



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大腸癌の原発巣、転移巣及びFOLF0X療法後の再発巣における体細胞遺伝子変異の比較検討 [全文の要約]
Author(s)	原田, 一顕
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2312 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12571号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66106
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuaki_Harada_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

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 (要約)

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

【緒言】次世代シーケンサーを始めとする技術革新に伴い、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がん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 Atlas 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いる。がんゲノム情報のがん治療へ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おらず、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も報告されている。このような背景の中、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。oxaliplatin は培養細胞実験系において、G>T/C>A、T>A/A>T を特徴としたトランスバージョン変異を誘導する変異原性が示されており、生体内でも大腸がんゲノムに修飾を加える可能性が考えられる。しかし、FOLFOX 療法による術後補助化学療法が大腸がん再発巣の遺伝子変異に与える影響について網羅的な解析を行った報告はなく、oxaliplatin が再発巣に新たな遺伝子変異を導入しているかは未だ不明である。新たな遺伝子変異が導入されているとすれば、再発巣のがんゲノム情報検索に FOLFOX 療法前に採取されたがん組織は用いることができない可能性がある。患者への侵襲性から頻回ながん組織採取が困難である実地臨床現場において、いずれの時点のがん組織が適切であるかは重要な検討課題である。さらに、がんゲノムの変化は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 FOLFOX 療法の薬剤耐性機序の解明に有益な情報をもたらすと考えられる。今回我々は、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスにより、同一大腸がん症例の原発巣、転移巣、FOLFOX 療法後の再発巣が有する体細胞変異を検出・比較し、FOLFOX 療法が再発大腸がんゲノムに与える影響を検討した。

【対象と方法】国立がん研究センター東病院消化内科において 2006 年 1 月から 2009 年 12 月の間 FOLFOX 療法による術後補助化学療法が施行された大腸がん患者 151 例のうち、原発巣、転移巣及び FOLFOX 療法後に出現した再発巣、全ての組織検体が利用可能な症例を診療録情報を用いて検索した。この際、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に限定して抽出した。さらに該当組織のホルマリン固定パラフィン包埋から抽出された DNA が 300 μ g 以上利用可能であった 4 症例を対象として検討を行った。4 症例の原発巣、転移巣及び再発巣に加え、がん部由来の体細胞変異を絞り込むためのコントロールとして正常大腸組織からも DNA を抽出し、Agilent technology 社のキットを用いてエクソン領域を濃縮後、Illumina 社の HiSeq2000 システムを用いて paired-end、マルチプレックスシーケンスを行った。がん組織より検出された遺伝子変異から、大規模データベースに報告された生殖細胞系列変異、同一症例の正常大腸組織から検出された遺伝子変

異を除外し、がん部特異的な体細胞変異を特定した。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の再発巣から検出された、体細胞変異数、変異遺伝子、塩基置換パターン、コピー数変化を比較検討した。

【結果】1Mb あたりの体細胞変異数は原発巣で中央値 1.6 個、転移巣では中央値 1.7 個、FOLFOX 療法後の再発巣では中央値 1.9 個と、原発巣よりも転移巣、転移巣よりも再発巣で多くの体細胞変異が検出される傾向がみられたが、体細胞変異数に統計学的な有意差は見られなかった ($P>0.05$ Wilcoxon signed rank test)。原発巣、転移巣、再発巣から検出される体細胞変異の一塩基置換パターンを比較したところ、FOLFOX 療法後の再発巣の一塩基置換パターンは同一症例の原発巣及び転移巣と同一であり、oxaliplatin が導入すると考えられる C>A/G>T、T>A/A>T のトランスバージョン変異の増加は認められなかった (C>A/G>T : 原発巣 vs 再発巣 $P=0.18$ 、転移巣 vs 再発巣 $P=0.28$ Wilcoxon signed rank test)。再発巣でのみ検出される遺伝子変異 (再発巣の unique 変異) に限定し、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、白金製剤による遺伝子変異に特徴的な 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が、有意差はみられなかった (原発巣 vs 再発巣 $P=0.72$ 、転移巣 vs 再発巣 $P=0.42$ 、Wilcoxon signed rank test)。原発巣、転移巣、再発巣のコピー数変化は FOLFOX 療法に関わらず同一症例で変化がみられなかった。その一方、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遺伝子には相違がみられ、特に 4 症例中 1 症例では再発巣で検出される遺伝子変異の半数以上が原発巣および転移巣から検出されなかった。この症例では FOLFOX 前後で発がんドライバー遺伝子変異にも相違がみられ、原発巣、転移巣では PIK3CA E542K および E88Q 変異が検出された一方、再発巣では AKT1 E17K 変異が検出された。FOLFOX 療法後に出現した再発巣に特有な遺伝子変異について Gene Ontology 解析を施行したところ、“calcium ion transport” をアノテーションに持つ遺伝子が有意に多く抽出された。

【考察】本検討では、体細胞変異数、塩基置換パターン、コピー数変化に有意な変化が見られないことから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体細胞変異導入は示されなかった。FOLFOX 療法による oxaliplatin の最高血中濃度(maximum drug concentration : Cmax)は $3.6 \mu\text{M}$ と報告されているが、これは培養細胞実験系で用いられた濃度 (10-40 μM) に比して低値であり、oxaliplatin による遺伝子変異誘導がみられない一因と推察された。変異遺伝子の相違については特に遺伝子変異の違いが顕著であった 1 症例でドライバー遺伝子変異が異なっていたことから、化学療法による新規変異の導入によるものではなく、腫瘍を形成しているサブクローン自体が異なる可能性が示唆された。大腸がんでは一つの腫瘍が多数のサブクローンから形成される腫瘍内不均一性が知られており、同一腫瘍組織であってもいずれ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。また、Gene Ontology 解析の結果、FOLFOX 療法後に出現した再発巣に特有な遺伝子変異に “calcium ion transport” をア

ノテーションに持つ遺伝子が有意に多く抽出された。oxaliplatin の耐性機序の一つと考えられる P 糖蛋白質による多剤耐性 (P-glycoprotein mediated multi drug resistance : P-gp mediated MDR) は細胞内 Ca イオン濃度変化と関連が指摘されており、これらの遺伝子変異が FOLFOX 療法の耐性に関与している可能性が示唆された。しかしながら、我々が見出した遺伝子変異と 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、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。

【結論】本検討では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示されなかった。変異遺伝子の相違は FOLFOX 療法の耐性との関連が示唆され、今後更なる検討が期待される。