

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10115

研究課題名(和文)食道癌肉腫の分子生物学的解析による食道扁平上皮癌・間葉系機構の解明

研究課題名(英文)Molecular analysis of esophageal carcinosarcoma

研究代表者

鴻巣 正史 (Konosu, Masafumi)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60458180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌肉腫は癌腫成分と肉腫成分が混在する腫瘍である。その組織発生はこれまでの遺伝子解析では解析遺伝数が少なく一元、二元両説が存在する。癌腫・肉腫成分についてそれぞれ全遺伝子変異解析を行った。体細胞変異は癌腫成分で216個、肉腫成分で131個、両成分に共通する変異が42個検出された。コピー数以上(copy number variant: CNV)は、癌腫成分で190、肉腫部分で571領域と肉腫部分で多かった。食道癌肉腫はsingle cell originから発症し、体細胞変異を主体とし蓄積する癌腫成分とCNVを主として獲得する肉腫部分に分かれ増殖することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Esophageal carcinosarcoma is rare tumor which composed of both carcinoma and sarcoma components. The hitogenesis of this type of tumor is unknown, because small number of genes have been evaluated in previous reports about genetic analysis of esophageal carcinosarcoma. In this study, we performed exome sequencing using next generation sequencer in both components of esophageal carcinosarcoma. Consequently, 216 and 131 somatic mutations were observed in carcinoma and sarcoma component, respectively. Forty-two mutations were commonly observed in both components. Meanwhile, 190 and 571 copy number variants were observed in carcinoma and sarcoma component, respectively. These results suggest that two components of carcinosarcoma are originated from single cell, and divide into carcinoma component with accumulation of somatic mutation and sarcoma component with accumulation of copy number variations.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 癌肉腫 変異

1. 研究開始当初の背景

癌組織には癌細胞以外に多数の間質細胞が存在する。近年、これらの間質細胞は癌細胞の生存維持・浸潤・転移に重要な役割をもつことが明らかになり、腫瘍血管に対する抗 VEGFR 抗体 (ベバシズマブ) のように、癌間質は癌治療の新たな標的となってきた。癌間質細胞の大部分を占める線維芽細胞について多くの研究がなされており、その起源には下記のような癌・間葉系機構に関わるいくつかの重要なメカニズムが提唱されている。1) 癌細胞の Epithelial mesenchymal transition (EMT) による間葉系細胞への変化、2) 癌幹細胞からの癌細胞と間葉系性格を有する細胞への分化による腫瘍内 heterogeneity の形成、3) 癌の存在により組織内あるいは骨髄より動員された間葉系細胞 (Cancer-associated fibroblast, CAF) が癌微小環境で腫瘍細胞と相互作用を示す。これらのメカニズムは多くの実験系で示されているが、個々の癌症例ではいずれかの系が強く影響したり、あるいはこれらが複雑に融合し多彩な臨床病理像を呈しているものと思われる。癌肉腫は病理組織学的には癌腫と肉腫 (紡錘形細胞肉腫や時に明らかな骨・軟骨肉腫など) が混在する特徴的な組織像を呈する稀な腫瘍である。食道は癌肉腫発生率の高い臓器であり、食道癌肉腫は食道悪性腫瘍の約 2% に見られる。肉腫成分は癌腫成分からの metaplasia と考えられていたが、われわれは過去にはじめて両成分を別々に採取し遺伝子解析をおこなった。その結果癌腫・肉腫成分は異なる変異を有しており、two cell origin の癌肉腫がある可能性を報告した (Gastroenterology, 1995)。その後同様の解析から、両成分に共通した遺伝子異常の報告もされ、また、近年の EMT 理論や癌幹細胞理論は癌細胞からの肉腫成分形成をよく説明できる説であり、現在では single cell origin 説が一般的とされている。

癌肉腫の肉腫成分には紡錘形細胞肉腫を呈するものが多いが、骨肉腫・軟骨肉腫など明らかな分化傾向を示すもの (true carcinosarcoma) や、悪性像のほとんど確認されない間質の反応性増殖様のもの (pseudosarcoma) までさまざまであることから、肉腫成分形成に多段階の異常が生じていることが予想される。EMT 理論では、間葉系細胞への形態・機能変化した癌細胞は転移先では MET により上皮性性格を再獲得するとされるが、肉腫成分の転移巣が存在することから癌肉腫では一般的な EMT-MET メカニズムと異なり不可逆的な変化が起こっている可能性が考えられる。また、癌幹細胞や CAF の増生は通常癌でもしばしば見られるが、癌肉腫ではこのような癌・間葉系の相互関係に特殊な変化が加わっていることが予想される。癌肉腫の発生メカニズムの解明は、通常癌の検討のみではとらえにくかった癌進展における癌・間葉系機構を明らかにするのに役立つだろう。

2. 研究の目的

本研究課題では特殊型食道癌である癌肉腫の発生メカニズムを分子生物学的解析に解明し、通常の食道扁平上皮癌における EMT、癌幹細胞、CAF などを含めた「癌と間葉系機構」と比較することで、これを標的とした食道癌の新規診断・治療法の基礎を検討する。癌は多彩な像を呈するがその一つ一つに分子メカニズムが存在する。レアケースの解析をヒントに癌発生・進展に重要な機構を解明しようとする点が本研究の学術的な特色である。

3. 研究の方法

食道癌肉腫症例の癌腫成分、肉腫成分より組織を採取、それぞれから DNA を抽出し、次世代シーケンサー (Next generation sequence: NGS, IonPGM) を用いて遺伝子変異解析を施行し、両成分の遺伝子異常の共通点、相違点について比較検討した。遺伝子変

異スクリーニングには食道扁平上皮癌で 5% 以上の変異頻度の報告のある 31 遺伝子を標的とした独自デザインの食道癌遺伝子パネルを用い、詳細検索には全遺伝子を対象とした Exome sequence を用いた。

4. 研究成果

1) 食道癌パネルの変異検出率

食道扁平上皮癌 25 症例での食道癌パネルの NGS 解析では、1 腫瘍に平均 9 個の変異が検出可能であった。TP53 変異は 100% 症例で見られ、*AJUBA*, *NFE2L2*, *NOTCH1*, *KMT2C*, *KMT2D*, *CREBBP* などが高頻度変異遺伝子であった。食道癌遺伝子パネルは民間の受託サービスなどで市販されるものはなく、今後の食道癌研究に有用である。

2) 食道癌肉腫症例

食道癌肉腫症例のうち治療前内視鏡生検にて腫瘍表面を覆う表在食道癌（病理診断：中分化扁平上皮癌）が採取され、Cisplatin を含む化学療法後癌腫成分は完全消失し遺残した肉腫成分に対し食道切除後標本から検体を採取した（病理診断：平滑筋肉腫）。癌腫成分と肉腫成分の混在を認めず、良質な DNA が採取されている。

3) 食道癌パネルによる食道癌肉腫の成分別変異解析

食道癌パネルによる変異解析では、両成分に共通して *TP53* p.Tyr220Cys, *CDLN2A* p.Asp14fs が検出され、癌腫成分のみに *TP53* p.Arg280Thr が検出された。

4) デジタル PCR を用いた変異検証

NGS 解析では変異アレルの低頻度領域での検出率が低下するため、上記の 3 つの変異についてデジタル PCR 解析を行った。その結果、両成分で 3 変異とも食道癌パネルによる NGS 解析と同等の変異アレル頻度を示した。特に *TP53* (p.Arg280Thr) 変異はデジタル PCR でも変異アレルは全く増幅されず 0% であったことから、アレル頻度による偏りではなく肉腫成分にのみの固有のクローンであ

ることが示唆された。

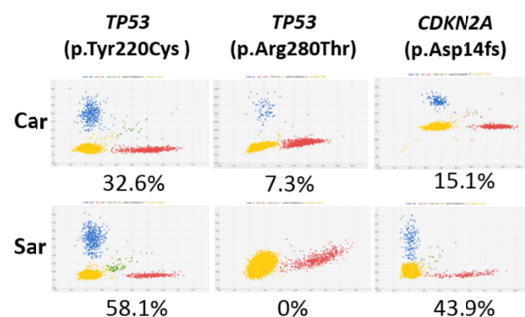


図 1 . 癌肉腫の癌腫・肉腫成分におけるデジタル PCR 変異解析. NGS 解析で検出された TP53, CDKN2A の 3 変異についてデジタル PCR 解析を施行した。青い dot が変異アレル、赤い dot が Wild type アレルを示す。変異アレル頻度を下部に示した。TP53 p.Arg280Thr は肉腫成分には全く見られなかった。Car: carcinoma component, Sar: sarcoma component

5) 食道癌肉腫成分別 Exome 解析

体細胞変異比較

癌腫成分では 216 個、肉腫成分では 131 個の体細胞変異が見られ、42 個の両成分に共通する変異が見られた。Simple nucleotide variant (SNV) のみでは、癌部で 171 個、肉腫部で 62 個、共通変異は 39 個であり、Insertion/deletion は癌部で 26 個、肉腫部で 25 個、共通変異は 2 個であった。

Somatic mutation

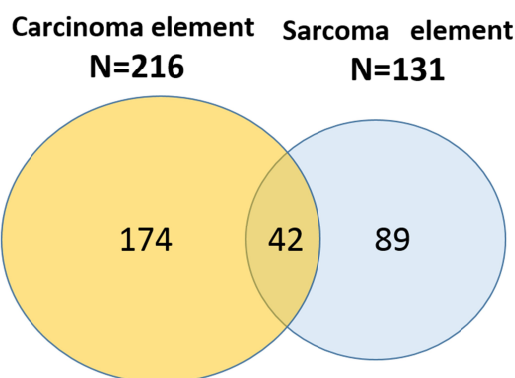


図 2 . 食道癌肉腫の癌腫成分・肉腫成分の体細胞変異. 両成分について別々に Exome 解析を施行した。SNV, MNV, INDEL が含まれる。

変異パターン比較

癌肉腫の両成分とも変異形式はミスセンス変異が最も多く、フレームシフト変異がつき、両成分に変異パターンの違いは見られなかった。

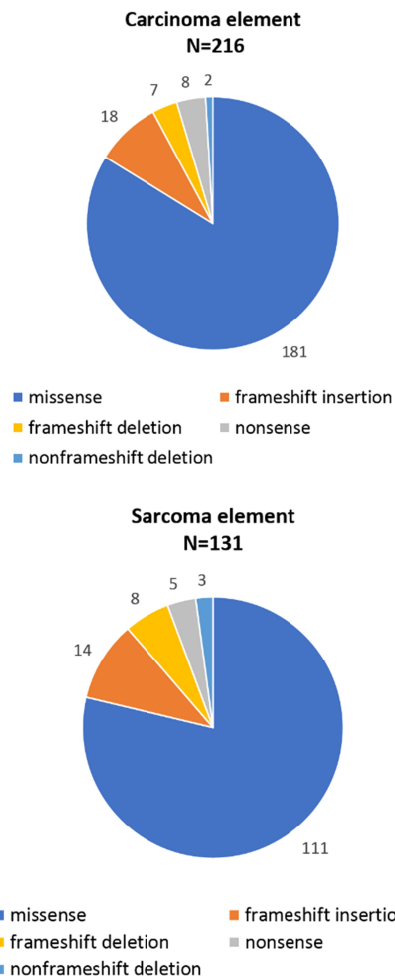


図3 . 癌肉腫成分別変異における変異パターン.
上段：癌肉腫癌成分、下段癌肉腫肉腫成分

変異タイプ比較

癌肉腫両成分に検出された SNV の変異パターンでは、癌部では C>A, T>C 変異が最も多く、肉腫成分では C>T 変異が最も多かったが、比率では両者に差は見られなかった。

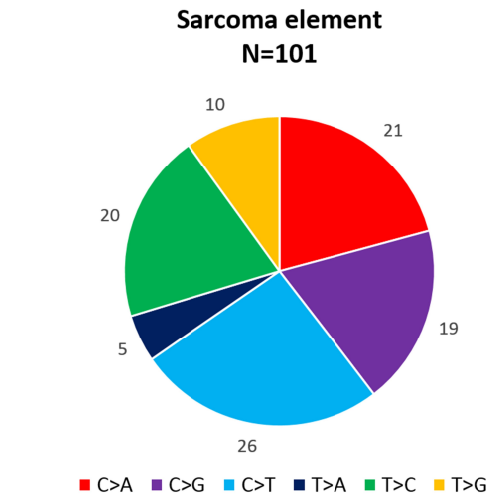
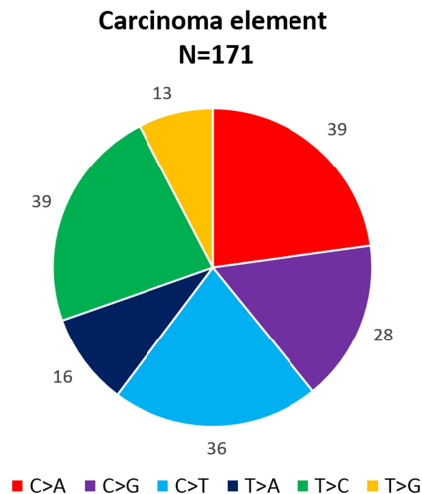


図4 . 癌肉腫成分別 SNV における変異タイプの比較

肉腫成分特異的変異

肉腫成分は紡錘形細胞が密に増生した腫瘍からなり、腫瘍細胞の cellularity は高い。肉腫成分にのみ見られる変異のうり変異アレル頻度 40%以上を示した。

gene	AA change	MAF(%)
<i>SHANK1</i>	p.Thr1464fs	64.5
<i>TMC6</i>	p.Gln192fs	63.2
<i>MUC6</i>	p.Thr1461Ile	57.1
<i>SEMA4A</i>	p.Arg510fs	57.1
<i>WNT5B</i>	p.Ala236Asp	56.5
<i>IGFBP3</i>	p.Ala32Gly	55.2
<i>FRG1</i>	p.Val202Ile	50
<i>P2RY11</i>	p.Leu80fs	48
<i>FRG1</i>	p.Lys190Glu	47.6
<i>HOXA10</i>	p.Gly50Arg	44
<i>ZNF726</i>	p.Gly375fs	40.5

図5 . 癌肉腫肉腫成分特異的変異

考察

食道癌肉腫の癌腫成分、肉腫成分を別々に遺伝子解析した報告は散見されるが、いずれも少数遺伝子の解析のため、両成分に共通の異常が認められるもの・認められないものの両報告が存在し、その発生起源には single cell origin と two cell origin の二つの

説が提唱されている。今回われわれの癌肉腫成分別の全遺伝子変異解析では両成分に 42 個の共通変異が見られ、single cell origin 説を強く裏付けるものであった。解析症例では、治療前に採取した表層部分の扁平上皮癌と抗癌剤治療後に癌腫成分が完全消失し遺残した肉腫成分について NGS を行っている。臨床経過から肉腫成分の組織採取は癌腫成分より 3 か月遅れることになり、また Cisplatin/5-FU/Docetaxel の 3 剤抗癌剤の 3 コースの治療後のものとなる。したがって、肉腫部分には癌腫部分より多数の変異が累積していることが予測されたが、NGS 解析では癌腫部分の変異が圧倒的に多かった。また、Cisplatin 投与後は C>A タイプの変異が増加することが知られているが、変異タイプは化学療法前の癌腫成分と化学療法後の肉腫成分で差は見られなかった。一方、コピー数以上(copy number variant: CNV)の解析では、癌腫成分で 190 領域、肉腫部分で 571 領域と圧倒的に肉腫部分で多かった。以上より、食道癌肉腫は single cell origin から発症し、ある時点で体細胞変異を主体とし蓄積する癌腫成分と多彩な CNV を主として獲得していく肉腫部分に分かれ増殖していくことが示唆された。癌肉腫肉腫成分は通常癌で見られる EMT における形態変化とは異なり不可逆的な変化が起こっているものと思われる。肉腫成分に特異的に見られた変異のうち WNT5 は平滑筋肉腫発生や EMT に関連するとの報告が見られる。現在、癌肉腫発生や EMT に関連する WNT5 の役割について検証中である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Peripheral vein infusions of amino acids facilitate recovery after esophagectomy for

esophageal cancer: Retrospective cohort analysis. Konosu M, Iwaya T, Kimura Y, Akiyama Y, Shioi Y, Endo F, Nitta H, Otsuka K, Koeda K, Sasaki A. *Annals of medicine and surgery* 2017 ; 14(35).

2. Downregulation of ST6GALNAC1 is associated with esophageal squamous cell carcinoma development. Iwaya T, Sawada G, Amano S, Kume K, Ito C, Endo F, Konosu M, Shioi Y, Akiyama Y, Takahara T, Otsuka K, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Nishizuka S, Sasaki A, Mimori K. *Int J Oncol* 2017 Feb;50(2):441-447.

3. Curative two-stage resection for synchronous triple cancers of the esophagus, colon, and liver: Report of a case. Akiyama Y, Iwaya T, Konosu M, Shioi Y, Endo F, Katagiri H, Nitta H, Kimura T, Otsuka K, Koeda K, Kashiwaba M, Mizuno M, Kimura Y, Sasaki A. *Int J Surg Case Rep* 2015;13:1-4.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. A case of collision tumor of esophageal squamous cell carcinoma and leiomyosarcoma. N.Sasaki, T.Iwaya, F.Endo, A.Umemura, M.Konosu, Y.Shioi, Y. Akiyama, T.Takahara, H.Nitta, K.Otsuka, K.Koeda, M.Mizuno, A.Sasaki. The 34th Congress of the Pan-pacific Surgical Association (2018 年) .

2. Mutation detection by target sequence analyses using tissue-specific panels in esophageal squamous cell carcinoma. Takeshi Iwaya, Fumitaka Endo, Kohei Kume, Yasushi Sasaki, Takashi Tokino, Satoshi Nishizuka. アメリカ癌学会 (2017).

3. 食道扁平上皮癌パネルを用いた変異解析の有用性の検討. 岩谷 岳、遠藤 史隆、西塚 哲、秋山 有史、高原 武志、大塚 幸喜、新田 浩幸、肥田 圭介、水野 大、佐々木 章. 第 72 回消化器外科学会総会 (2017 年)

4. 当科における食道癌肉腫症例の検討. 遠藤 史隆, 岩谷 岳, 秋山 有史, 塩井 義裕, 天野 総, 鴻巣 正史, 木村 祐輔, 西塚 哲, 新田 浩幸, 大塚 幸喜, 柏葉 匡寛, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章.
第 116 回日本外科学会定期学術集会
(2016 年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鴻巣 正史 (Konosu Masafumi)
岩手医科大学・医学部・研究員
研究者番号：60458180

(2) 研究分担者

岩谷 岳 (Iwaya Takeshi)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：70405801

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()