

論文の内容の要旨

論文題目 発癌促進遺伝子 WWP1 の大腸癌における変異・増幅頻度解析

氏名 小田原 成彬

本邦において悪性新生物は死亡原因として第 1 位の疾患であり、2019 年度の統計によると、悪性新生物で死亡した人数は 376,392 人で全死因の約 27%を占めている。中でも大腸癌で死亡した人数は 51420 人で、癌腫別に見ると肺癌に次いで死亡者数第 2 位となっている。(情報サービス「がん登録・統計」、厚生労働省 令和元年(2019)人口動態統計月報年計(概数))。令和 2 年に報告された全国がん罹患モニタリング集計 2009-2011 年生存率報告によると、遠隔転移を伴う大腸癌の 5 年相対生存率は 16.0%と予後不良である。

現在、遠隔転移を伴う大腸癌の治療は化学療法が中心となっている。従来は癌腫に応じた殺細胞性の抗悪性腫瘍薬で一律に治療がなされてきたが、近年分子生物学的な解析技術の発展により発癌に関与する分子の解明が進んだことで、症例毎に腫瘍特異的な生体分子を同定し、それを治療標的とする薬剤(以下分子標的薬)を使用する個別化医療が大腸癌においても普及し、今後のさらなる発展が期待されている。

4 人に 1 人が癌で死亡するという現状を踏まえ、厚生労働省 第 3 期がん対策推進基本計画において「がん予防、がん医療の充実、がんとの共生」という 3 つの柱が掲げられた。ゲノムワイドなシーケンシング技術の発達により、遺伝子変異の蓄積が腫瘍の悪性化進展に関与していることが解明されたことで、腫瘍のゲノム情報を基に治療戦略を立てるがんゲノム医療が臨床で始まっている。2019 年 9 月に、Oncoguide NCC オンコパネルシステムと、FoundationOne CDx がんゲノムプロファイルの 2 種類のがん遺伝子パネル検査が保険適応となったことで、臨床診療において腫瘍の遺伝子プロファイルを検査することが可能となった。これらのがん遺伝子パネル検査は、検査にあたり腫瘍組織を必要とするため、症例によっては新規に検体採取をする際に身体的な侵襲が生じたり、検体が採取された時点のワンポイントの遺伝子情報しか得られないという問題点があった。がん細胞は抗悪性腫瘍薬による治療に伴って、遺伝子変異プロファイルが変化することが知られている。こうした経時的な遺伝子の変異情報を調べるにあたり、低侵襲に繰り返し検体を得られる liquid biopsy が脚光を浴びている。血液中には体細胞由来の遊離核酸(cell-free DNA、以下 cfDNA)が存在し、cfDNA には、がん細胞が死滅した際に放出された腫瘍由来の核酸断片である circulating tumor DNA (以下 ctDNA) が含まれており、liquid biopsy の検体として広く用いられるようになってきている。Liquid biopsy は臨床応用もされており ctDNA を対象としたがん遺伝子パネル検査として FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイルが 2021 年 7 月より保険適応となり、がんの遺伝子検査の裾野が広がってきている。

一方で、がん遺伝子パネルの結果に基づいた治療をおこなうことができた症例は依然として少なく、当院でがん遺伝子パネル検査をおこなった大腸癌 28 症例中、新規治療に到達できた症例は 1 例の

み (3.3%) である。こうした現状を踏まえ本研究では、将来的に治療につながる可能性のある遺伝子の候補として、過去に発癌に寄与すると報告され実際に臨床的予後との相関も指摘されている遺伝子 *WWPI* に着目した。ユビキチンリガーゼである *WWPI* は PTEN を不活化することで腫瘍促進的に働くとされており、公共のがん知識データベースである OncoKB でも Oncogene として登録されている。しかし、実臨床における *WWPI* の知見は少なく、現行のがん遺伝子パネル検査において *WWPI* は検査対象遺伝子に含まれていない。*WWPI* には阻害剤が存在し、治療薬としての臨床応用の可能性がある遺伝子であり、将来的に *WWPI* が治療標的となる可能性を秘めている。本研究では、実際の大腸癌症例を対象に *WWPI* の遺伝子変異や蛋白発現を解析し、*WWPI* の知見を得ることを目的とした。

本研究は単施設探索的横断研究で、検査対象は 2021 年 3 月から 2021 年 9 月の間に東京大学医学部附属病院に治療・通院歴のある大腸(虫垂、肛門管含む)癌で、「消化管悪性腫瘍に関する新規血中バイオマーカーの探索および腫瘍特異的遺伝子変異の同定(審査番号 2020400NI)」の研究参加の同意を得た症例と、「悪性消化管狭窄に対する金属ステント留置に伴う血中循環腫瘍細胞(circulating tumor cell:CTC)および腫瘍由来の血中循環核酸(cell free DNA あるいは RNA)の量的変化の検討(審査番号 11557-(2))」の研究に参加し、新たな研究への試料の使用の同意を得ていた大腸癌症例、計 145 症例である。そのうち 114 症例において liquid biopsy(血漿 41、血清 73)を対象に、*WWPI* の機能亢進型変異と報告されている *WWPI*^{K740N} と *WWPI*^{N745S} の各変異の有無を droplet digital PCR (ddPCR) で解析した。血漿、血清それぞれから抽出した cell free DNA (cfDNA) 中に、腫瘍由来の circulating tumor DNA (ctDNA) が含まれていることを確認するため、*KRAS* 変異が知られている 40 症例から抽出した cfDNA について、ddPCR で *KRAS* 変異検出が可能か事前検討をおこなった。また、手術あるいは生検により腫瘍組織を得られた 53 症例について、*WWPI* copy number variation (CNV)、特に機能亢進に関与する copy number gain の頻度解析を定量リアルタイム PCR でおこなった。最後に、55 症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片の免疫組織染色をおこない、*WWPI* 蛋白発現の評価をおこなった。

KRAS を対象とした事前検討の結果、血漿から抽出した 15 症例中 9 例(60%)、血清から抽出した 25 症例中 8 例 (32%) で *KRAS* 変異が検出可能であり、cfDNA 中に ctDNA が含まれていることが確かめられた。変異検出率は、血漿については既報と同程度であったが、血清については既報より低値であった。血清で検出率が低かった理由として、血清を使用した症例は病勢の安定した症例が多く、血液中の ctDNA の絶対量が少なかったことが考えられた。続いて、114 症例の liquid biopsy を対象に *WWPI*^{K740N}、*WWPI*^{N745S} の機能亢進型変異の検出を試みたが、いずれの変異も認めなかった。*WWPI* copy number の解析をおこなった 53 症例中 12 症例 (22.6%) に copy number gain (≥ 3) が見られた。Copy number の増幅群(≥ 3)と非増幅群 (< 3) の患者背景を比較すると、両群間で年齢、性別、Stage に差は見られなかったが、原発部位 (右側大腸 or 左側大腸) において、右側結腸癌では 6%の症例で増幅が見られたが、左側結腸癌では 32%に増幅が見られ、有意に左側結腸癌において *WWPI* copy number gain の頻度が多かった ($p=0.0412$ Fisher の正確検定)。また、copy number 自体も、右側結腸癌では 2.08 (中央値)、左側結腸癌では 2.45 (中央値) となり、有意に左側結腸癌で copy number が多かった ($p=0.0076$ Wilcoxon の順位と検定)。FFPE 切片を対象に免疫組織染色を行なった結果、55

症例中 40 症例 (73%) で癌部において *WWP1* 蛋白発現が亢進していた。非癌部において *WWP1* 蛋白発現が亢進している症例も 31 症例 (56%) 認めたため、非癌部と癌部の *WWP1* 蛋白発現を比較したところ、癌部において *WWP1* 蛋白発現が亢進している症例を 15 症例 (27%) 認めた。癌部における *WWP1* 蛋白発現量 (Low or Medium or High) は年齢、性別、Stage、原発部位で明らかな差は見られなかった。免疫組織染色をおこなった症例の中に、copy number 解析で copy number の増幅が見られた 6 症例が含まれており、そのうち 5 症例で実際に *WWP1* 蛋白の高発現を認めた。蛋白発現解析をおこなった 55 症例中、手術で治癒切除を得られたと考えられた 30 症例について、手術から初回再発までの期間 (Recurrence free survival: RFS) を評価したところ、癌部における *WWP1* 発現量では群間比較で明らかな差は見られなかった。非癌部と癌部とで *WWP1* の発現を比較し、発現が減弱している群 (1 例) を「down」、発現が同程度の群 (9 例) を「equal」、発現が亢進している群 (20 例) を「up」として RFS を解析すると、症例数が少なく有意差はつかないものの、up 群において equal 群よりも RFS が短い傾向が見られた ($p=0.29$ log rank test)。

本研究により実際の大腸癌の臨床症例において、癌部における *WWP1* の copy number の増幅や、蛋白発現の亢進が見られることが示された。それにより、発癌促進遺伝子と考えられている *WWP1* が、実臨床においても発癌のプロセスに何らかの促進的な影響を与えている可能性が示唆された。

WWP1 には Indole-3-carbinol (I3C) という天然由来の阻害物質が存在し、I3C を化学療法と併用することで、有害事象のリスクを上げることなく化学療法の治療効果を高められたという既報がある。阻害物質がすでに存在しているという点で、*WWP1* は癌治療において将来的な治療標的となる可能性を秘めている。本研究では大腸癌における *WWP1* の知見を得ることができたが、今後も他癌腫についての *WWP1* の知見も増やすことで、*WWP1* の将来的な遺伝子パネル検査対象遺伝子への追加や、治療への応用が期待される。