



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
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2312
File Information	Kazuaki_Harada.pdf



[Instructions for use](#)

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.....	3
略語表.....	7
実験方法.....	8
実験結果.....	21
総括および結論.....	44
謝辞.....	45
引用文献.....	46

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、

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 蛋白質が恒常的に GTP と結合した活性型となり、下流にシグナルが送られ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、大腸がんでは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」を示す免疫原性抗原 (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 (dMMR) 大腸がん、ミスマッチ修復機構が正常に作用する (pMMR) 大腸がんとして分類しているが、これらの検体の全エクソームシーケンスを行い体細胞変異数を比較したところ、dMMR 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 ($p=0.02$)。

2015 年には 4 つの大規模シーケンスデータから、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、次世代シーケンサー（New generation sequencer：NGS）による全エクソンシーケンスを行った。得られたシーケンスデータから、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 heterogeneity
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一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10 μ mの厚さで薄切し、がん細胞が70%以上を占める領域を手動的に剔出した（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380 μ lを加える。
2. 75°Cのサーモミキサー内で5分間混和した後に56°Cまで冷却し、20 μ lの

proteinase K を加え、56°C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。
4. 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、2 μ l 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 \times TE (Invitrogen) 2 μ l 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。
6. 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-iTTM 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。

1. PicoGreen[®]原液を TE で 200 倍に希釈し、必要量 (100 μ l /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、100 μ g/ml (Invitrogen) を用い、1 \times 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 \times 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 100 μ l ずつ分注する。
5. 標準 DNA、サンプル DNA を 100 μ l 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 ΔC_p 値の測定を用いた。

1. DNA サンプルを 1ng/ μ l 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、10 μ l 取り 990 μ l 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) 52 μ l と DNA サンプル、QCT、DW それぞれ 13 μ l を混合する。
4. それぞれ 20 μ l 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

全エクソンシーケンス :

全エクソンシーケンスのための 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ケンスに対応した SureSelect^{XT} 自動化対応キット(Agilent)を使用した。また、この行程は Agilent SureSelect^{XT} 自動化システムを利用して行った。全エクソンシーケンスは、Illumina 社の次世代シーケンサーである HiSeq2000 を用いて 100bp ペアエンドシーケンスを行った。

1. DNA の断片化 :

- 1) 1.5mL LoBind tube を用い、DNA サンプルを 1×LowTE Buffer で 130 μ l 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) 超音波破碎装置である、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)、nuclease-free water20ml、70% エタノール 45ml を SureSelect^{XT} 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：

- 1) 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 μ l
10 \times End-repair Buffer	127.5 μ l
dNTP mix	20.4 μ l
T4 DNA polymerase	12.8 μ l
Klenow DNA polymerase	25.5 μ l
T4 polynucleotide kinase	28.1 μ l
トータル量	663 μ l

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	187.0 μ l
10 \times Klenow DNA polymerase Buffer	25.5 μ l
dATP	17.0 μ l
Exo(-) Klenow DNA polymerase	51.0 μ l
トータル量	340 μ l

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 μ l
5 × T4 DNA Ligase Buffer	127.5 μ l
SureSelect Adaptor oligo mix	127.5 μ l
T4 DNA ligase	19.1 μ l
トータル量	471.7 μ l

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
A	78 μ l	40 μ l	55.5 μ l					
B	78 μ l	40 μ l	55.5 μ l					
C	78 μ l	40 μ l	55.5 μ l					
D	78 μ l	40 μ l	55.5 μ l					
E	78 μ l	40 μ l	55.5 μ l					
F	78 μ l	40 μ l	55.5 μ l					
G	78 μ l	40 μ l	55.5 μ l					
H	78 μ l	40 μ l	55.5 μ l					

A オーバ アダプタ
 末端修復 ーハンゲ ーライゲ
 マスター 付加マス ーシオン
 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

- 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 370 μ l 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。
- 30ml の nuclease-free water を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備する。
- 150ml の 70% ethanol を入れた Thermo Scientific リザーバーを準備する。
- 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：

- 1) 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	267.8µl
Herculase II 5 × Reaction Buffer	127.5µl
dNTP mix	6.4µl
SureSelect primer (Forward)	15.9µl
SureSelect Indexing Pre-Capture PCR (Reverse) Primer	15.9µl
Herculase II polymerase	1.0µl
トータル量	446.3µl

表 5. Pre-capture PCR マスターミックスの調整

- 2) 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^{XT} 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°C で 5 分加熱し、沈殿がないことを確認する。その後 25°C 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	234µl
SureSelect Hyb #2	9.4µl
SureSelect Hyb #3	93.5µl
SureSelect Hyb #4	15.9µl
SureSelect Indexing Pre-Capture PCR (Reverse) Primer	122µl
トータル量	458.9µl

表 7. Hybridization Buffer 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	31.9µl
SureSelect Block #2	31.9µl
SureSelect Indexing Block #3	7.7µl
トータル量	147.9µl

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	25.5µl
RNase Block	8.5µl
SureSelect Capture Library	85.0µl
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
A	17.4µl	14.0µl						
B	17.4µl	14.0µl						
C	17.4µl	14.0µl						
D	17.4µl	14.0µl						
E	17.4µl	14.0µl						
F	17.4µl	14.0µl						
G	17.4µl	14.0µl						
H	17.4µl	14.0µl						

Block マスターミックス
Capture library マスターミックス

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°C、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°C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。

- 13) 取り出された ABI MicroAmp プレートに 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	5minutes
2	65°C	Hold

表 10. Hybridization 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°C 以下に冷めないよう迅速に、SureSelect^{AT} 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°C 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

- 1) Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Invitrogen) 磁性ビーズをボルテックスミキサーでよく混和する。
- 2) 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、DynaMag Magnetic separator (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	425µl
SureSelect Binding Buffer	1.7µl
トータル量	2.125µl

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 200µl 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。
- 4) ⑤で作成した DNA ライブラリの入った ABI MicroAmp プレートを一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	8.0μl
Index PCR primer (reverse)	1.0μl
トータル量	9.0μl

表 12. インデックスプライマー希釈液の調整

- 2) 1) の ABI MicroAmp プレートを PlateLoc Thermal Microplate Sealer を用い 165°C、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 ^{XT} 試薬	1 カラム中の量
Nuclease free water	184.9μl
Herculase II 5× Reaction Buffer	127.5μl
dNTP mix	6.4μl
SureSelect Indexing Post-Capture PCR (Forward) Primer	12.8μl
Herculase II polymease	12.8μl
トータル量	344.3μl

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 40.5μl 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。
- 7) 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. 全エクソンシーケンス

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 社の次世代シーケンサーである HiSeq2000 を用いて 100bp ペアエンドシーケンスを行った。

がん組織由来の体細胞変異の同定：

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

1. Burrows-Wheeler Aligner (BWA、<http://bio-bwa.sourceforge.net/>)²⁹を用いて、ヒトゲノムリファレンス配列 GRCh37/hg19 にマッピングする。
2. 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。

4. 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ケ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。
6. 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、遺伝子の生物学的プロセス、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 package³³ 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 FOLFEX 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ケンスが可能な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)
1	原発巣	S 状結腸	157.5	20.0	1.64	4.4	693.0
	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
2	原発巣	直腸Rs	68.0	27.2	1.54	10.6	720.8
	転移巣	肝	138.0	20.3	1.46	7.4	1021.2
	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
3	原発巣	直腸Rs	147.0	51.4	1.67	11.6	1705.2
	転移巣	肝	149.0	64.0	1.70	21.4	3188.6
	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
4	原発巣	直腸Rb	178.0	44.3	1.65	13.4	2385.2
	転移巣	肺	178.0	42.6	1.66	12.2	2171.6
	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
5	原発巣	上行結腸	150.0	9.8	1.30	3.7	555.0
	転移巣	肝	148.0	31.7	1.59	4.1	606.8
	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
6	原発巣	直腸Ra	158.0	40.8	1.64	9.1	1437.0
	転移巣	軟部組織	70.0	1.5	0.59	1.0	70.0
	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
7	原発巣	直腸Rs	178.0	33.2	1.58	8.3	1477.4
	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
8	原発巣	S 状結腸	157.5	23.6	1.67	3.7	582.8
	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ケ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病変については、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 (ul)	核酸濃度 (ng/ul)	A260/280	dsDNA濃度 (ng/ul)	dsDNA収量 (ng)	dsDNA/核酸比 (%)
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 ΔC_p 値を測定した。positive controlと比較した ΔC_p 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。

組織	Cp 値			Δ Cp 値		
	Cp 値	Cp 値 (最大值-最小値)	Cp 値 平均	Δ Cp to control		
症例 5 再 発巢	23.16	0.04	<0.5	23.15	-4.70	$-5 < \Delta Cp < 5$
	23.16					
	23.12					
症例 6 転 移巢	23.48	0.01	<0.5	23.47	-5.03	$\Delta Cp \leq -5$
	23.47					
	23.47					
症例 7 再 発巢	27.11	0.03	<0.5	27.12	-8.68	$\Delta Cp \leq -5$
	27.12					
	27.14					
症例 8 再 発巢	25.31	0.16	<0.5	25.25	-6.81	$\Delta Cp \leq -5$
	25.29					
	25.15					
Posi	18.46	0.3	<0.5	18.44	0.00	$-5 < \Delta Cp < 5$
	18.44					
	18.43					
Nega	35.00	0	<0.5	35.00	-16.56	$\Delta Cp \leq -5$
	35.00					
	35.00					

表 17. Δ Cp値 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ケ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。

症例 番号	年齢	性	主な病理 組織型	原発 部位	転移 臓器	FOLFOX 療法施行 サイクル	無増悪生 存期間 (日)	FOLFOX 療法最終 日から再発までの 日数(日)
1	69	男	中分化型 腺癌	S状 結腸	肝	4	97	-16
2	68	男	高分化型 腺癌	直腸 Rs	肝	9	109	-88
3	64	女	中分化型 腺癌	直腸 Rs	肝	11	328	120
4	68	女	高分化型 腺癌	直腸 Rb	肺	12	556	264

表 18. 患者背景

全エクソンシーケンス結果：

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)

症例 番号	総リード数	マッピングリード数 (%)	Depth of coverage (×)	30リード以上が マッピングされた 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シーケンス結果^{6 28 34}と矛盾せず、妥当な数値と判断した。

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

症例 番号		検出総数	フィルタリングク ライテリアによる 絞込み	SNPデータベース による絞込み	正常組織との比較によ る絞込み
		(個)	(個)	(個)	(=体細胞変異数)
1	原発巣	742	668	10	4
	転移巣	752	663	12	5
	再発巣	783	675	8	4
2	原発巣	842	732	14	11
	転移巣	841	716	13	9
	再発巣	842	724	18	13
3	原発巣	770	672	10	4
	転移巣	809	707	8	6
	再発巣	774	678	9	6
4	原発巣	758	669	11	8
	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(%)
1	原発巣	107	80(74.8)	27(25.2)
	転移巣	124	89(71.8)	35(28.2)
	再発巣	130	93(71.5)	37(28.5)
2	原発巣	163	104(63.8)	59(36.2)
	転移巣	175	118(67.4)	57(32.6)
	再発巣	230	146(63.5)	84(36.5)
3	原発巣	67	37(55.2)	30(44.8)
	転移巣	72	42(58.3)	30(41.7)
	再発巣	95	56(58.9)	39(41.1)
4	原発巣	125	79(63.2)	46(36.8)
	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)

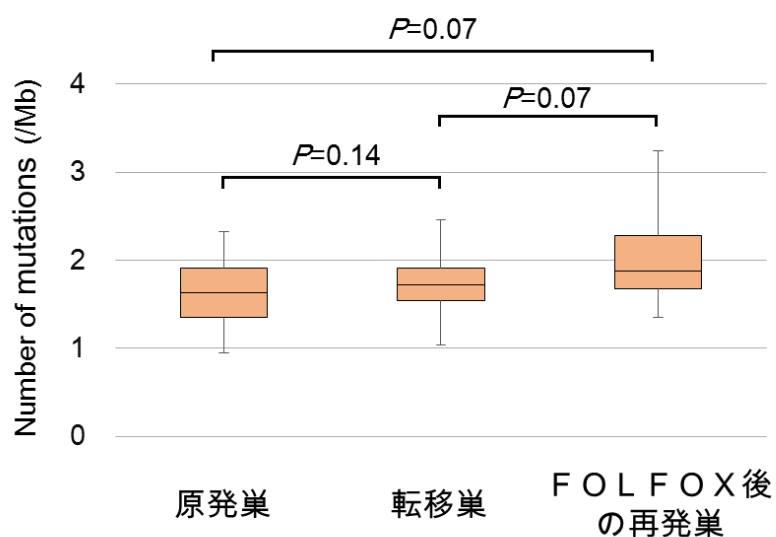


図 3. 体細胞変異数の比較： 4 症例の原発巣、転移巣、および FOLFOX 療法後の再発巣について、体細胞変異数の最大値、最小値、中央値、並びに 25/75 パーセンタイル値を示す。いずれも統計学的な有意差は見られなかった ($P > 0.05$)

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。

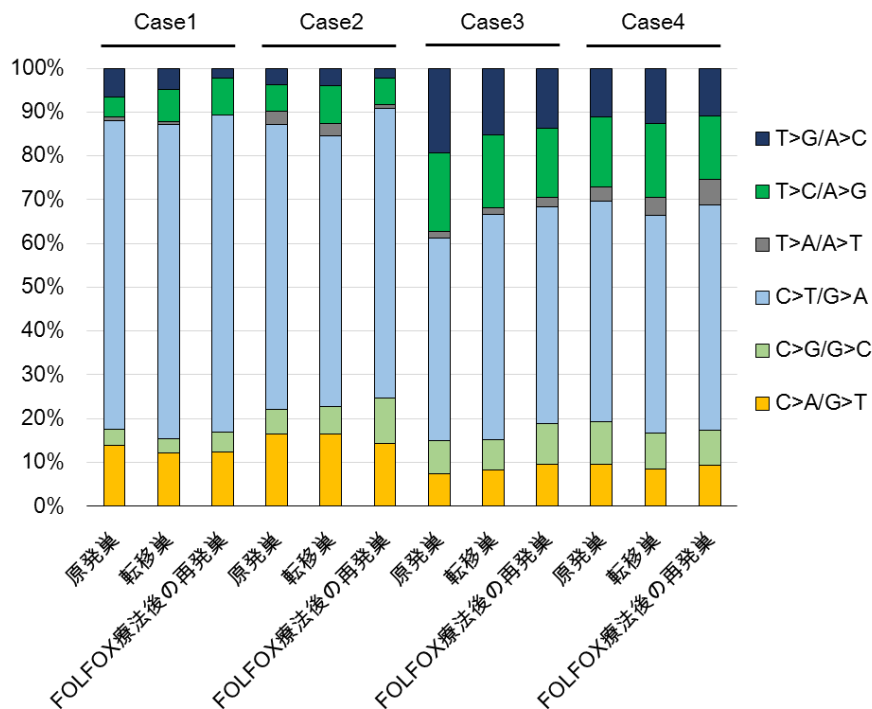


図 4. 一塩基置換パターンの比較：全 SNV

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)

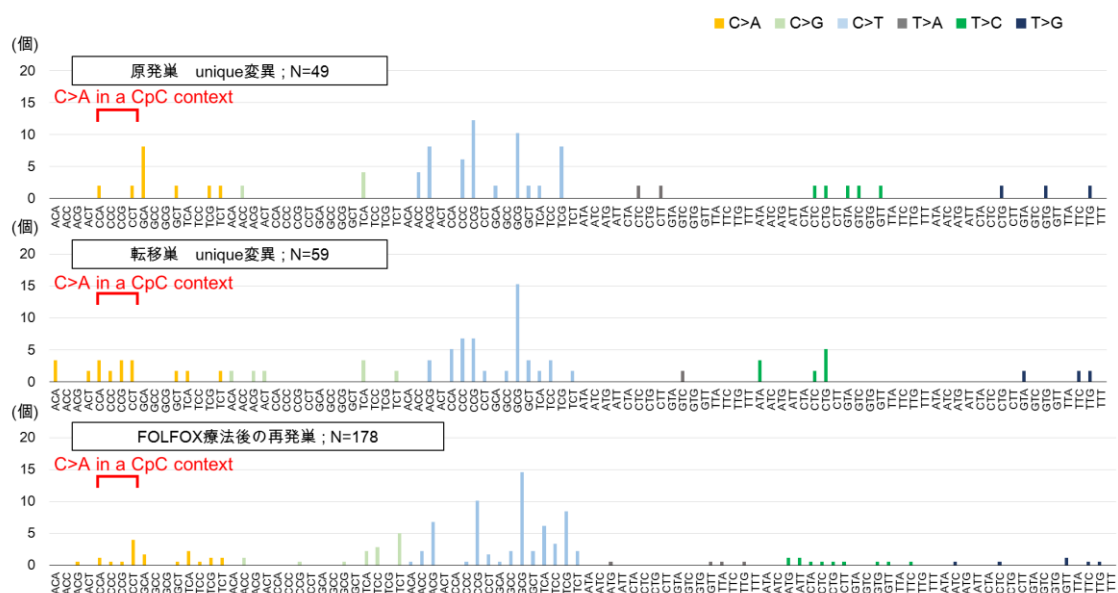


図 5. 塩基置換パターンの比較 : unique 変異を対象とした前後を含めた 3 塩基配列での比較

CNAs の比較:

術後 FOLFOX 療法が CNAs を誘導するか検討するため、再発巣で見られる 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。

— 原発巣 — 転移巣 — FOLFOX療法後の再発巣

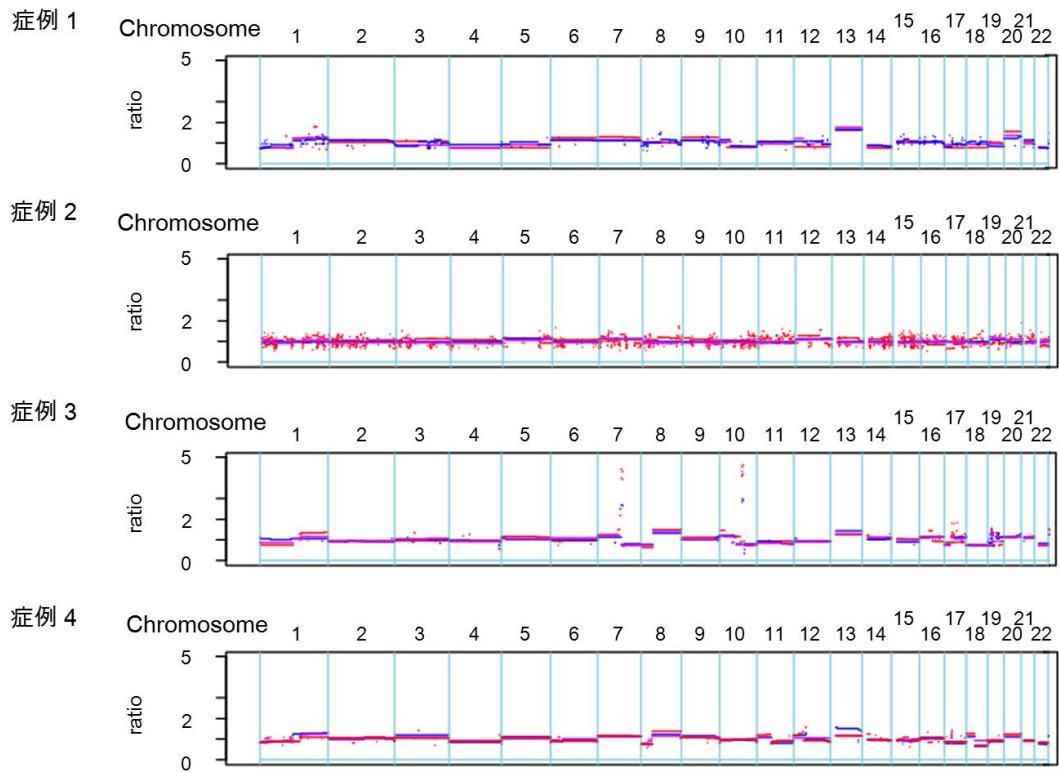


図 6. CNAs の比較 : 横軸にゲノム上の位置を、縦軸にがん組織のコピー数と対応領域の正常組織との対数比で示す。対数比 ≥ 2 を有意な遺伝子の増幅とした。

原発巣				
chromosome	start	end	ratio	遺伝子名
chr7(q21,12)	86468197	87705047	2.69	BC035377 TP53TG1 ABCB4 ABCB1 SLC25A40 DMTF1 DBF4 KIAA1324L CROT RUNDC3B TMEM243
chr7(q21,13- q21.2)	90584968	92463045	2.66	MTERF AKAP9 ANKIB1 RBM48 GATAD1 LRRD1 KRIT1 ERVW-1 PEX1 CYP51A1 AL133568 MGC16142 FAM133B
chr10(q22,3)	80285107	81115142	4.09	ZMIZ1-AS1 ZMIZ1 BC128552 AX747983
chr10(q22,3- q23.1)	81142023	82005675	2.83	AK302451 EIF5AL1 SFTPA1 SFTPA2 BEND3P3 DQ586890 AX747158 LOC642361 LOC100288974 MBL1P SFTPD TME254 TME254-AS1 PLAC9 ANXA11 LINC00857
chr10(q23,1)	82012430	82348687	2.99	MAT1A DYDC1 DYDC2 FAM213A TSPAN14
chr10(q23,1)	84498266	86278303	2.92	U6 GHITM RGR BC051760 C10orf99 CDHR1 LRIT2 LRRC21 LINC00858 DD413707

表 23. 症例 3 で増幅がみられる遺伝子:原発巣

転移巣				
chromosome	start	end	ratio	遺伝子名
chr7(q21,11)	81328341	84751276	2.18	AK055932 PCLO SEMA3E SEMA3A BX647900
chr7(q21,12)	86468197	87705047	4.00	BC035377 TP53TG1 ABCB4 ABCB1 SLC25A40 DMTF1 DBF4 KIAA1324L CROT RUNDC3B TMEM243
chr7(q21,13- q21.2)	90584968	92463045	3.92	MTERF AKAP9 ANKIB1 RBM48 GATAD1 LRRD1 KRIT1 ERVW-1 PEX1 CYP51A1 AL133568 MGC16142 FAM133B
chr10(q22,3- q23.1)	80285107	82005675	4.31	ZMIZ1AS1 ZMIZ1 BC128552 AX747983 PPIF ZCCHC24 AK302451 EIF5AL SFTPA2 SFTPA1 BEND3P3 AX747158 DQ586890 LOC642361 LOC100288974 MBL1P SFTPD TMEM254-AS1 TMEM254 PLAC9 ANXA11
chr10(q23,1)	82012430	82348687	4.17	MAT1A DYDC1 DYDC2 FAM213A TSPAN14
chr10(q23,1)	84498266	86278303	4.16	U6 GHITM RGR BC051760 C10orf99 CDHR1 LRIT2 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
chr7(q21,12)	86468197	87705047	4.42	BC035377 TP53TG1 ABCB4 ABCB1 SLC25A40 DMTF1 DBF4 KIAA1324L CROT RUNDC3B TMEM243
chr7(q21,13- q21.2)	90584968	92463045	4.30	MTERF AKAP9 ANKIB1 RBM48 GATAD1 LRRD1 KRIT1 ERWW-1 PEX1 CYP51A1 AL133568 MGC16142 FAM133B
chr10(q22,3- q23.1)	80285107	82348687	4.53	ZMIZ1AS1 ZMIZ1 BC128552 AX747983 PPIF ZCCHC24 AK302451 EIF5AL SFTPA2 SFTPA1 BEND3P3 AX747158 DQ586890 LOC642361 LOC100288974 MBL1P SFTPD TMEM254-AS1 TMEM254 PLAC9 ANXA11 DYDC1 DYDC2 FAM213A TSPAN14
chr10(q23,1)	84498266	86278303	4.63	U6 GHITM RGR BC051760 C10orf99 CDHR1 LRIT2 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- 転移巣	原発巣- 再発巣	転移巣- 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、*AKT1*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GO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	E17K	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” “GTPase-regulator 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)。

	Gene Ontology	遺伝子名			
		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~ calcium ion 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

考察

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ケンスを行い、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”³⁷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 heterogeneity : 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回の爆発的な事象で、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³⁹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ームシーケ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 *AKT1* 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、*TRPM7*⁴¹、*CACNA1E*⁴²、*TRPV5*⁴³、*SLC24A6*⁴⁴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

- 1 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*, <http://ganjoho.jp/data/reg_stat/statistics/brochure/2015/cancer_statistics_2015.pdf> (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).
- 4 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).
- 7 Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Karapetis, C. S., Zalcborg, 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).
- 11 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., Bhajee, 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).
- 17 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).
- 18 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., Ciaccio, 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 oxaliplatin-d(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).
- 28 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 copy-number 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 kidney-distribution of voltage-gated Ca²⁺ channel alpha1 subunits in cell lines and tissues. *Eur. J. Biochem.* **257**, 274-285 (1998).
- 43 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).
- 45 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).