

論文の内容の要旨

論文題目 Integrated genomic/epigenomic analysis of sub-types and their cellular origin in clear cell ovarian carcinomas (卵巣明細胞癌におけるサブタイプ、細胞起源に関する統合的ゲノム・エピゲノム解析)

氏名 西島 明

序文

卵巣明細胞癌は卵巣癌における他の組織型（高異型度漿液性癌、低異型度漿液性癌、粘液性癌、類内膜癌）と同様に主要な組織型の一つである。特に日本においては卵巣癌全体の 25 パーセントと高頻度に発生することで知られている。

また、上皮性卵巣癌の起源については、従来いずれの組織型においても卵巣表層上皮から癌化すると考えられてきたが、最近の病理学的研究、分子生物学研究の両面から卵巣表層上皮が細胞起源でない卵巣癌の存在が明らかとなってきた。特に卵巣高異型度漿液性癌では、卵管采を発生母地とする説が有力となっている。一方、卵巣明細胞癌は子宮内膜症と高頻度に合併することがわかっているが、明細胞癌の細胞起源に関してはまだ未解明な部分が多い。本研究では、統合的解析によって、遺伝子変異プロファイル、変異シグネチャー、DNA メチル化プロファイル、遺伝子発現のそれぞれの関連性を明らかにするとともに、卵巣明細胞癌の細胞起源についての新たな知見を得ることを目的とした。

方法

対象は東京大学医学部附属病院および埼玉医科大学国際医療センターにて手術により採取された卵巣明細胞癌の腫瘍検体とペアとなる正常検体（90 症例分）を採取した。なお、正常骨盤腹膜、正常卵巣上皮は、東京大学医学部附属病院において良性腫瘍手術の検体より採取した 卵巣明細胞癌 78 例において全エクソンシーケンスを実施し、シーケンスは HiSeq2000 (Illumina) により 100bp のペアエンドシーケンスで行った。変異シグネチャーは、非負値行列因子分解 (Non-negative Matrix Factorization : NMF) アルゴリズムを使用した。腫瘍検体の DNA サンプルを Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit を用いて解析を行った。腫瘍検体、正常検体は前述通り東京大学医学部附属病院で採取された検体を用いたほか、GSE51820、GSE81227、からダウンロードした公的データを使用し NMF を用いてサンプルを 3 つの群に分類した。さらに、卵巣明細胞癌 90 例を、G-U133 Plus 2.0 アレイを用いて教師なし階層型のクラスタリング解析を行った。距離尺度として非中心化ピアソン相関を用い、平均連結法とした。さらに 2 群間の発現遺伝子比較として Gene set enrichment analysis (GSEA) を行った。

結果

1) 卵巣明細胞癌の遺伝子変異の概要

全体として 19,582 の突然変異が同定された。体細胞性突然変異の中央値は 133 であった。

78 症例中 2 症例はミスマッチ修復 (MMR) 機能喪失変異および、高頻度遺伝子変異を認めた。1 例は *MSH6* の生殖細胞系列変異と、変異アレルの片親性ダイソミーを認めた。もう 1 例は *MLH1* のプロモーター領域にメチル化を示した。したがって、卵巣明細胞癌では MMR 関連異常の割合は 2.6% であった。染色体コピー数異常は、全エクソーム解析データに基づいて評価した。コピー数増加は染色体 8q24.21 (*c-MYC* 遺伝子座) に 55%、3q26.32 (*PIK3CA* 遺伝子座) に 28% と高頻度に認めた。また、染色体 1p36.1-p35 (*ARID1A* 遺伝子の座位) に 9.0% のアレル欠失が検出された。

2) パスウェイ関連の遺伝子変異

全エクソン解析で有意に変異を来たしていた遺伝子は 41 個であった。上位 4 例は *ARID1A* (n = 43, 55%)、*PIK3CA* (n = 42, 54%)、*KRAS* (n = 10, 13%)、*TP53* (n = 6, 7.7%) であった。

ARID1A 変異に加え、*SWI / SNF* 複合体遺伝子の体細胞変異が 13 例 (17%) で同定された。その他、*SMARCA4* に 7.7%、*ARID1B* に 6.4%、*SMARCA1*、*SMARCA2*、*SMARCC1* を 1.3% に同定した。

PI3K / AKT / mTOR 経路における体細胞変異は、*PIK3CA* 遺伝子において高頻度に同定された。他の遺伝子変異の比率は *PTEN*、*AKT1*、*AKT2*、*mTOR* および *TSC1* でそれぞれ 1.3% であった。

RTK / RAS 経路遺伝子において、*KRAS* 変異 12.8% の他、*FGFR2*: 5.1%、*ERBB3*: 5.1%、*CTNNB1*: 5.1%、*NRAS*: 1.3%、*MAP2K1*: 1.3% の変異を認めた。

ARID1A / PIK3CA ダブルネガティブ遺伝子型は、進行期およびリンパ節転移 (それぞれ $p = 0.040$ および 0.0012) および予後不良と有意に関連していた。*PIK3CA* 変異群では、有意に全生存率が延長していた ($p = 0.007$)。

3) 変異シグネチャー

変異シグネチャーを NMF アルゴリズムにより分析した。最初に、MMR 遺伝子異常を呈し、遺伝子変異総数が多かった 2 症例が、MMR 欠損シグネチャーと関連することを確認した。卵巣明細胞癌と卵巣高異型度漿液性癌の間では、明らかにシグネチャーの構成が異なっており、卵巣明細胞癌では MMR, AGE, APOBEC シグネチャーが優位であり、卵巣高異型度漿液性癌では BRCA シグネチャーが最も優位であった。

MMR シグネチャーは AGE シグネチャーと類似し分離困難であるため、2 症例を除外し、残りの 76 例で変異シグネチャーについて再解析を行った。卵巣明細胞癌 76 例において、4 つの代表的なシグネチャーが見つかった。4 種のシグネチャーのうち 3 種 (加齢、BRCA、および APOBEC) は、現在の COSMIC のシグネチャーとよく合致することが確認された。もう一つのシグネチャーはいずれの既報のものとも一致しなかった。AGE シグネチャー優勢群は卵巣明細胞癌 51 例 (67%) で最も多く、他に APOBEC シグネチャー優勢群 14 例 (18%)、BRCA シグネチャー優勢群 4 例 (5.2%) であった。

4) DNA メチル化解析

我々は 270 例の卵巣癌データと 26 の正常組織（卵管采上皮、卵巣表層上皮、骨盤腹膜）と比較して、NMF アルゴリズムを用いて、クラスタリング解析を行った。分類された 3 群は 3 種の正常組織のメチル化プロファイルとそれぞれ対応することを確認した。卵管採様クラスターには、高異型度卵巣漿液性癌の 157 例中 139 例（89%）が含まれていたが、明細細胞癌では 94 例中 5 例（5.3%）のみ含まれていた（ $p < 0.001$ ）。

対照的に、骨盤腹膜様クラスターには、卵巣明細細胞癌の 81%（94 例中 76 例）が分類された。卵巣表層上皮様クラスターは、卵巣明細細胞癌 94 例中のうち 13 例（14%）、高異型度漿液性癌 157 例中 7 例（4%）、粘液性癌 8 例中 4 例（50%）、類内膜癌 11 例中 3 例（27%）が含まれた。卵管採様クラスターに含まれた 3 例の明細細胞癌はいずれも TP53 変異を有し、さらに BRCA 変異シグネチャーが優位な症例であった。一方、ARID1A および PIK3CA 変異を有する症例では、それぞれ 95% が骨盤腹膜クラスターに含まれた。

5) 分子生物学的分類

78 例の卵巣明細細胞癌症例についてマイクロアレイを行い、階層型クラスタリングによって、2 つの主要なサブタイプを同定し発現遺伝子パスウェイ解析は、上皮間葉転換（EMT）伝子が有意に高発現のグループと免疫反応関連遺伝子高発現に分類された。

卵巣明細細胞癌は、細胞起源を反映し得るメチル化プロファイル、および遺伝子変異プロファイルに基づいて、(1) 骨盤腹膜様のメチル化プロファイルでミスマッチ修復機構の破綻を伴う、(2) 骨盤腹膜様のメチル化プロファイルで PI3K 経路の変異に加えて SWI / SNF 複合体の遺伝子変異を伴うもの、(3) 骨盤腹膜様のメチル化プロファイルで PI3K 経路の変異陽性であるが、SWI / SNF 複合体の変異が低頻度の群、(4) 卵巣表層上皮様のメチル化プロファイルを示し、ダブルネガティブ型である群、(5) 卵管採様のメチル化プロファイルを示し、BRCA-like な性質を有する群、の 5 つのサブグループに分類できると考えられた。

考察

本研究では、卵巣明細細胞癌 78 例の統合ゲノム・エピゲノム解析を行い、細胞起源を反映したメチル化および変異プロファイルに基づき、層別化されることを明らかにした。卵巣明細細胞癌の発癌起源や発癌機構はいまだに完全には理解されていない。DNA メチル化に関して起源となる細胞で既に生じている変化を保持している場合が多く、細胞起源を推測する上で有用であったとする報告がなされている。本研究では、卵巣明細細胞癌に関して、正常組織を含めたメチル化アレイを利用し、起源を探ることとした。その結果、他の組織型の上皮性卵巣癌とは明確に区別され、また、大半の卵巣明細細胞癌は骨盤腹膜様クラスターに入りその細胞起源が高異型度漿液性癌と違う可能性が示された。一部の卵巣明細細胞癌では、卵管採様クラスターに含まれ、また、TP53 変異および BRCA シグネチャーによって特徴付けられることも明らかとなった。これらの希少型の卵巣明細細胞癌における病理学的所見は、エピジェネティックな所見も含めて高異型度漿液性癌様の分子生物学的特徴を含むことを示している。卵巣明細細胞癌の起源は子宮内膜上皮細胞ではなく、骨盤腹膜細胞の

可能性があり、卵巣明細胞癌の起源を明らかにするために、さらなる追試が必要であろう。

結論

統合ゲノム・エピゲノム解析により、卵巣明細胞癌の亜分類を明らかにした。その亜分類は、特定の変異プロファイルおよび変異シグネチャーを反映するのみならず、細胞起源によっても規定されていることが示唆された。こうした亜分類による生物学的特性をもとに、発癌機序の更なる解明や個別化治療法の開発につながることを望まれる。