Campbell, P. J. C. elegans whole-genome sequencing reveals mutational signatures related to carcinogens and DNA repair deficiency. *Genome Res.* 24, 1624-1636 (2014).
- 36 Ehrsson, H., Wallin, I. & Yachnin, J. Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans. *Med. Oncol.* 19, 261-265 (2002).
- 37 Sottoriva, A., Kang, H., Ma, Z. & Graham, T. A. A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat. Genet.* 47, 209-216 (2015).
- 38 Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N. Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., Nohadani, M., Eklund, A. C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J., Futreal, P. A. & Swanton, C. Intratumor heterogeneity and branched

evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883-892 (2012).

- 39 Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., Hacohen, N., Meyerson, M., Lander, E. S., Neuberg, D., Brown, J. R., Getz, G. & Wu, C. J. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152, 714-726 (2013).
- 40 Cully, M., You, H., Levine, A. J. & Mak, T. W. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 6, 184-192 (2006).
- 41 Runnels, L. W., Yue, L. & Clapham, D. E. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* **291**, 1043-1047 (2001).
- 42 Vajna, R., Schramm, M., Pereverzev, A., Arnhold, S., Grabsch, H., Klockner, U., Perez-Reyes, E., Hescheler, J. & Schneider, T. New isoform of the neuronal Ca2+ channel alpha1E subunit in islets of Langerhans and kidneydistribution of voltage-gated Ca2+ channel alpha1 subunits in cell lines and tissues. *Eur. J. Biochem.* 257, 274-285 (1998).
- Hoenderop, J. G., van der Kemp, A. W., Hartog, A., van de Graaf, S. F., van Os, C. H., Willems, P. H. & Bindels, R. J. Molecular identification of the apical Ca2+ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia. *J. Biol. chem.* 274, 8375-8378 (1999).
- 44 Cai, X. & Lytton, J. The cation/Ca(2+) exchanger superfamily: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1692-1703 (2004).
- Martinez-Balibrea, E., Martinez-Cardus, A., Gines, A., Ruiz de Porras, V., Moutinho, C., Layos, L., Manzano, J. L., Buges, C., Bystrup, S., Esteller, M. & Abad, A. Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Mol. Cancer. Ther.* 14, 1767-1776 (2015).
- 46 Sulova, Z., Seres, M., Barancik, M., Gibalova, L., Uhrik, B., Polekova, L. & Breier, A. Does any relationship exist between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and intracellular calcium homeostasis. *Gen. Physiol. Biophys.* 28 F89-95 (2009).