

**【要約】**

**New classification of *TP53* mutation status and  
development of *TP53* targeted treatment  
in esophageal squamous cell carcinoma**

(食道扁平上皮癌における新しい*TP53*変異形式分類と

*TP53*標的治療の開発)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：松原 久裕 教授)

鎌田 敏希

## 【背景】

TP53 はゲノムの守護神と言われる通り、固形癌における最も重要な driver mutation の一つである。米国を中心に Aurora kinase inhibitor や WEE1 inhibitor などの開発が行われているが、本格的に臨床導入されている標的治療は存在しない。食道扁平上皮癌 (ESCC) において頻度の高い体細胞遺伝子変異は他に存在せず、多くの患者のメリットとなりうる。一方、診断病理学では TP53 変異 status により p53 タンパク発現が異なることはよく知られており、ESCC における我々の先行研究でも TP53 変異 status により mRNA 発現量が異なる傾向があった。

## 【目的】

ESCC における TP53 変異 status の臨床的意義を明らかにし、変異 status による機能の層別化とバイオマーカーとしての探索を行う。

## 【方法】

### 1. 対象とサンプル抽出

当院で手術を施行した ESCC 患者 80 例を対象とした。手術検体の腫瘍組織、正常組織より凍結標本を採取し、腫瘍組織の凍結標本から DNA を抽出 (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany / QIAcube, Qiagen)、腫瘍組織および正常組織の凍結標本より RNA を抽出した (miRNeasy Mini Kit, Qiagen / QIAcube, Qiagen)。

### 2. next-generation sequencing; NGS を用いた TP53 遺伝子変異解析

方法 1. で抽出した DNA の TP53 領域を PCR 増幅し (Ion AmpliSeq TP53 Panel, Thermo Fisher Scientific)、アダプター配列およびバーコード配列の付加、ライブラリーの精製を行った (Ion AmpliSeq Library Kit Plus, Thermo Fisher Scientific / FuPa reagent, Thermo Fisher Scientific / Ion Xpress Barcode Adapters Thermo Fisher Scientific / Agencourt AMPure XP reagents, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)。各々のライブラリー濃度を定量 PCR により算出し (Ion Library Quantitation Kit, Thermo Fisher Scientific)、濃度を 10pM に調整した。つづいて Emulsion PCR、すなわち油中水滴 emulsion 内での PCR によりライブラリー DNA を増幅した (Ion OneTouch System and Ion PGM Hi-Q View OT2 kit 200, Thermo Fisher Scientific)。プレート陽性の Ion Sphere Particles の enrich を行い (Ion OneTouch ES system, Thermo Fisher Scientific)、Ion 318 Chip v2 (Thermo Fisher Scientific) にローディングした。Ion PGM system および Ion PGM Hi-Q View Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンシングを行った。Torrent Server 上の Torrent Suite software program でデータの処理し、Raw signal data は Torrent Suite, version 5.14 (Thermo Fisher Scientific) により解析した。配列は human genome 19 reference

(hg19)を参照し、アノテーションを Ion Reporter Server System (Thermo Fisher Scientific)により行った。検出された TP53 変異のアレル頻度について正規確率プロットを描出したところアレル頻度 12%未満は正規性を失っていると考えられたため、アレル頻度 12%以上かつ、遺伝子データベースの COSMIC または ClinVar において Pathogenic または Likely pathogenic とされている変異を TP53 変異と定義した。

### 3. reverse transcription PCR; RT-PCR による TP53 RNA 発現量解析

方法 1. で抽出した RNA 1000ng を cDNA に逆転写した (High Capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)。p53 の primer として 5' - GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3' (forward) および 5' -CTGAGTCAGGCCCTTCTGTC-3' (reverse) を、GAPDH の primer として 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (forward) および 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (reverse) をそれぞれ用いた (Eurofins Genomics Co., Ltd, Tokyo, Japan)。10  $\mu$ L の TaKaRa TB Green Fast qPCR Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)、0.5  $\mu$ L の各々の primer、1  $\mu$ L の cDNA template、7  $\mu$ L の RNase free water を調製し、95°C 30 秒のポリメラーゼ連鎖反応ののち、95°C 5 秒、60°C 10 秒を 40 cycles 行い cDNA 増幅を行った。RNA 発現量は GAPDH で normalize し、腫瘍組織、正常組織の  $\Delta$ Ct 値の差から、腫瘍組織の RNA 発現量を算出した。

### 4. Immunohistochemistry; IHC による p53 タンパク発現解析

手術標本の FFPE 切片より腫瘍の最深部を 4  $\mu$ m に薄切し、peroxidase-antiperoxidase complex 法で免疫組織化学染色を行った。1 次抗体として Anti-mouse p53 (D0-7) monoclonal antibody (1:200; sc-47698; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) を、2 次抗体として anti-mouse/rabbit antibody (EnVision/HRP, anti-mouse/rabbit, K5007; DAKO Japan, Tokyo, Japan) を用いた。

### 5. RNA 発現量および IHC status の分類

IHC status は negative および孤立性に陽性細胞を認めるものを IHC Low、びまん性または巣状の陽性細胞を認めるものを IHC High と定義した。RNA 発現量は再発および現病死について予後予測の ROC 曲線を描出して最適 cut-off 値を設定し、RNA High と Low に分類した。IHC Low または RNA Low を TP53 Low、その他の IHC High かつ RNA High を TP53 High と定義した。

### 6. Cell viability assay

TP53 変異の異なる ESCC 細胞株と TP53 標的薬 (APR-246: 変異 p53 を再活性化、Kevetrin:p53 の転写活性化能を亢進) を用いて cell viability assay を行い、TP53 標的治療の可能性を検討した。TE1, TE4, TE8, TE9, TE11 および TE14 (Riken Bioresource Center Cell Bank, Tsukuba, Japan)、KYSE410 および KYSE960 (Japanese Cancer

Research Resources Bank, Osaka, Japan) を 96-well プレート上に  $3 \times 10^3$  cells/100  $\mu$ L ずつ seed し、37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養後、APR-246 (0.5, 1, 5, 10, 25, 50 or 100  $\mu$ mol/L) または Kevetrin (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 or 3mmol/L) を添加し 48 時間培養した。Cell Counting Kit-8 (DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan) および xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) を用いて吸光度測定し、細胞生存率を算出した。

## 7. 統計学的解析

JMP Pro 14 software program (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) を用いて、TP53 変異と RNA 発現量、IHC status との相関、また予後の検討を行った。

### 【結果】

TP53 変異は 62 例 (77.5%) に認められ、wild-type/ missense/ synonymous/ nonsense/ splice-site/ indel がそれぞれ 18/47/2/9/7/9 例と異なる変異 status を認めた。複数変異を含む症例は 12 例であった。TP53 野生型と変異型を比較すると、患者背景は野生型で有意に進行度が高く (cT:  $p=0.0123$ , cStage:  $p=0.0146$ )、予後に差を認めなかった。一方、missense 変異の中で報告頻度の高い hotspot 変異は non-hotspot 変異と比較し有意に予後不良であった (OS, 5 年生存率 33.3% vs 64.4%,  $p=0.0065$ , log-rank test)。つづいて野生型および複数変異を除外して検討すると、TP53 High は missense 変異で有意であり、nonsense/splice-site/indel 変異は TP53 Low の特徴を示し、TP53 High は TP53 Low と比較し有意に予後良好であった (DSS, 5 年生存率 92.3% vs 56.6%,  $p=0.0386$ , log-rank test)。また、APR-246 は missense 変異を有する細胞株に対し有意に増殖抑制効果を示したが ( $p=0.0304$ , Wilcoxon rank sum test)、Kevetrin では細胞増殖抑制効果に有意差は認められなかった。

### 【結論】

ESCC において TP53 missense hotspot 変異は予後不良因子であった。hotspot 変異は DNA 結合ドメインでの変異であり、non-hotspot 変異と比較して明らかに転写活性化能を失うことが報告されている。一方、TP53 High は予後良好で missense 変異の頻度が高かった。IHC と RT-PCR は TP53 変異および機能解析、さらには APR-246 標的治療候補変異選別の一助となる一方、詳細な検討には DNA 変異配列の知見が必要と考えられた。