

博士論文

卵巣明細胞がんにおける全エクソン解析を用いた

変異プロファイルの同定

神尊 貴裕

第1章 序文	5
< 1 > 背景	5
1) 悪性腫瘍におけるゲノム解析と全エクソンシーケンス	5
2) 卵巣明細胞腺癌について	14
第2章 対象と方法	20
1) 卵巣明細胞腺癌における臨床検体の収集	20
2) DNA/RNA 抽出	21
3) ハイブリッドキャプチャーによるエクソン領域 DNA の調製	22
4) 全エクソンシーケンス、参照配列へのマッピング、遺伝子変異の同定	23
5) クラスタ解析	27
6) 統計学的解析	28
7) 他がん腫における遺伝子変異の数と明細胞腺癌で同定された遺伝子変異の数の 比較	28
第3章 結果	29
< 1 > 全エクソンシーケンス	29
1) シーケンス結果	29
2) 遺伝子変異数の個体差とミスマッチ・DNA 修復に関わる遺伝子変異	34
3) 遺伝子変異塩基置換パターンに基づく分類	38
4) 高頻度の変異遺伝子群の同定とその特徴	48

5) <i>ARID1A</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> 遺伝子変異の共存性と相互排他性.....	54
6) <i>ARID1A</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>TP53</i> 遺伝子変異と塩基置換によるクラスターとの相 関.....	55
7) 新規のドライバー遺伝子の探索.....	57
8) 塩基置換によるクラスター分類と関連のある変異遺伝子群の同定.....	60
9) 変異率の高いシグナル伝達経路と関連する変異遺伝子群の同定.....	61
< 2 > 染色体コピー数異常における卵巣明細胞腺癌の特徴.....	65
第 4 章 < 考察 >	66
1) 卵巣明細胞腺癌の遺伝子変異プロファイル、変異個数と染色体コピー数異常の特 徴.....	67
2) 塩基置換パターンに基づくサブクラスターの同定.....	69
3) 治療標的となりうるシグナル伝達経路の抽出.....	72
4) 新規のドライバー候補遺伝子の同定.....	74
第 5 章 < 結論 >	77
参考文献.....	78
謝辞.....	84

要旨

本研究では、卵巣明細胞腺癌 75 症例について全エクソンシーケンスを行い、次の知見を得た。ミスマッチ修復遺伝子や DNA 複製とヌクレオチド除去修復に関わる遺伝子に変異を認める” hypermutator” が存在した。50%以上の症例で *ARID1A*、*PIK3CA* 変異を認め、両者は高頻度に共存し、*TP53* 変異とは排他的関係であった。塩基置換変異が C:G>T:A が主体となる群と、C:G>A:T が主体となる群に分類された。後者では *ARID1A*、*PIK3CA* の変異率が低く、遺伝子変異の総数が有意に多かった。*GNAQ*、*KEAP1*、Notch シグナル経路といった治療標的となり得る新規遺伝子変異、経路が同定された。

第1章 序文

< 1 > 背景

1) 悪性腫瘍におけるゲノム解析と全エクソンシーケンス

悪性腫瘍における発生・進展の過程では、種々の遺伝子変異、染色体コピー数異常、エピジェネティックな異常といった異常が蓄積しており、これらによる遺伝子発現異常の結果として、悪性腫瘍の増殖、浸潤、転移能を獲得していると考えられている (1)。1980年代以降、がんの発生・進展に関与していると考えられる遺伝子変異が、ヒトのがん細胞で多数発見された。がんの増殖を促進する「がん遺伝子」として、Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*)、neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog (*NRAS*)、B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase (*BRAF*)、epidermal growth factor receptor (*EGFR*) といった遺伝子が、がんの増殖を抑制する「がん抑制遺伝子」として tumor protein p53 (*TP53*) や retinoblastoma 1 (*RBI*)、adenomatous polyposis coli (*APC*)、phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) といった遺伝子が次々と同定され、機能解析が行われている (2-4)。また、フィラデルフィア染色体で知られる breakpoint cluster region (*BCR*) と ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase (*ABL*) のように染色体転座により生じる融合遺伝子が、悪性腫瘍の引き金になりうることも知られている (5)。

このようにがんの本質的理解にはがんにかこっている遺伝子変異を把握する必要があるが、これまでは新たな遺伝子変異は個別に同定・報告されていた(6-8)。しかし、近年の次世代シーケンサーの登場で全ゲノムシーケンスおよび全エクソンシーケンスといった網羅的な遺伝子変異解析が可能となり、悪性腫瘍と全く関連が考えられていなかった遺伝子における高頻度な変異同定や、同一がん腫での遺伝子変異の全体像(プロフィール)の把握が可能となっている(9-15)。例えば、ATP加水分解を利用してクロマチン構造を変換するswitch/sucrose nonfermentable (SWI/SNF)複合体は、網羅的シーケンス法によって初めてがんで高頻度に変異している事が同定された。小児の悪性腫瘍であるラブドイド腫瘍でSWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1 (SMARCB1)の変異が同定されたのち、polybromo 1 (PBRM1)の変異が腎癌症例の41%で(16)、AT-rich interaction domain 1A (ARID1A)が卵巣明細胞腺癌の約50%(17, 18)、肝癌の30%(19)で同定されており、がん化に重要な遺伝子である事が明らかとなっている。

また、網羅的シーケンス法によりその遺伝子変異プロフィールの解明が進み、個別の治療戦略の確立された腫瘍として肺がんが挙げられる。網羅的解析により同定された個別の遺伝子変異として、TP53、cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)、neurofibromin 1 (NF1)、serine/threonine kinase (ATM)、adenomatous

polyposis coli (*APC*) 等のがん抑制遺伝子の変異 (13, 20)、epidermal growth factor receptor (*EGFR*)、erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (*ERBB2*)、erb-b2 receptor tyrosine kinase 3 (*ERBB3*)、erb-b2 receptor tyrosine kinase 3 (*ERBB4*)、EPH receptor A3 (*EPHA3*) 等のがん遺伝子の変異 (21)、更に echinoderm microtubule associated protein like 4 (*EML4*) と anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (*ALK*) の融合遺伝子 (22)、*proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase* (*ROS1*) や *ret proto-oncogene* (*RET*) の融合遺伝子などが同定された (23, 24)。さらに、*EGFR* の遺伝子異常と *EML4-ALK* の融合遺伝子は、相互に排他的関係であることが明らかになっている。*EML4-ALK* 融合遺伝子の特異的阻害剤 (クリゾチニブ) が開発され臨床応用されたことでチロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブやエルトロチニブの高い効果が期待できる *EGFR* 変異を有する症例以外でも、*EML4-ALK* の融合遺伝子を認めればクリゾチニブによる治療が可能となっている (25-27)。

この様に網羅的シーケンス解析はがんの変異解析にとって強力なツールであるが、非常に多くの変異が同定されるため、その中で真にがん化に重要な変異はどれかを見分ける必要性が生じる。真にがん化に重要な変異を“ドライバー変異”とする概念が広く受け入れられている(28, 29)。これらのドライバー変異には同じシグナル伝達経路に関するものが見られ、それらの情報から腫瘍発生・

進展に關与するパスウェイが明らかにされつつある。例えば、膠芽腫においては網羅的な解析により Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 経路、p53 経路、Rb 経路の 3 つの経路のシグナル伝達経路が普遍的に異常を来していることが明らかとなった (9)。具体的は、チロシンキナーゼ受容体/ RAS / PI3K 経路に含まれる *EGFR* や platelet derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*)、MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (*MET*)、fibroblast growth factor receptor (*FGFR*) の異常が 66%にみられ、phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) や phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (*PIK3R1*) などの異常が 25%に、*PTEN* の異常が 41%に見られる。これらドライバー変異を合わせると全体の 90%でチロシンキナーゼ受容体/ RAS / PI3K 経路の異常を認めることとなる (全体の 39%ではドライバー変異を 2 つ以上有している)。同様に *TP53* の変異や欠失を 27.9%に、Mdm1 nuclear protein (*MDM1*) および MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (*MDM2*)、MDM4, p53 regulator (*MDM4*) のコピー数増加を 15.1%に、*CDKN2A* の欠失を 57.8%に認める事で p53 経路の異常も 86%に見られる。Rb 経路においても、*RBI* の変異や欠失を 7.6%に、cyclin-dependent kinase 4, 6 (それぞれ *CDK4*, 6) の増幅を 15.5%に、*CDKN2A* の欠失を 55.8%に認める事で、全体の 79%で経路の異常が見られる (図 1A)。また、Rb 経路のドライ

バー変異である *CDKN2A* の欠失、*RB1* の変異、*CDK4/6* の増幅は互いに排他的であり（図 1B）、治療戦略を考える上でも重要である。

以上の様に、ドライバー変異の同定および高頻度に障害されているパスウェイの同定は腫瘍発生・進展を理解に重要であり、治療戦略を考える上でも重要である。

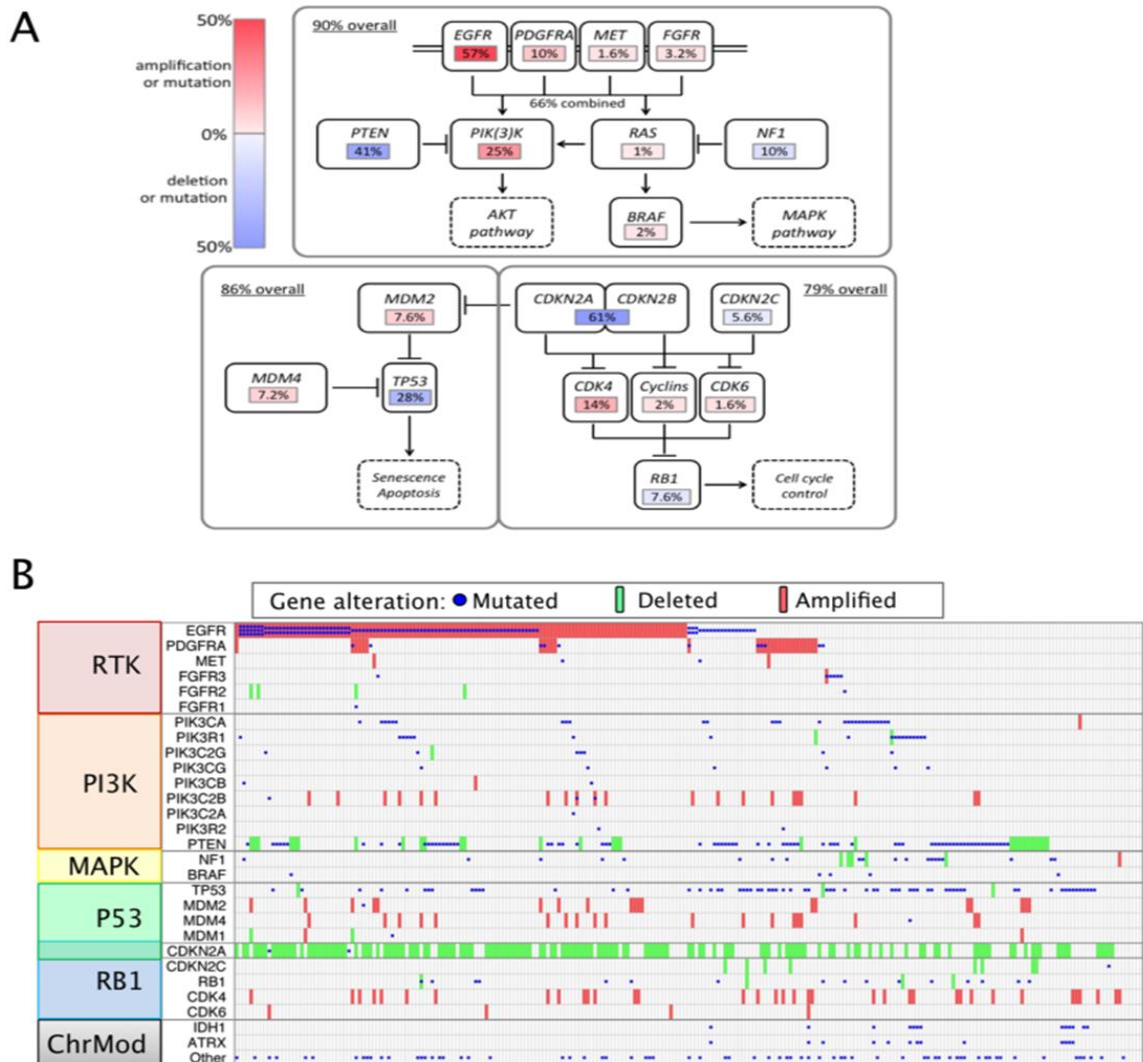


図 1 脳神経膠芽腫におけるパスウェイ変異

A: 膠芽腫において高頻度に遺伝子発現異常が認められる 3 つのシグナル伝達経路. 膠芽腫において、遺伝子変異、染色体コピー数異常を組み合わせ、各シグナル伝達経路における異常の頻度を調べ、そのカバー率（異常を有する症例の比率）を算出したもの。

B: ドライバー変異の関係性を示したもの。 ((9)より引用)

網羅的シーケンス解析は、ドライバー変異の同定のみではなく、その遺伝子変異の数や変異における塩基置換のパターンからも、がんの生物学的背景を明

らかにすることができる。タバコ関連の肺がんや紫外線関連のメラノーマは発がん物質への曝露の影響を受けるため、これらの腫瘍では変異個数が多い。一方、小児がんや血液がんでは変異の個数が少ないという特徴がある (12, 29, 30)。また、Lynch syndrome のようにマイクロサテライト不安定性（ミスマッチ修復遺伝子の機能喪失）を有する頻度が高い大腸がんや子宮体がんでは、変異数が多い”hypermutator”が存在している (4, 14, 31)。特に子宮体癌における

“hypermutator” の症例は、臨床学的に予後良好である事が示されている (31)。

さらに、同定される点突然変異の塩基置換のパターンはそれぞれの癌腫で特徴がある。例として、メラノーマでは C:G > T:A 変異が多く、肝がんや腎がんでは T:A > C:G の変異が多いことがあげられる (10, 32, 33)。メラノーマでは紫外線 UVB によりシクロブタンピリミジン二量体などの紫外線光産物が作られ、この状況下での DNA ポリメラーゼの”A”残基取り込みから、TC 二量体、CC 二量体から TT 二量体へのトランジションが起こる事が原因とされている (34)。肝がんでは習慣的飲酒の有無で塩基置換のパターンに差がある可能性や肝硬変を背景とする肝がんでは G:C > T:A の変異が少ないなど、同一がん腫内においても塩基置換のパターンによりがん化過程の異なる群を抽出できる可能性が示されている (19)。最近、30 がん腫、約 7000 症例を集積した解析において、代表的な 30 種類の塩基配列置換のパターン分類 (mutation signature) が提唱された (35)。

一部ではあるが、その生物学的意義が明らかとなっている。例えば、図 2 に示す Signature1A, 1B では、C:G>T:A 変異の多くが XCG 配列の C に生じており、CpG における脱アミノ化反応により変異が誘発されていると考えられている。これらの signature は、がん腫横断的な解析から小児がんには少なく、年齢と強く相関する事が示されている (35)。同様の C:G>T:A 変異が主体であっても、Signature2 では TCX 配列の C に変異が生じており、一部 C:G>G:C 変異も存在する。このタイプの変異は、一本鎖 DNA の C をウラシルに変換する DNA シチジン脱アミノ化酵素活性を有する *APOBEC3* ファミリーの関与が示されている。*APOBEC3* は 5'-TC-3' を認識し、C を脱アミノ化する事で変異を誘発しており、乗り越え修復により C:G>G:C 変異を誘発すると考えられている (35-37)。また、Signature 4 では C:G>A:T 変異が主体であるが、これは喫煙との関連が示唆されている (35)。抽出された 30 種類の signature には、まだその意義が不明なものも多いが、今後理解が進むものと考えられる。

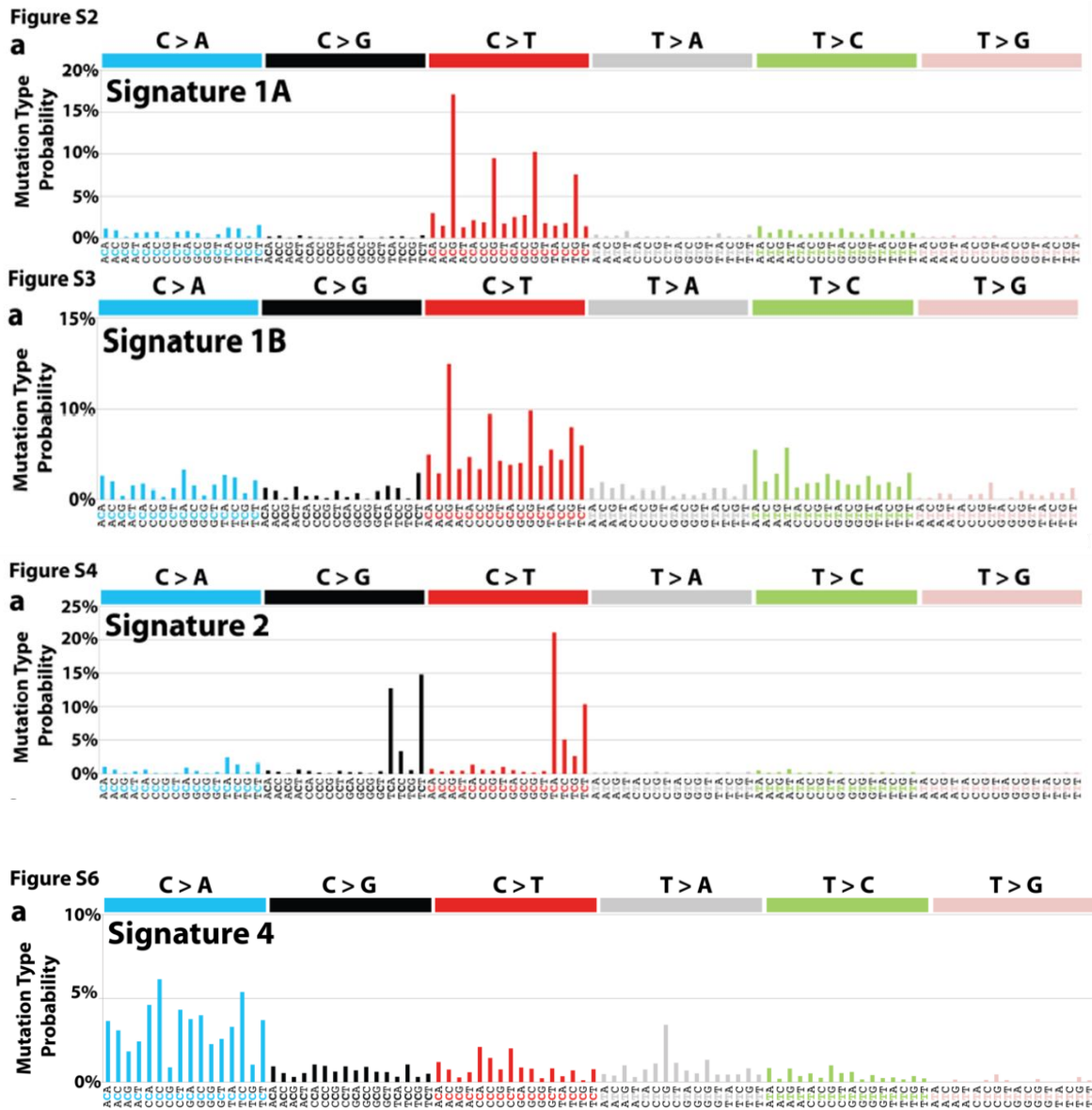


図 2 Signatures of mutational processes in human cancer

塩基置換による変異について、変異のタイプと変異が生じている塩基の前後の塩基を含めて 96 パターンに分類している。縦軸は変異数の割合を示す。(35)より引用、一部改編)

2) 卵巣明細胞腺癌について

上皮性卵巣がんは女性において死亡者数が5番目のがん腫である(38)。婦人科がんではもっとも致死率が高い。早期発見が困難であり、進行期Ⅲ/Ⅳ期で診断されることが多い。上皮性卵巣がんの主要な組織型は、漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌、明細胞腺癌(clear cell adenocarcinoma; CC)の4つがあげられる。各組織型において、診断時の進行期や化学療法感受性、予後など臨床病理学的な特徴は異なっており、さらに遺伝子変異を含めた生物学的背景も異なることが示されている(39-41)。しかしながら、現時点では組織型分類によらず、画一的な治療が標準治療として行われており、各々の組織型の生物学的背景に基づいた治療の確立が望まれる。

明細胞腺癌は、卵巣癌の4つの主要組織型の中でも特に注目されている組織型である。一般に診断時に進行症例が多い卵巣がんの中で、明細胞腺癌では約60%前後がⅠ/Ⅱ期で診断される。しかしながら、Ⅰ/Ⅱ期あるいはⅢ/Ⅳ期症例別の治療成績を他の組織型と比較すると予後不良であることが報告されている。卵巣癌の臨床試験では、発生頻度が最も高い漿液性腺癌を中心に行われることが多い。実際、標準化学療法に対する奏効率は漿液性腺癌が70%を超えるのに対し、明細胞腺癌では35%程度とされている(42, 43)。また、本邦と欧米では明細胞腺癌の発生率に差があり、欧米では8%前後の割合に対し、本邦では25%前

後の報告が多い ((43)、表 1)。米国在住の日本人でも 9%と白人の 3.4%より高く、ヒスパニック、アフリカ系、中国人より高いことより、生活習慣のみならず遺伝的背景の関与も考えられている。しかしながら、日本人で好発する原因は明らかとなっていない。卵巣明細胞腺癌については、本邦での症例を集積し、解析する必要があると思われる。

Histology	Japan society of OBGY	FIGO
Serous	1098 (40.1%)	3058 (52.4%)
Clear	662 (24.2%)	494 (8.4%)
Endometrioid	483 (17.6%)	958 (16.3%)
Mucinous	359 (13.1%)	732 (12.5%)
Poorly	78 (2.8%)	320 (5.4%)
Mix	59 (2.2%)	294 (5.0%)

表 1 本邦と欧米における組織分類別卵巣癌発生比率

Clear (卵巣明細胞腺癌) の頻度が欧米に比べ本邦では高い事が示されている。
(卵巣がん治療ガイドライン 2010 年版より引用、一部改編)

卵巣明細胞腺癌の発がんについては、子宮内膜症との関連が指摘されている (44, 45)。子宮内膜症は、子宮内膜上皮が子宮外に存在する疾患で、卵巣は好発部位である。月経時に卵巣内に出血がおこり、血液が貯留、子宮内膜症性卵巣嚢胞 (チョコレート嚢胞) が形成される。貯留した血液に含まれる過剰鉄の触媒作用により酸素がヒドロキシラジカルに変化するフェントン反応が起こる。産生されたヒドロキシラジカルが DNA 傷害、脂質過酸化、アポトーシス (細胞

死)などを引き起こし、がん化すると考えられている (46)。我々の報告を含め、マイクロアレイを用いた発現解析により、卵巣明細胞腺癌は他の組織型と異なる発現パターンを示し、さらにその特徴を規定する遺伝子群には低酸素ストレスに対する遺伝子が多いことが示されている (47-49)。

卵巣明細胞腺癌に高率にみられる遺伝子変異として、以前より *PIK3CA*、*KRAS* 変異が指摘されていた(50)。両遺伝子変異とも Phosphatidyl Inositol-3 Kinase (PI3K) 経路の活性化に寄与するという共通性がある。さらに最近になって、8例の明細胞腺癌について 18,000 のタンパク質コード遺伝子を対象としてシーケンスを行い、新たに *ARID1A* (AT-rich interactive domain 1A)、*PPP2R1A* (protein phosphatase 2, regulatory subunit A) の変異が同定された。シーケンス深度の中央値は $\times 84$ 、10 以上のリードがあるのは、シーケンス領域のうち 92.7%であった。別の 42 サンプルについて変異頻度の高い 4 遺伝子 *ARID1A*、*PIK3CA*、*KRAS*、*PPP2R1A* を調べたところ、変異陽性率はそれぞれ 57%、33.3%、4%、7%であった (17)。また、*ARID1A* 変異は全トランスクリプトームのシーケンスによっても明細胞腺癌で高頻度に確認され、がん抑制遺伝子と考えられている (18, 51)。*ARID1A* はクロマチンリモデリング SWI-SNF 複合体の重要な構成因子である BAF250a をコードしている。クロマチン構造は転写活性化因子の DNA への結合を抑制しているが、BAF250a をはじめとした SWI-SNF 複合体は、クロマチン

構造をほどく (クロマチンリモデリング) 活性を持つ分子である (エラー! 参照元が見つかりません)。ARID1A 変異によるクロマチンリモデリングの異常は、腫瘍細胞の増殖や生存に関わっていることが示唆されている (51)。

以上より、卵巣明細胞腺癌において、クロマチンリモデリングや RAS/PI3K 経路の異常が重要であると考えられる。その一方、既知の遺伝子変異を組み合わせても、全体の 70% 程度のドライバー変異が同定されているに過ぎない。すなわち、約 30% の症例においては、がん化を促進するドライバー変異が不明なままといえる。明細胞腺癌は日本人に多く欧米では少ないことから、海外からの卵巣がんにおけるゲノムワイドな解析は漿液性腺癌に焦点をあてたものが中心である (52)。卵巣明細胞腺癌において、さらなる遺伝子変異の同定、変異に基づいた分類法の確立、新規治療標的の解明といった課題を解明していくことが必要である。全エクソンシーケンスを中心とした包括的なゲノム解析を通して、新たな知見が期待される。

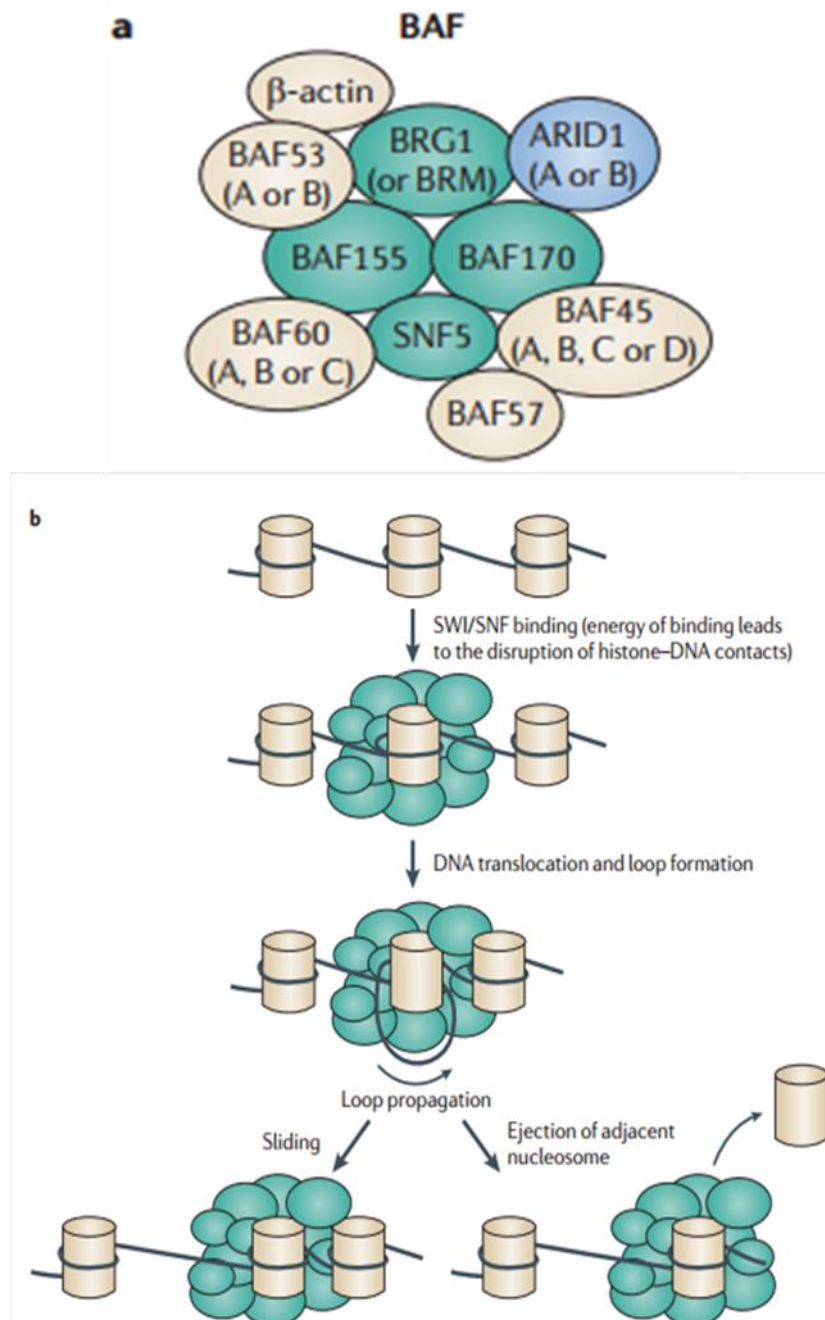


図3 SWI/SNF 複合体とクロマチンリモデリング

a. SWI/SNF 複合体の構成因子。ARID1A (B250a)、ARID1B (B250b)のほか、様々な蛋白の複合体として機能する。b. リモデリングの機序。SWI/SNF 複合体がヒストン-DNA に結合し、ヌクレオソームの構造を変化させる。(53より引用)

< 2 > 本研究の目的

卵巣明細胞腺癌の臨床検体を用いて全エクソンシーケンスおよび染色体コピー数解析を通して、以下のことを明らかにすることを研究目的とした。

- ①全エクソンシーケンスによる変異解析と染色体コピー数異常を解析することによって、好発する遺伝子変異、変異個数、染色体異常といった遺伝子変異プロファイルを明らかとする。
- ②遺伝子変異個数や塩基置換のパターンをもとに、生物学的特徴と関連するサブグループを抽出し、各遺伝子変異との相関を明らかとする。
- ③新規の治療標的となるようなシグナル伝達経路を同定する。
- ④新たな遺伝子変異、特に癌化促進に関連するドライバー候補となる遺伝子変異を同定する。

第2章 対象と方法

1) 卵巣明細胞腺癌における臨床検体の収集

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、1996年6月から2013年7月までに手術された症例のうち、腫瘍組織が得られた卵巣明細胞腺癌症例97例であった(表2)。このうちペアとなる正常検体(正常卵巣部分もしくは末梢血液)が回収できた78例を対象に、全エクソシーケンスを行った。各施設における倫理委員会で承認を得た(東京大学医学部附属病院倫理委員会承認番号683-8、G3531、埼玉医科大学国際医療センター承認番号13-098)うえで、インフォームドコンセントのもと、検体を収集した。腫瘍組織と正常卵巣検体はいずれも新鮮凍結標本であり、末梢血液は外来にて採取した。全97例の内訳は表1の通りである。サンプルはすべて初発のサンプルであり、初回手術で採取された新鮮凍結標本を用いた。

表1. 卵巣明細胞腺癌臨床検体の内訳

腫瘍サンプル数	97	例
全エクソン解析	78	例
東京大学症例	61	例
埼玉医科大学症例	36	例
年齢	54.8±10.6	歳
追跡期間中央値	30	か月
追跡期間平均値	41	か月
臨床進行期		
I期	59	例
II期	11	例
III期	18	例
IV期	8	例
Unknown	1	例
再発	26	例
死亡	6	例

表 2 解析対象サンプル

2) DNA/RNA 抽出

78 例のペア検体（血液と腫瘍の両方を含む）から QIAamp DNA Mini および Micro Kit (QIAGEN,Valencia,CA), AllPrep DNA/RNA Mini Kit を使用してプロトコールに従い DNA を抽出、精製した。DNA の濃度は NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop), Qubit (Life Technologies) にて測定した。また、腫瘍組織の新鮮凍結標本については、薄切の後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、腫瘍が含有されている事を確認の上で解析に供した。

3) ハイブリッドキャプチャーによるエクソン領域 DNA の調製

エクソン領域の濃縮には、Agilent SureSelect Human All Exon Kit v4 (Agilent Technologies)を使用した。同キットは 51Mb をターゲットサイズとし、20965 の遺伝子、334378 のエクソン領域をカバーしている。

まず、1-3 µg のゲノム DNA をテンプレートとし、covaris S2 を用い DNA を断片化した。Agencourt AMPure XP ビーズで DNA の精製を行い、Agilent 2100 バイオアナライザによる電気泳動で 150-200 bp 付近にピークがある事を確認した。ライブラリ作成には、イルミナ社ペアエンドマルチプレックスシーケンスに対応した Agilent 社の SureSelect XT キットを用いた。SureSelect library prep kit GA に含まれるエンドリペアミックスを使用し、末端修復を行い、ビーズ精製、DNA 断端の 3' 末端に A オーバーハング付加した。ビーズ精製後、シーケンスインデックス用アダプターをライゲーションし、このアダプター付き DNA ライブラリーを増幅し、バイオアナライザーでサイズおよび収量を確認した。これにより作成されたイルミナ社ペアエンドアダプター付き DNA ライブラリーを、SureSelect オリゴキャプチャライブラリーとハイブリダイズし、エクソン領域を濃縮した。キャプチャーされた DNA を回収し、ビーズ精製、

インデックスバーコードタグを付加しつつライブラリを増幅、定量 PCR でライブラリ量を測定し、サンプルをプールしてシーケンスに用いた。

4) 全エクソンシーケンス、参照配列へのマッピング、遺伝子変異の同定

次世代シーケンサーの HiSeq2000, 2500 (Illumina 社) を用い、100 bp のペアエンドシーケンスをおこなった。画像解析、ベースコールおよびベースコールのクオリティ値はイルミナ社のパイプラインを使用した。

各リードについて、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (54)および Novoalign software を用いてヒトゲノム参照配列 (GRCh37/hg19) へのマッピングを行った。PCR Duplicate を除去し、さらに Short-Read Micro re-Aligner (SRMA) (55) を使用して局所での再アライメントを行い、変異同定については karkinos

(URL : <http://sourceforge.net/projects/karkinos/>) を用いた。同ソフトウェアでは、腫瘍細胞の含有率をヘテロ SNP の LOH 領域におけるアレル情報や遺伝子変異のアレル頻度から推定し、腫瘍細胞の含まれる割合の少ないサンプルにおける遺伝子変異同定を改善している (図 5)。リード数が 8 以下を除去し、正常サンプルでのアレル頻度が 3%未満、腫瘍サンプルでの変異アレルの頻度が 5%を超えるものを抽出し、推定された腫瘍率で補正した変異アレルが 20%以上であるものを遺伝子変異の候補とし、その周囲のマッピングのクオリティ値やサポートリードのベースコール値なども考慮し、アーチファクトを除

去している。Fisher's 検定を行い、P value が 0.2 を超えるものも除去し、遺伝子変異を同定した (図 6)。

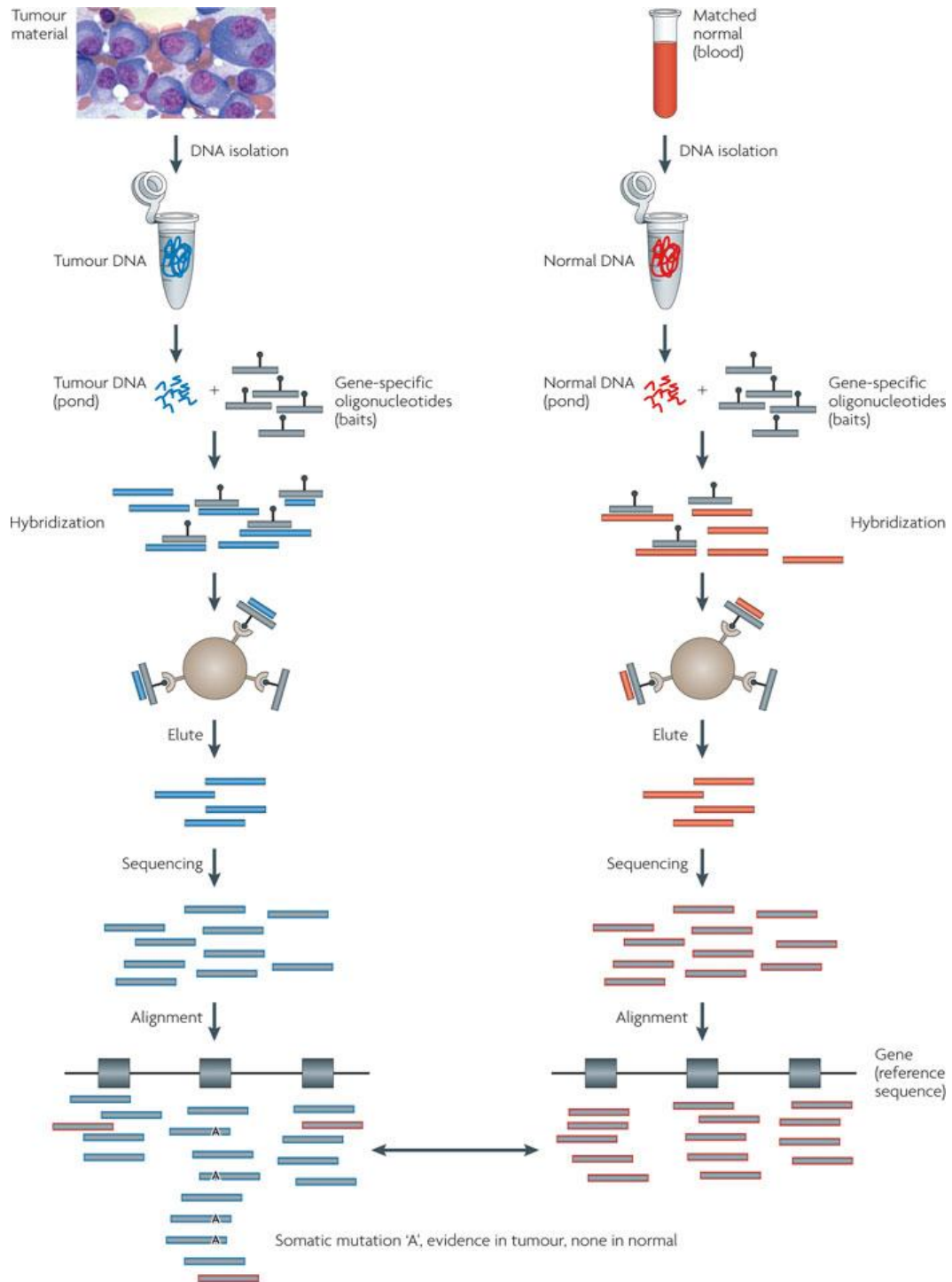


図 4 次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析

解析の流れを図示した。1. 腫瘍検体と同一症例の末梢血液からそれぞれゲノム DNA を抽出する。2. 得られた DNA 断片に、エクソン領域特異的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーション（結合）させる。3. ハイブリダイズされた DNA 断片を抽出し、シ

一ケンス用のライブラリーを作製する。4. DNA 断片にアンカーを付し、両側からシーケンスを行い（ペアエンド法）、塩基配列を得る。5. 得られたシーケンス配列を参照する配列に対応させ、腫瘍 DNA と正常 DNA を比較し、体細胞変異を検出する。（(56) より引用）

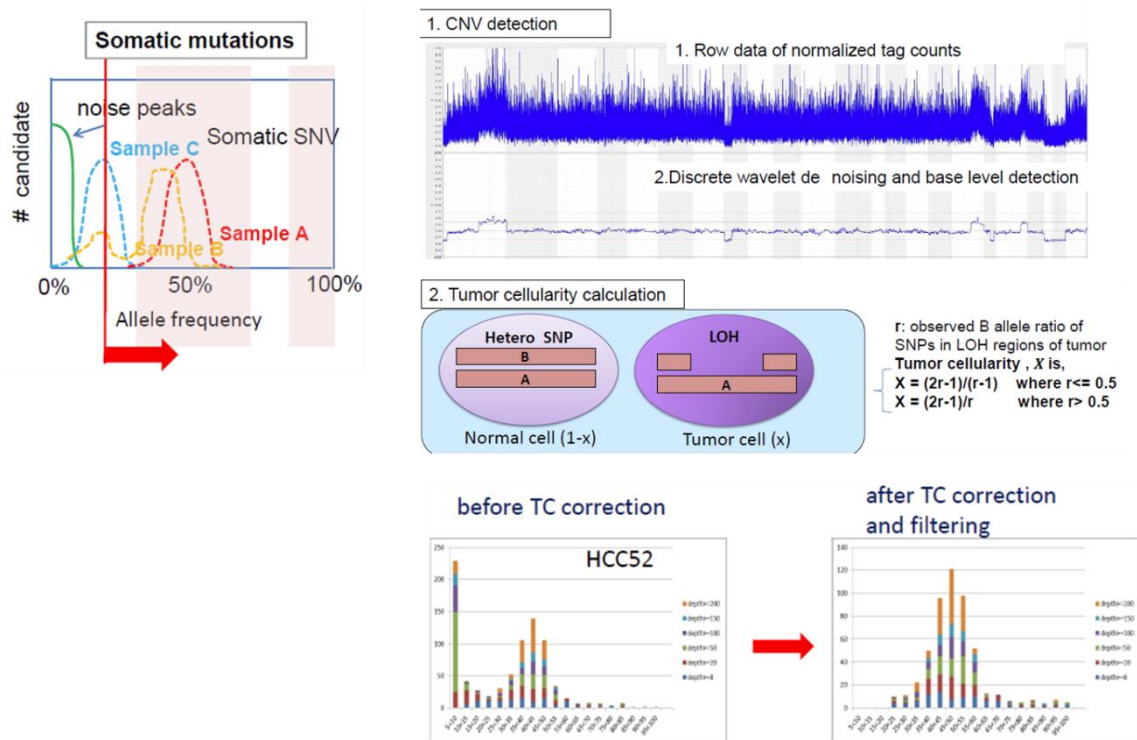


図 5 腫瘍細胞の含有率の推定と変異同定効率の改善

ヘテロ SNP の LOH 領域におけるアレル情報や遺伝子変異のアレル頻度から、腫瘍細胞の含有率を推定。遺伝子変異同定に際し、腫瘍含有率を考慮することでノイズの除去と、腫瘍細胞の割合が少ないサンプルにおける変異同定の効率を改善している。

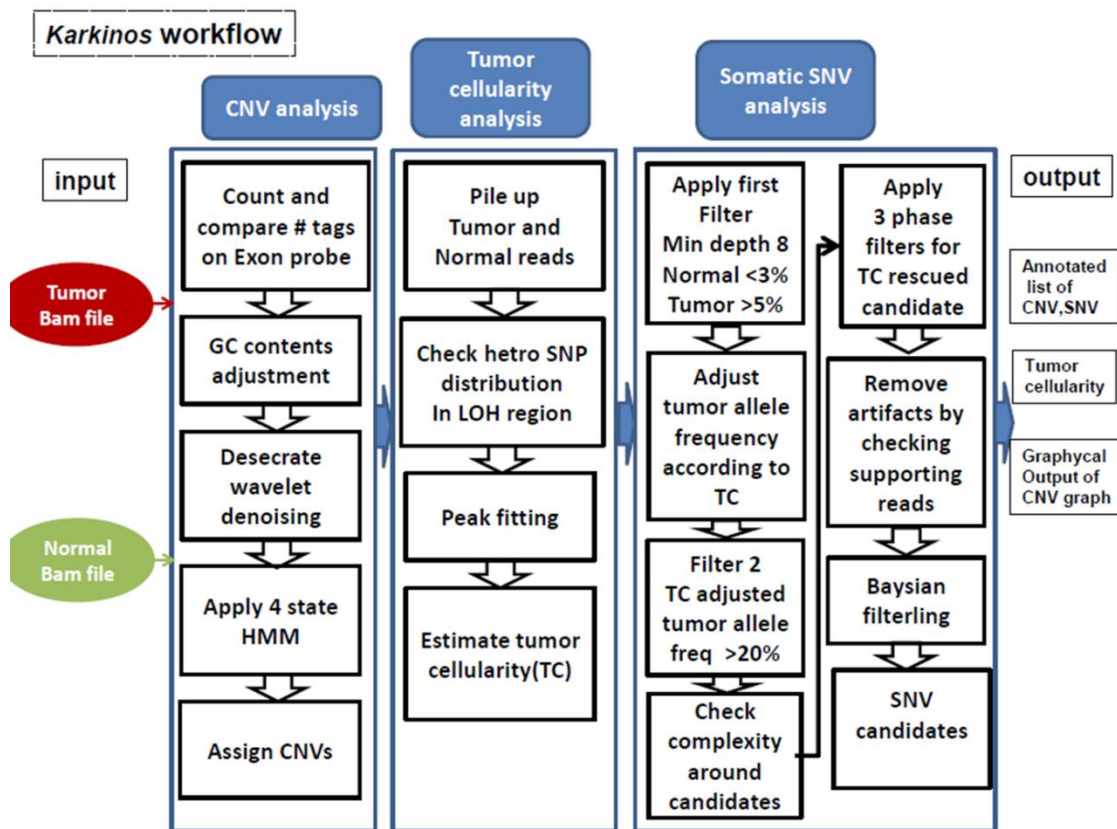


図 6 Karkinos のワークフロー

遺伝子変異の同定に用いた手順を示す。Exon プローベのシーケンスタグを算出し、GC 含有率による修正やノイズの低減を行いコピー数変化を同定。腫瘍含有率を算出し、リード数やアレル頻度などのフィルターをかけて、遺伝子変異の候補を算出している。

5) クラスタ解析

全エクソンシーケンス解析について、階層的クラスタリングによる分類を行った。一塩基置換の種類としては、C:G から A:T、C:G から T:A、C:G から G:C、さらに T:A から A:T、T:A から C:G、T:A から G:C といった 6 パターンが存在する。これら 6 種類の置換パターンの頻度をもとにして、階層的クラスタリングを構築した。

6) 統計学的解析

二群間における各因子の相関は、Mann-Whitney U 検定、Welch's test、Fisher's Exact Test により解析し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。JMP pro 統計解析ソフト (version 11.2) を用い、無増悪生存期間 : Progression Free Survival (PFS) 、全生存期間 : Overall Survival (OS) について Kaplan Meier 法で生存曲線を作成し、予後の差を Log-rank test により検定した。

7) 他がん腫における遺伝子変異の数と明細胞腺癌で同定された遺伝子変異の数の比較

卵巣明細胞腺癌において同定された遺伝子変異の数と他がん腫における遺伝子変異の数を比較するために、The Cancer Genome Atlas のデータベース (<http://cancergenome.nih.gov/>) より 27 のがん腫 3,158 例の全ゲノム、全エクソン解析結果をダウンロードし、コーディング領域における変異を抽出、それぞれの症例における変異数を底 10 として対数変換し、比較を行った。

第3章 結果

<1> 全エクソンシーケンス

1) シーケンス結果

卵巣明細胞腺癌 78 症例について、腫瘍と正常 DNA のそれぞれについて、全エクソン解析を行った。コーディング領域における平均のリード数 (カバレッジ) は腫瘍サンプルで $\times 118 \pm 30$ (mean \pm SE)、正常サンプルで $\times 106 \pm 29.4$ (mean \pm SE) であった (図 7)。すなわち、腫瘍・正常 DNA とともに、蛋白翻訳領域のエクソンについて、平均で 100 回以上のリードのシーケンスが得られたことになる。また、 $\times 10$ 以上のカバレッジが得られているコーディング領域は平均で 97% であり、 $\times 20$ 以上の領域は平均 92% であった (図 8)。各サンプルにおける腫瘍含有率は $58.3 \pm 24.8\%$ (mean \pm SE) で、70 症例では 20% 以上の腫瘍含有率であった。78 症例のうち推定腫瘍含有率が 20% 未満で、かつ同定された遺伝子変異が 10 個に満たない 3 サンプルを除外し、75 例を解析対象とした。75 症例のコーディング領域 (CDS) において同定された遺伝子変異の総数は 12,586 個であり、そのうち 11,585 個が塩基置換、1,001 個が挿入・欠失変異であった。このうち、アミノ酸配列が異なる変異 (Non-synonymous Mutation) は 9,202 個であり、その内訳は、一塩基の置換 single-nucleotide variants (SNVs) が 8,397 個、挿入・欠失型の変異が 805 個はであった。同定されたすべての遺伝子変異を対象とすると各症例で同定された数は 12-1681 個であり、その中央値は 63 個 (四

分位範囲：47.25 - 115.5) であった。この遺伝子変異の数が他のがん腫と比べて多いかどうかを比較するために、TCGA のデータベースより取得した 27 のがん腫と比較をおこなった。その結果、卵巣明細胞腺癌は 10 番目に変異の多いがん腫であった (図 9)。変異数が近いがん腫は、頭頸部がんやびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫であった。次に、TCGA データベースから得られた上皮性卵巣癌で最も頻度の高い組織型である卵巣漿液性腺癌と卵巣明細胞腺癌との遺伝子変異数を比較した。その結果、変異数は卵巣明細胞腺癌のほうが有意に多いことが示された ($p < 0.0001$, Welch's t-test) (図 10)。

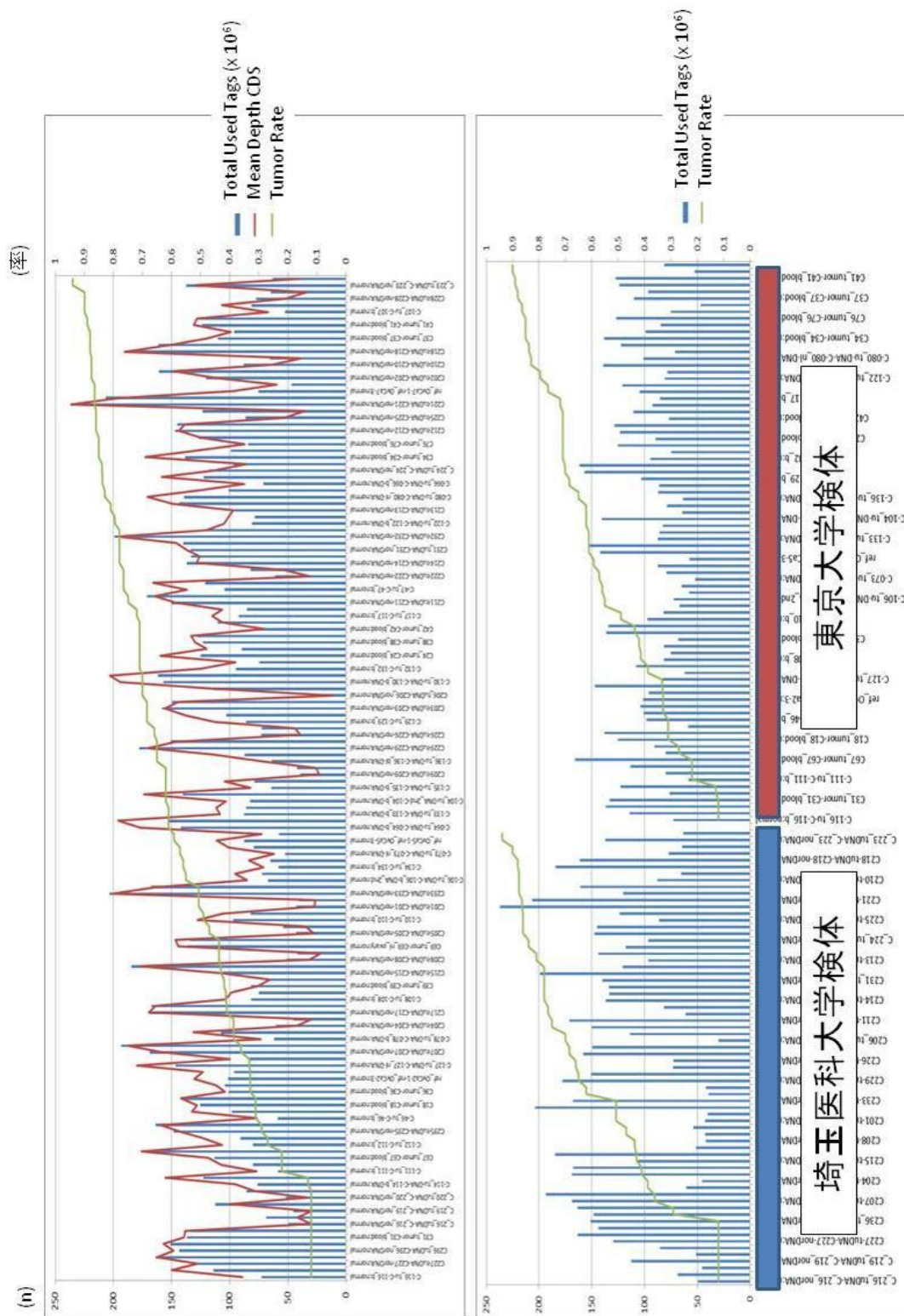


図 7 全エクソン解析のシーケンスサマリー

78 検体の全エクソンシーケンス解析について、得られたリード数 (Total Used Tags $\times 10^6$)、Coding 領域 (CDS: Coding DNA Sequence) の平均シーケ

ンス深度 (Mean Depth CDS)、腫瘍含有率 (Tumor Rate)を一覧にまとめた。
 左は2施設のものに合わせて、腫瘍含有率 (Tumor Rate) が低い順に並べて
 表示した。右は各施設の検体毎に分けて表示した。

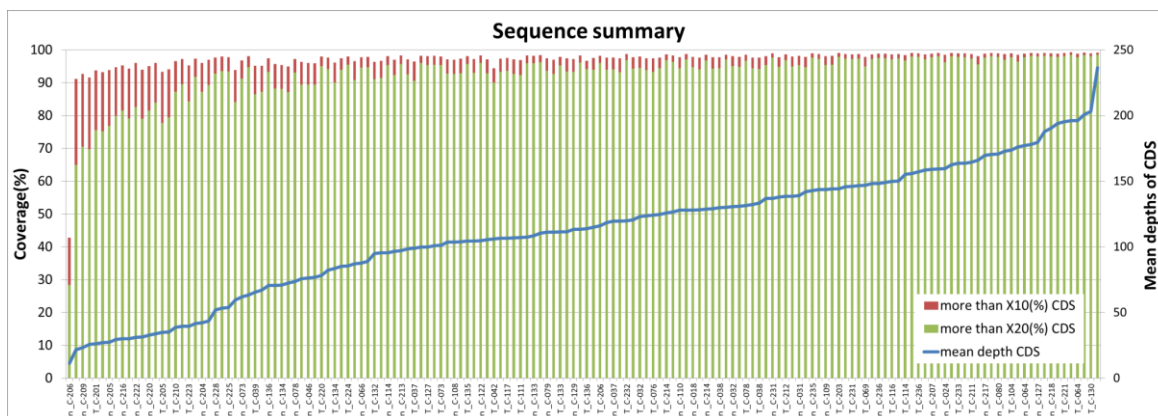


図 8 全エクソン解析におけるシーケンス深度とそのカバー率

78 検体の全エクソンシーケンス解析について、Coding 領域のリード
 数を調べ、シーケンス深度が 10 回以上の領域の比率、20 回以上の領域
 の比率をそれぞれ算出した。

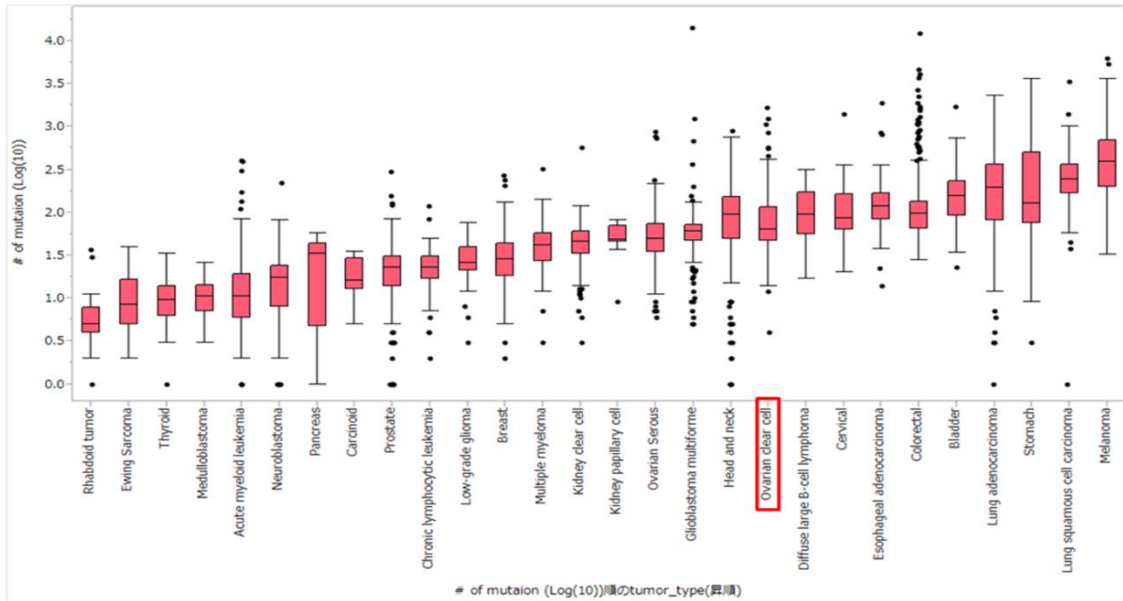


図 9 全エクソン解析における癌腫毎の変異遺伝子数の比較

TCGA データベースをもとに、癌腫毎に変異遺伝子数の比較を Box plot にて行った。同一腫瘍内でも個体差が大きい、卵巣明細胞腺癌は 28 種類の悪性腫瘍の中で 10 番目に多かった。

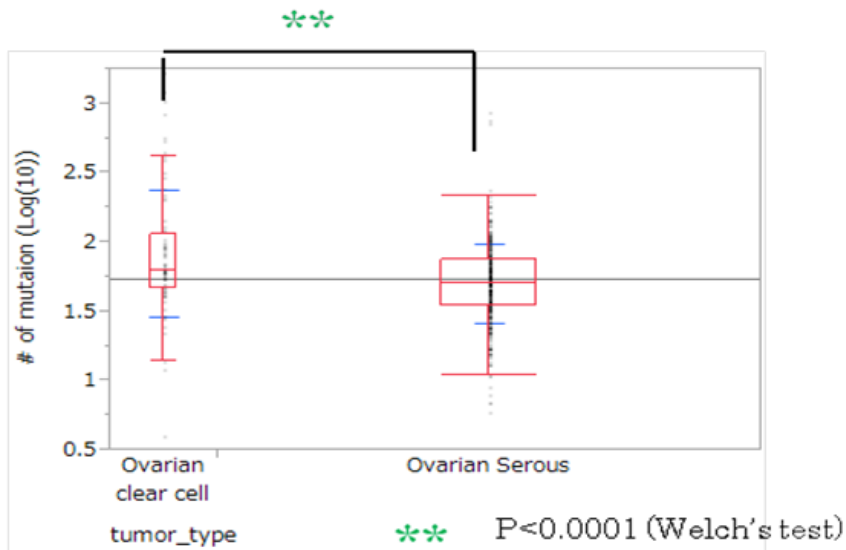


図 10 卵巣明細胞腺癌と卵巣漿液性腺癌における変異遺伝子数の比較

本研究における卵巣明細胞腺癌と既報の卵巣漿液性腺癌 (Serous) の結果を、Box plot にて比較した。明細胞腺癌において、変異個数が有意に多く存在した。

2) 遺伝子変異数の個体差とミスマッチ・DNA 修復に関わる遺伝子変異

次に遺伝子変異数の個体差に注目した。同定されたすべての遺伝子変異の数で比較すると、75 症例中で 54 症例 (72%) では遺伝子変異の数が 100 個未満であった。残りの 21 症例では 100 個以上で、そのうち 3 例 (4.0%) において 1,000 以上の変異が同定されていた (図 11)。様々ながん腫の一部の症例で、遺伝子変異数の多い "hypermutator" と呼ばれる症例が存在することが知られているが (4, 14, 31)、卵巣明細胞腺癌においても同様に "hypermutator" が存在することが明らかとなった。

"hypermutator" の原因としては、ミスマッチ修復遺伝子の変異や DNA 複製とヌクレオチド除去修復に関わる遺伝子の変異が知られている (14, 31)。そこで、遺伝子変異個数が 100 個以上であった 21 症例について、ミスマッチ修復遺伝子である mutL homolog 1, 3 (それぞれ *MLH1*, *MLH3*)、mutS homolog 2, 3, 4, 5, 6 (それぞれ *MSH2*, 3, 4, 5, 6)、PMS1 homolog 2, mismatch repair system component (*PMS2*)、および DNA 複製とヌクレオチド除去修復に関わる遺伝子である polymerase ϵ (*POLE*) の遺伝子変異について検討した。遺伝子変異数が 1,000 を超える 3 症例においては、いずれかの遺伝子変異を有しており、1 例目は *MLH4* の体細胞変異と *MSH6* (NM_000179: p.R178C) の生殖細胞系列変異、2 例目は *MLH3*、*PMS2*、*POLE* の体細胞変異、3 例目は *MLH1*、*MSH3*、*MSH5* の体細胞変

異と *MSH2* (NM_000251: p.G40S), *MSH6* (NM_000179: p.F432S) の生殖細胞系列変異であった (図 11)。遺伝子変異数が 100-1,000 個の 18 例については、*POLE* の体細胞変異が 1 例、*MSH2* の体細胞変異が 1 例で計 2 例に異常が認められるのみであった。遺伝子変異数が 1000 個以上でミスマッチ修復遺伝子および *POLE* の変異を有していた 3 症例では、症例数が少ないため有意差はないものの、再発例を認めず、予後良好な傾向を示した (図 14)。

また、以前の子宮体癌の報告で *POLE* の変異を有する症例は、1 症例あたり平均で 6000 個程度の変異を有する “ultra-hypermutator” であり、ホットスポットとしてコドン 286, コドン 411 の 2 か所が報告されている (31)。しかし、本研究で同定された 2 症例の *POLE* の変異は p:A649D と p:V1419del で、これらホットスポットとは異なり、エキソヌクレアーゼドメインに影響を与える体細胞性変異でもなかった (図 13)。

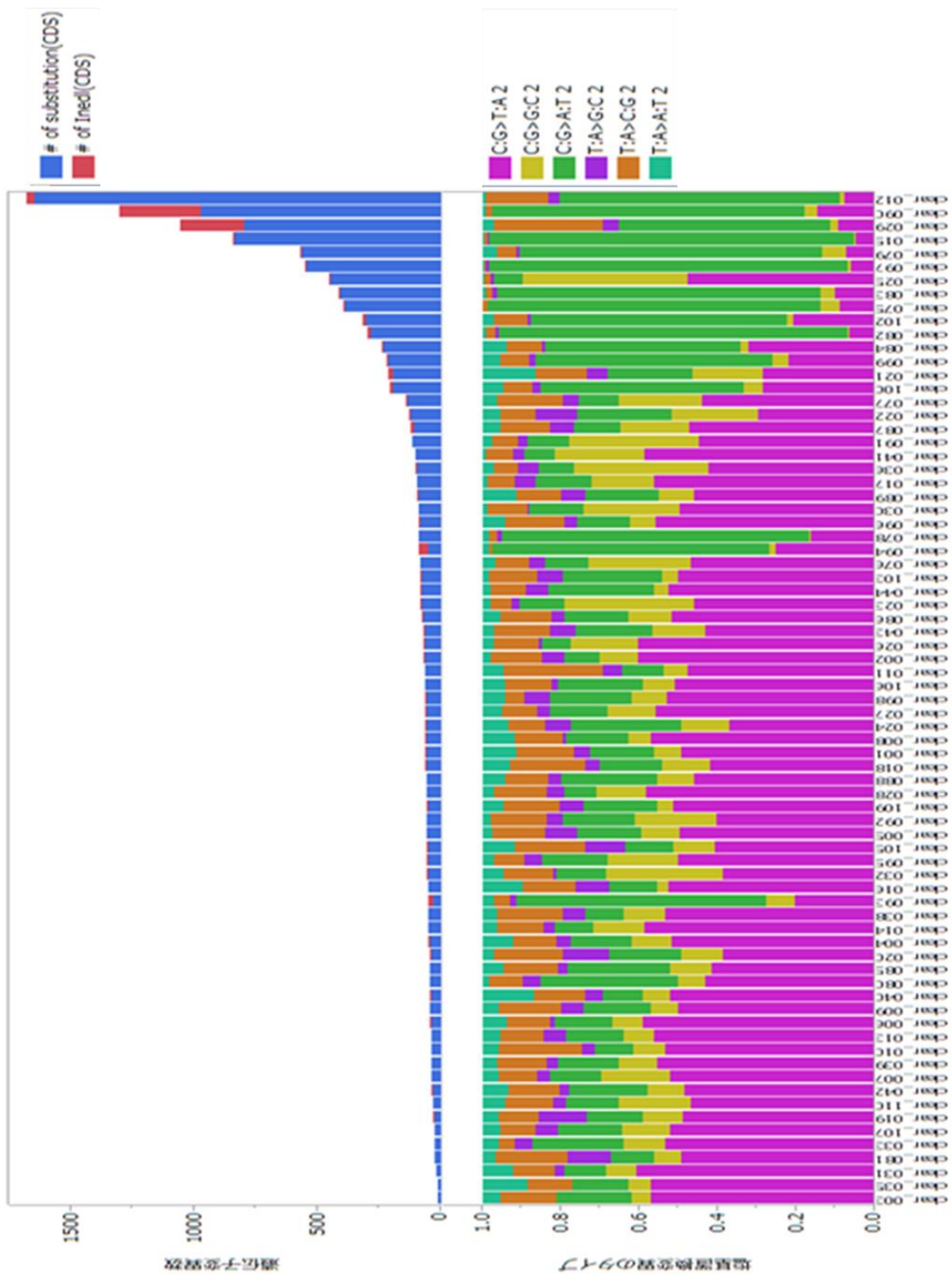


図 11 卵巣明細胞腺癌 75 症例における変異遺伝子個数と変異の種類

各検体毎に遺伝子変異個数、及び塩基置換のパターン、欠失・挿入による変異の頻度を左に示す。右は個々の症例における塩基置換のパターンを比率で表した。

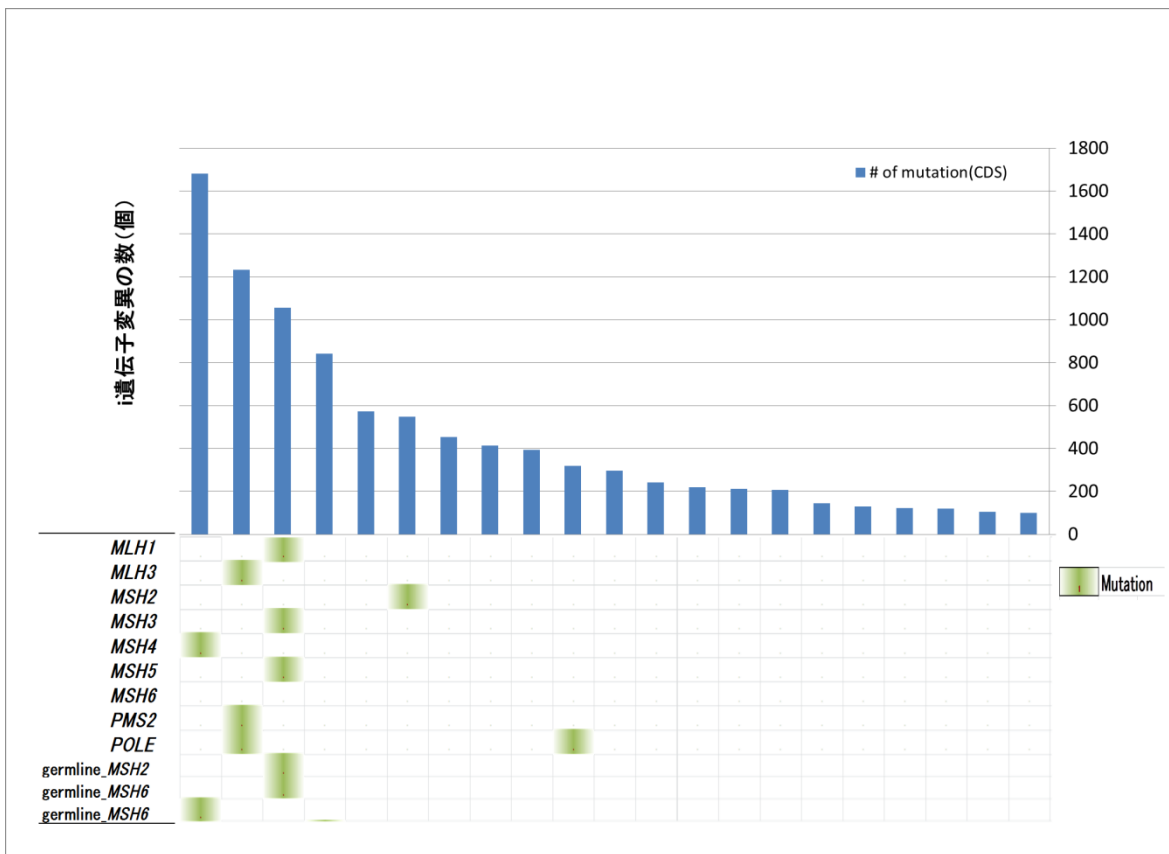


図 12 遺伝子変異個数が 100 個以上であった 21 症例における、ミスマッチ修復遺伝子、*POLE* 変異の検索

上段は各症例の遺伝子変異数、下段はミスマッチ修復遺伝子および *POLE* 遺伝子変異の有無。

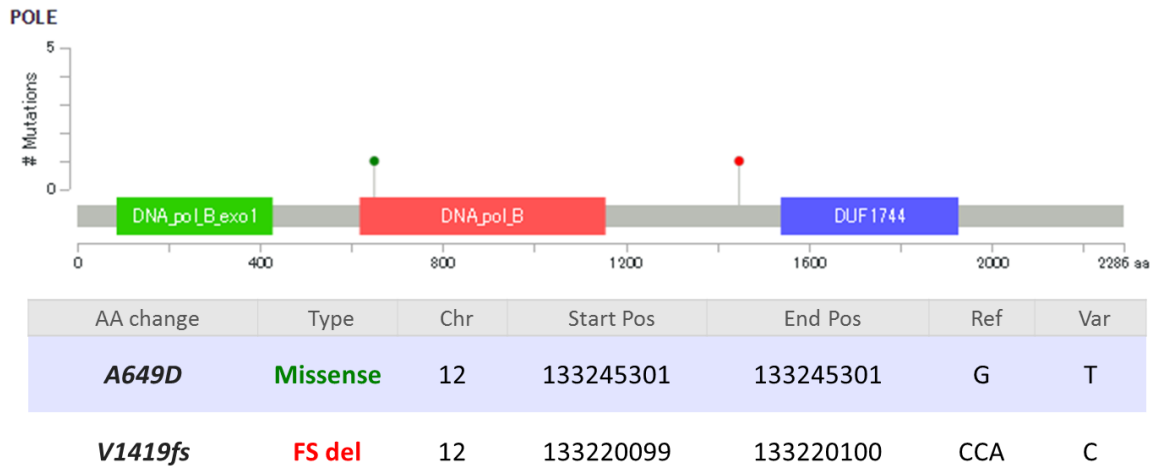


図 13 *POLE* 変異の部位

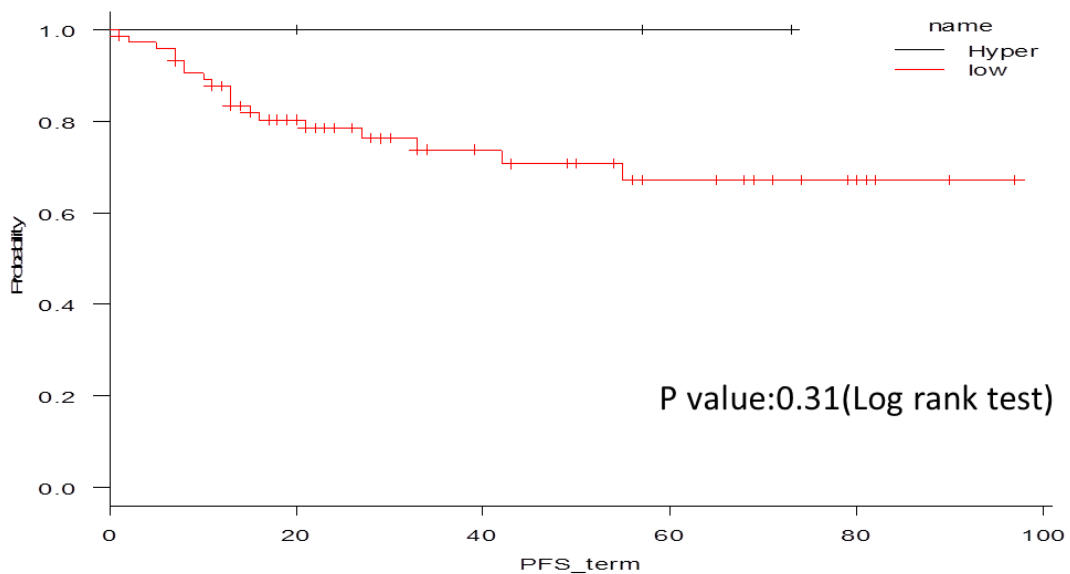


図 14 “hypermutator” 3 症例の Progression free survival

3) 遺伝子変異塩基置換パターンに基づく分類

解析の対象とした 75 症例を、サブグループに分類するために遺伝子変異の中で塩基置換のパターンについて各症例毎に検討した。コーディング領域におけ

るすべての塩基置換変異 (Synonymous と Non synonymous 変異の両方) を C:G>T:A、C:G>G:C、C:G>A:T、T:A>G:C、T:A>C:G、T:A>A:T の 6 パターンに分類し、それぞれの比率を算出した。算出した結果を図 11 の右に示す。ほとんどのサンプルで、C:G>T:A の置換が主体であるが、一部の症例では C:G>A:T の置換が主体となっている事が明らかとなった。次に、この 6 パターンの割合を成分として階層的クラスタリングを行い、塩基置換パターンを元にした 2 つのサブグループを抽出した。C:G>T:A を主体とするクラスター (C>T クラスター) が 59 症例 (79%)、C:G>A:T を主体とするクラスター (C>A クラスター) が 16 症例であった (図 15)。

それぞれのクラスターにおいて、塩基置換がどのような部位に生じているかを検討するため、同定されたすべての遺伝子変異を変異している塩基の前後の塩基も含めた 96 パターンも含めて分類した。C>A クラスターでは、C:G>A:T の変異の多くが CCX 配列の中央の C に起こっている事が明らかになった (図 16)。一方の C>T クラスターでは、変異の多くが XCG の C に生じていた。そこで、C>T クラスターにおける C:G>T:A 変異が CpG で生じている割合を各症例で確認した。59 症例中 41 症例 (69.4%) では、C:G>T:A 変異の 50%以上が CpG における C の変異であった (図 17)。残りの 18 症例における 96 パターンでの偏りを確認すると、C:G>T:A 変異以外に C:G>G:C 変異にも集積が見られ、変異は TCX

配列に高頻度に起こっている事が明らかとなった（図 18）。96 パターンの分類で、それぞれのクラスターで主体となっている C:G>A:T 変異、C:G>T:A 変異において、変異の生じる配列には偏りがある事が明らかとなった。

各クラスターにおいて、年齢、ステージ、リンパ節転移、遠隔転移、予後といった臨床学的因子および遺伝子変異の数との相関を確認した。臨床学的因子との相関は見られなかったが、C>A クラスターでは遺伝子変異数（ 516 ± 354 個）が C>T クラスター（ 72.1 ± 32.4 個）に比し、有意に多いことが確認された（ $p < 0.0001$, Welch's t-test）（図 19, 表 3）。C>T クラスターと C>A クラスターの予後を、Progression Free Survival (PFS)、Overall Survival (OS) のそれぞれについて比較したところ、Log rank test においていずれも予後に有意差は認められなかった（図 20）。

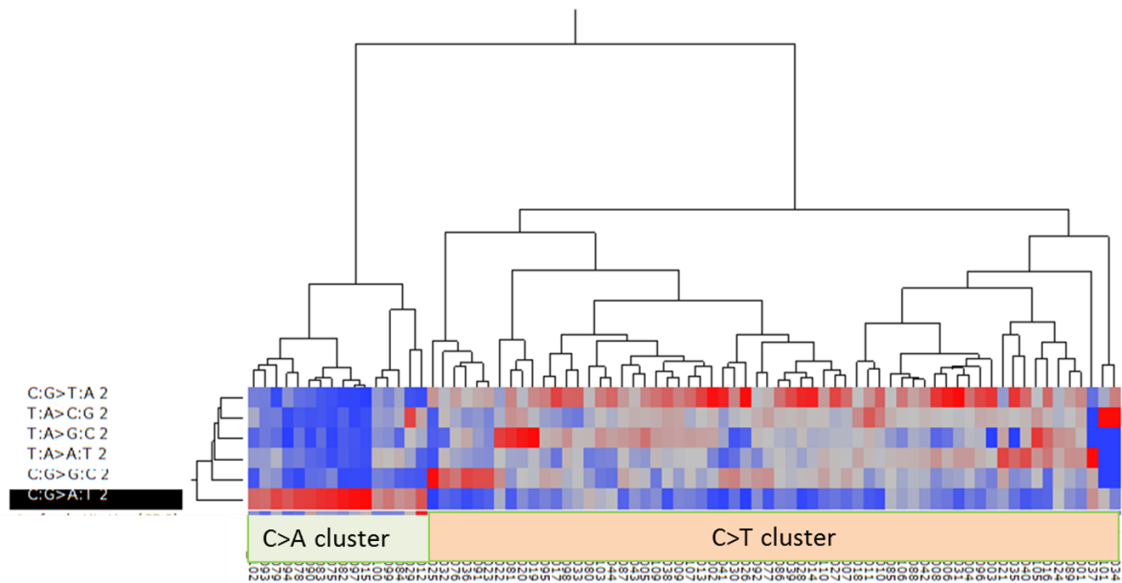


図 15 遺伝変異パターンによる階層的クラスタリング

塩基置換のタイプ (C:G>T:A、T:A>C:G、T:A>G:C、C:G>G:C、C:G>A:T の 6 種類) を元に、階層的クラスタリングを行った。C:G>A:T 置換が優位なクラスター (C>A クラスター) と、C:G>T:A 置換が優位なクラスター (C>T クラスター) の 2 群に大別された。

	C>Aクラスター	C>Tクラスター	p
n	16	59	
遺伝子変異数			
平均値	516	72	
中央値	356	61	Welch's t-test <0.0001
年齢			Welch's t-test
平均値	55.3	55.9	NS
臨床進行期 (Stage)			
1	11 (69%)	39 (66%)	Fisher's exact test
2	3 (19%)	6 (10%)	0.62
3	2 (12%)	9 (15%)	(stage1+2
4	0	5 (8%)	vs stage3+4)
リンパ節転移 (pN)			
陰性 (0)	11	34	Fisher's exact test
陽性 (1)	1	4	1
郭清せず (X)	4	21	
遠隔転移 (pM)			
陰性 (0)	16	54	Fisher's exact test
陽性 (1)	0	5	0.58
再発			
なし	14	44	Fisher's exact test

表 3 塩基置換パターンによるクラスタリングと遺伝子変異数、臨床病理学的因子との相関

C>A クラスターで有意に遺伝子変異の数が多い事が明らかとなった。臨床進行期については、1期と2期および3期と4期に分けて Fisher's exact test を行った。

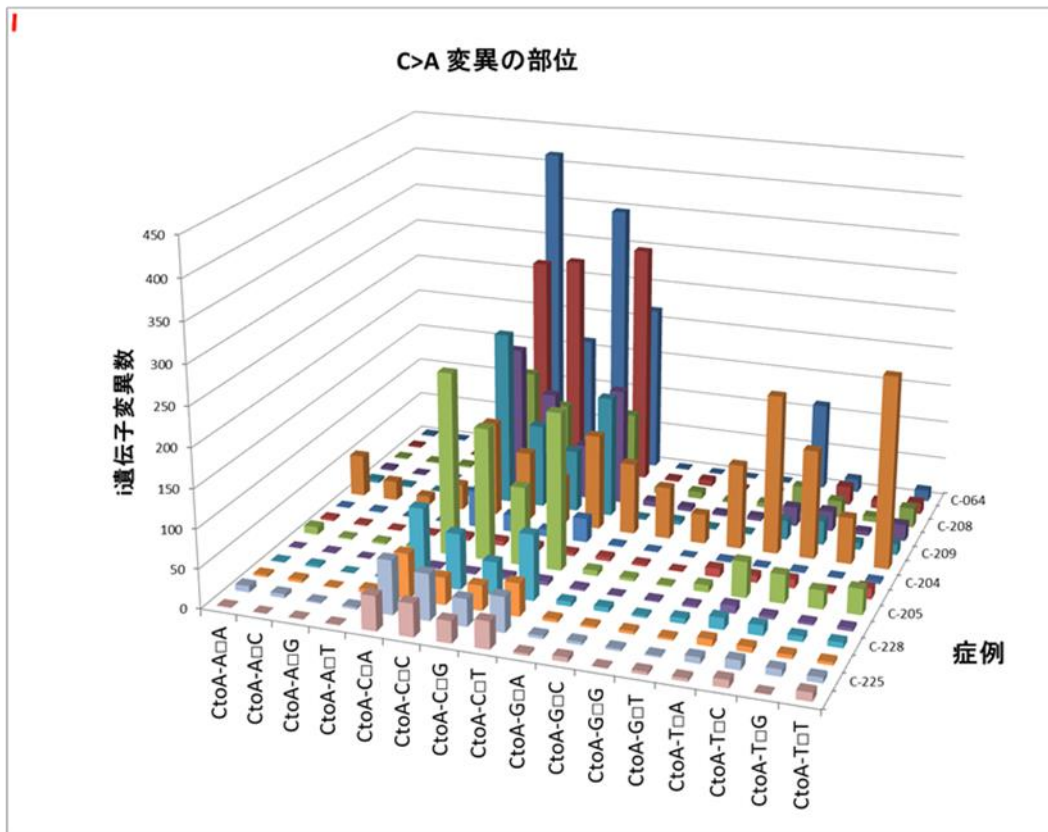


図 16 C>A クラスターにおける塩基置換の生じやすい配列分析

C>A クラスターにおいて、塩基置換がどのような配列で生じやすいかを検討した。塩基置換を呈しているものを□で表し、その前後の塩基が A, C, G, T のいずれであるかを示している。C から A への置換が生じている手前の塩基は C である配列 (CCX 配列) が多い。

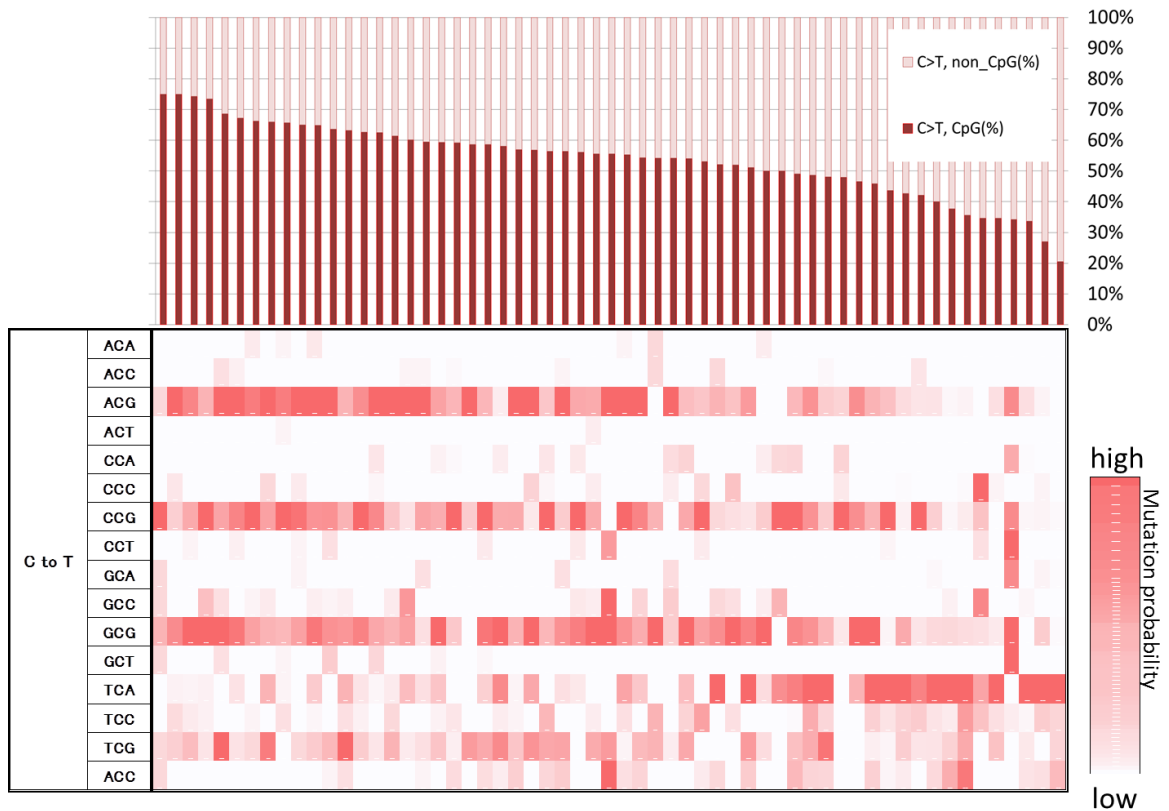


図 17 C>T クラスタにおける C:G>T:A 変異のうち、CpG における変異数の割合

C>T クラスタの 59 症例。上段は C:G>T:A 変異が CpG に生じている割合を示す。横方向はサンプル、縦方向は割合。下段は塩基置換変異が生じている前後の塩基も含めて C:G>T:A 変異を 16 パターンに分類している。ヒートマップの色が濃い箇所に塩基置換変異の頻度が高いことを表す。69.4% (41 症例) で、C:G>A:T 変異の 50% 以上が CpG で生じていた。残りの 18 症例では TCA 配列の C に変異が多い。

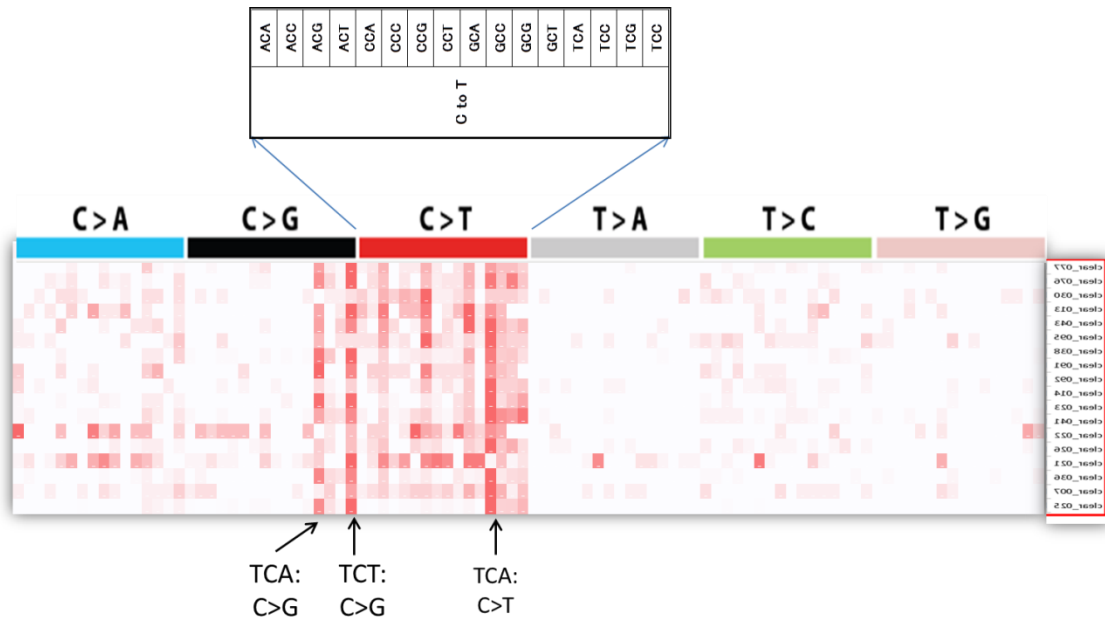


図 18 C>T クラスターにおいて、CpG での塩基置換変異が少ない 18 症例の塩基置換の分布

横軸は塩基置換変異のパターンと、変異している塩基の前後の塩基を考慮した 96 パターンを表す。縦方向はサンプルで、ヒートマップの色が濃い箇所に塩基置換変異の頻度が高い事を表す。

C:G>T:A 変異以外に C:G>G:C 変異も見られ、変異は TCX 配列に高頻度に行っている。

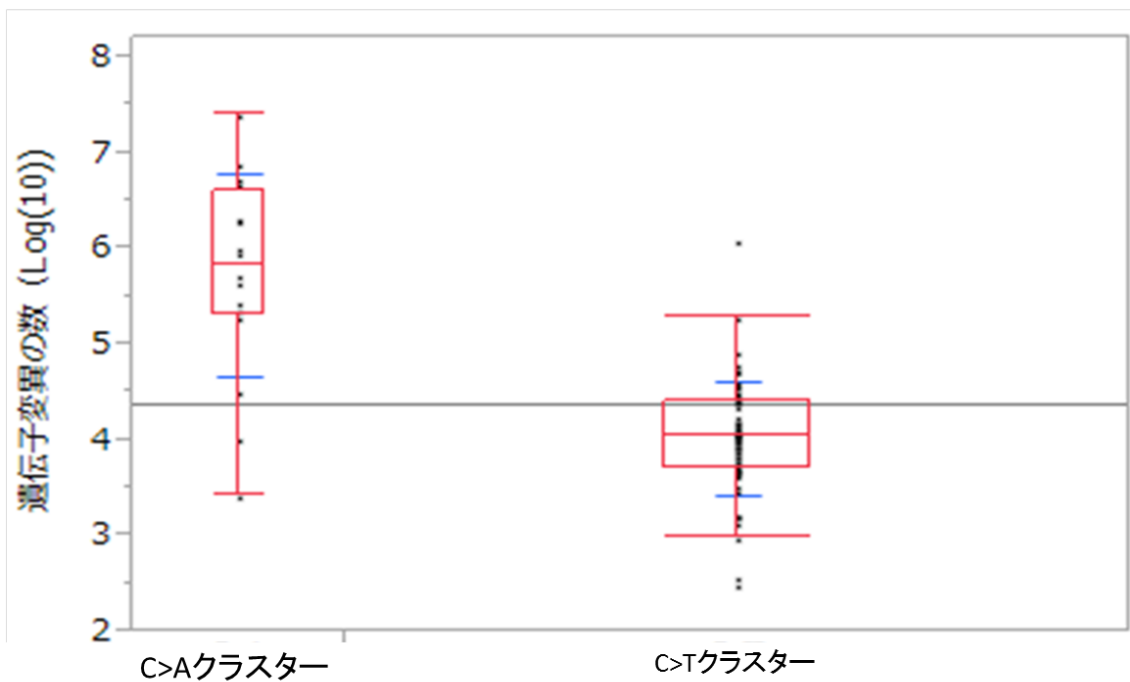


図 19 塩基置換パターンによるクラスターと遺伝子変異数.

C>A クラスター (n=16) と C>T クラスター (n=59) で遺伝子変異数について、Box plot を作成した。(p<0.001 by Welch's t-test)。青は平均と標準偏差を示す。赤は分位点を示し、箱を横切る線は標本の中央値、箱の両端は 25% と 75% の分位点、ヒゲの両端はそれぞれ第 1 四分位点-1.5 (四分位範囲)、第 3 四分位点+1.5 (四分位範囲) である。

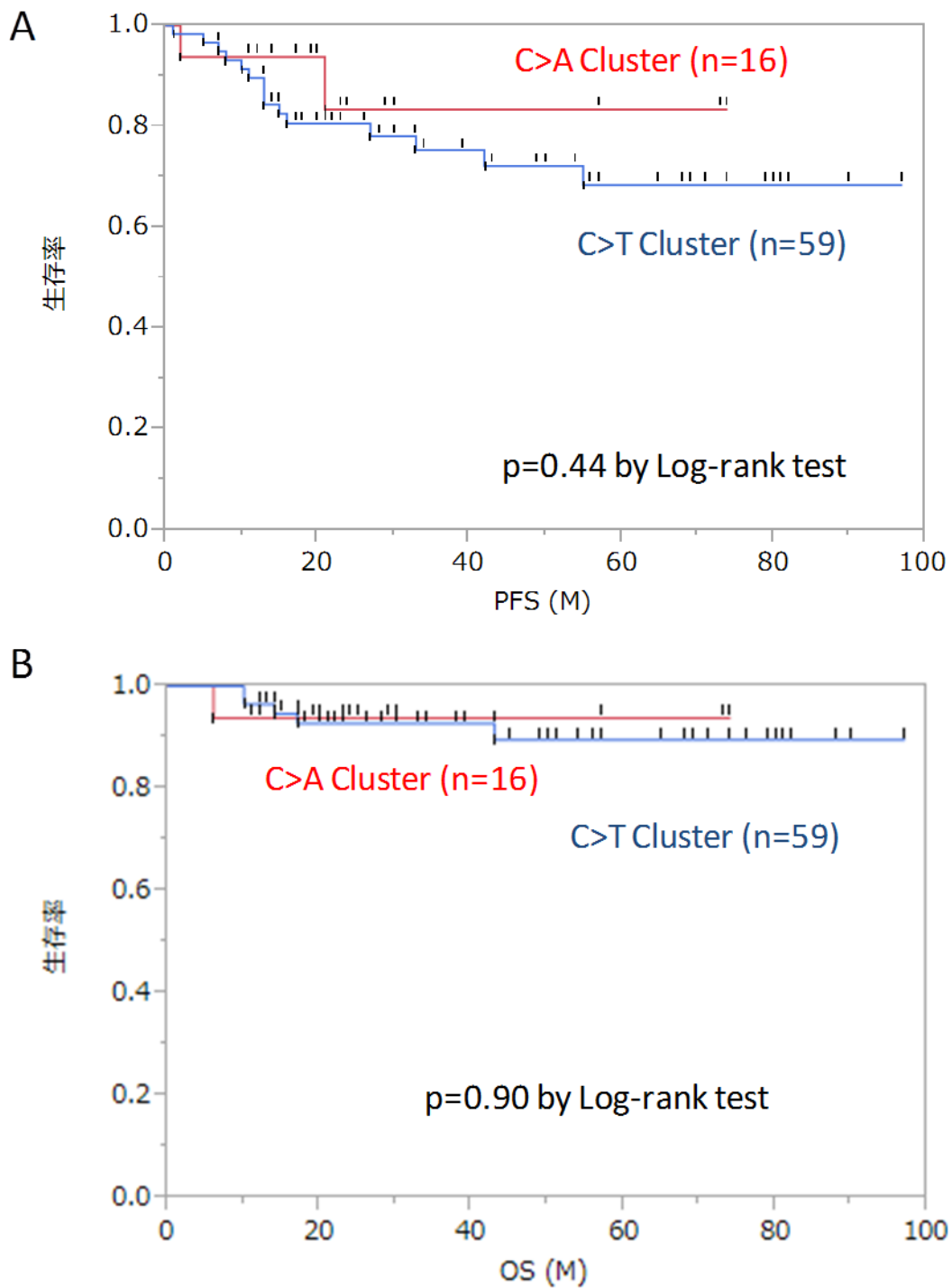


図 20 塩基置換パターンによるクラスターと予後

C>A クラスター (n=16) と C>T クラスター (n=59) 間における予後を比較した。Kaplan-Meier 生存曲線を作成し、両群間の予後を A. Progression Free Survival (PFS)、および、B. Overall Survival (OS)について、それぞれ Log rank test により比較した。予後に有意差は認められなかった。

4) 高頻度の変異遺伝子群の同定とその特徴

次に、ドライバー変異を同定するために、卵巣明細胞腺癌 75 症例において高頻度に変異が認められる遺伝子を抽出した。コーディング領域における変異のうち、synonymous mutation を除外し検討した。高頻度に変異を来たしていた上位 4 遺伝子は、これまで報告されているように、*ARID1A* (n=46, 61.3%)、*PIK3CA* (n=41, 54.7%)、*KRAS* (n=10, 13.3%)、*TP53* (n=7, 9.3%) であった (図 21)。

同定された *ARID1A* はコーディング領域全般に広がっており、半数の症例で複数個所に変異を認めた。総計 69 個の変異が同定され、そのうち 53 個の変異が nonsense mutation あるいは frameshift Mutation であり、機能喪失型変異と考えられた。*PIK3CA* は Exon9, 20 が 34 例 (83%) を占め、変異の hot spot である E542, E545, H1047 に生じた変異が 26 例 (63%) を占めた (表 3)。*KRAS* 変異 (n=10) は codon12, 61 (G12, Q61) が全例を占め、その他の hot spot である G13 に変異は認められなかった。*TP53* 変異 (n=7) はすべて DNA binding domain の変異であった (図 22)。

これら 4 遺伝子の変異の有無と予後の相関は認められなかった (図 23)。しかしながら、4 つの遺伝子のうち、*TP53* については、変異陽性 7 例のうち 4 例 (57%) が臨床進行期 III/IV 期 (III 期 2 例、IV 期 2 例) であり、進行癌症例が有意に多いことが明らかとなった (表 5)。また、*PIK3CA* の変異

を持つ症例は有意に年齢が低く、*TP53* の変異を持つ症例は年齢が有意に高い特徴がみられた（図 24）。

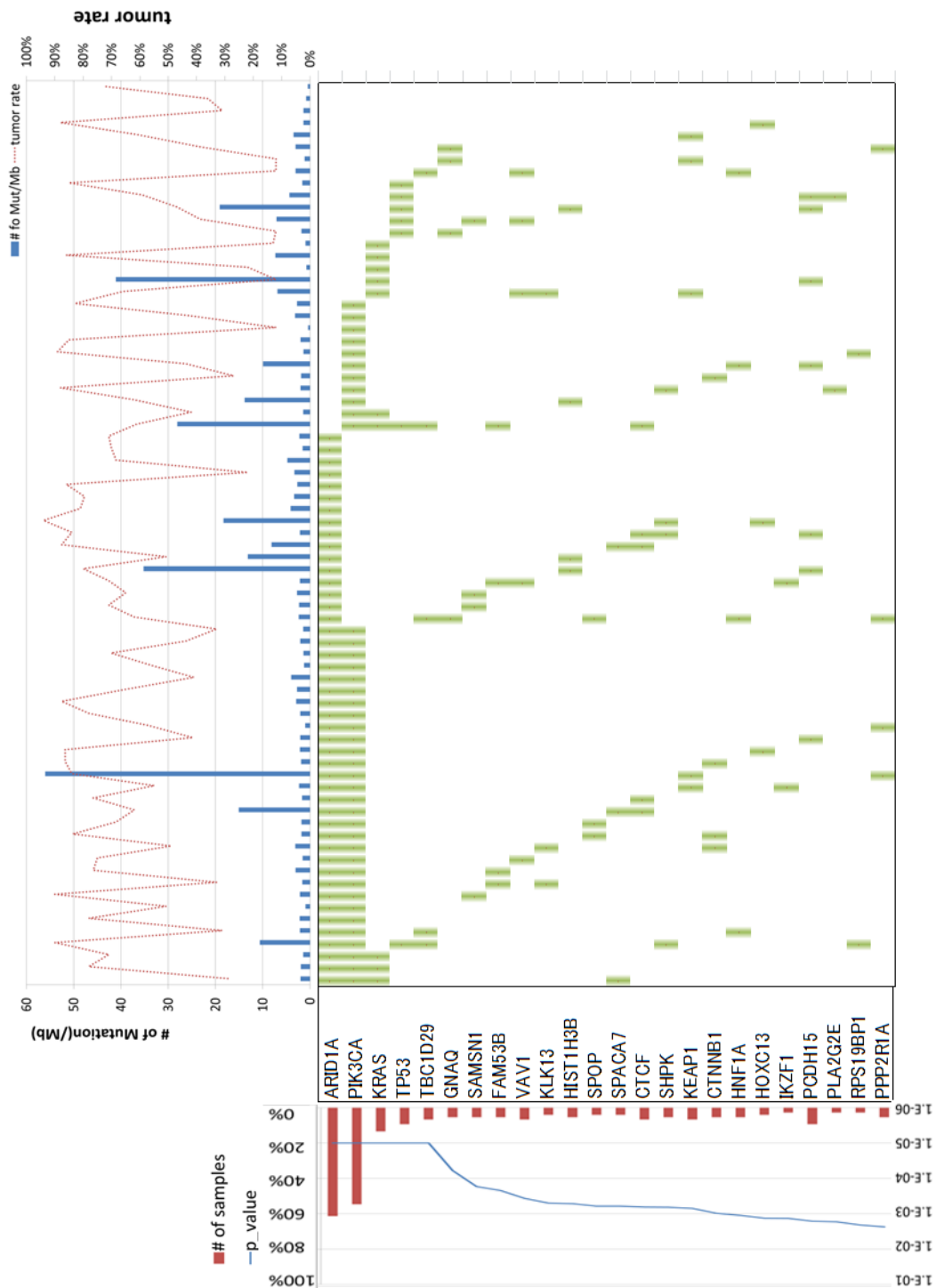


図 21 卵巣明細胞腺癌における変異遺伝子リスト

変異遺伝子の一覧を示す。縦に各症例を並べており、左側の棒グラフは 1Mb あたりの変異数を、折れ線グラフは解析結果から算出された腫瘍含有率を示す。右側については、Coding 領域のサイズにあわせてその変異頻度の高い順 (p value の低い順) にリストアップを行った。各症例毎の変異重複頻度に着目

し、上位遺伝子変異陽性症例から順に配列した。

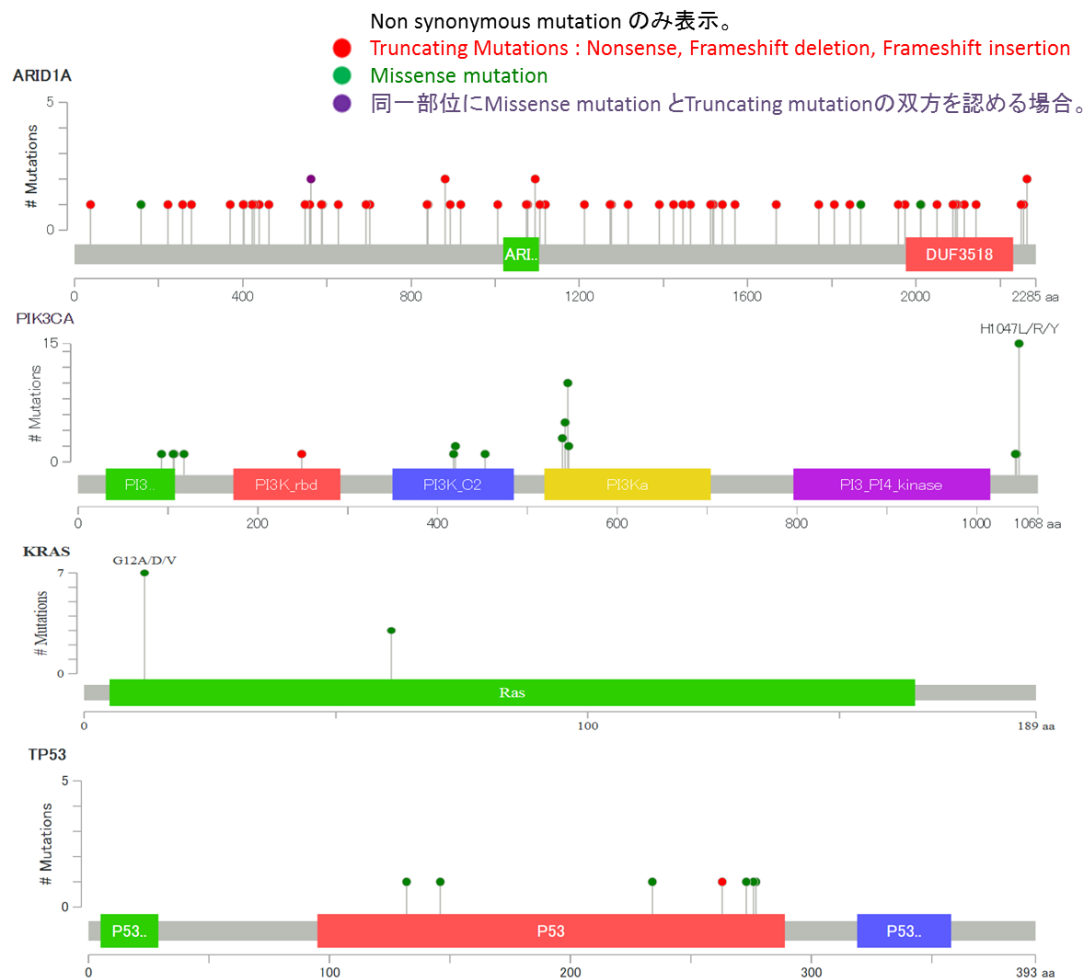


図 22 卵巣明細胞腺癌における高頻度変異遺伝子の変異部位と種類
ARID1A, *PIK3CA*, *KRAS*, *TP53* の 4 遺伝子について、変異部位と種類を一覧に示す。

Position	個数	頻度(n=75)
H1047R	12	16.0
E545K	7	9.3
E542K	4	5.3
P539R	4	5.3
C420R	3	4.0
Q546K	3	4.0
112_113del	1	1.3
115_116del	1	1.3
A1046A	1	1.3
E418K	1	1.3
E453K	1	1.3
E545Q	1	1.3
G106V	1	1.3
G118D	1	1.3
H1047L	1	1.3
H1047Y	1	1.3
M1043I	1	1.3
N1044S	1	1.3
N107I	1	1.3
Total	46	

変異あり 41症例
 変異箇所 46部位(複数変異陽性5例)
 総症例数 75症例

表 4 *PIK3CA* 遺伝子変異の種類と頻度

黄色は他癌腫で変異の好発部位である E542, E545, H1047 の変異である。

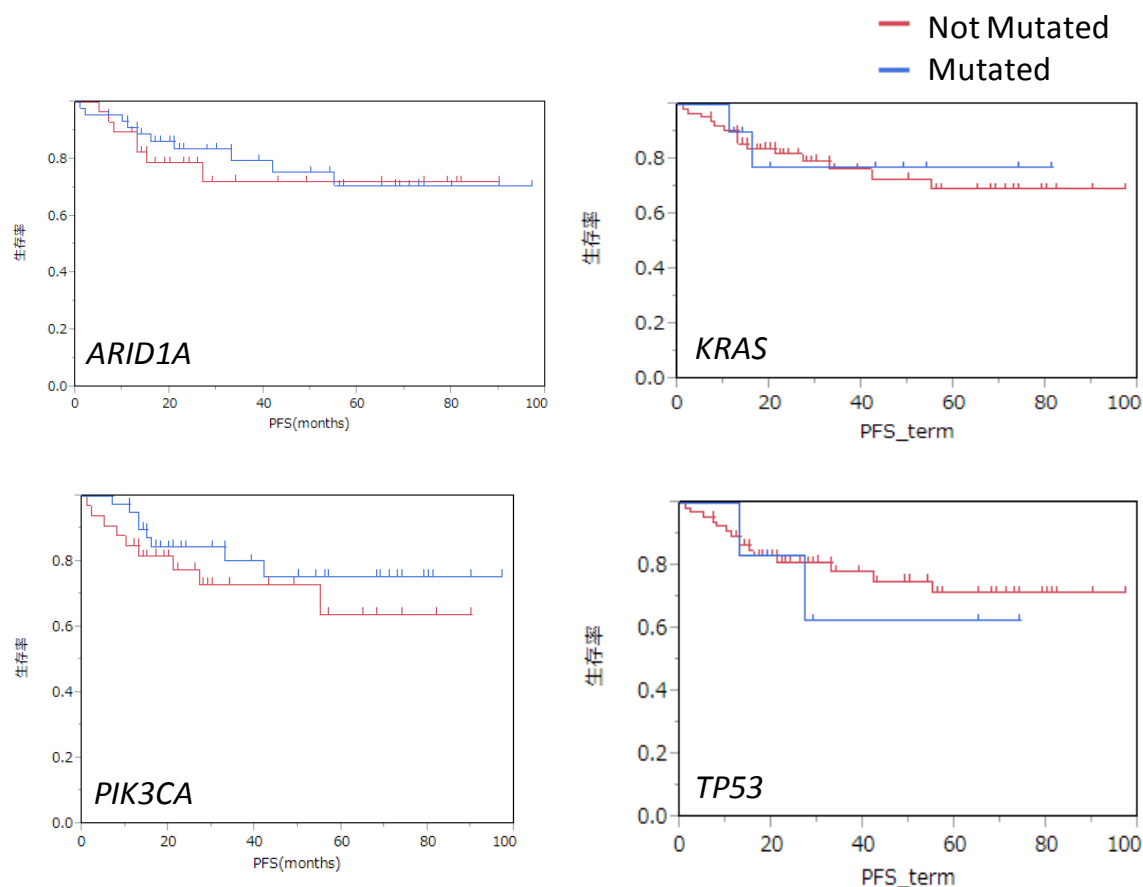


図 23 遺伝子変異の有無と予後

変異陽性率の高い4遺伝子について、変異の有無と予後（PFS）の関連をKaplan-Meier生存曲線におけるLog rank testで検討した。いずれの遺伝子変異も単独では予後と有意な相関を示さなかった。

		ARID1A			PIK3CA			KRAS			TP53		
		Mut	WT	p value	Mut	WT	p value	Mut	WT	p value	Mut	WT	p value
stage	I/II	37	22	0.77	34	25	0.40	9	50	0.68	3	56	0.034
	III/IV	9	7		7	9		1	15		4	12	

表 5 各遺伝子変異と臨床進行期との相関

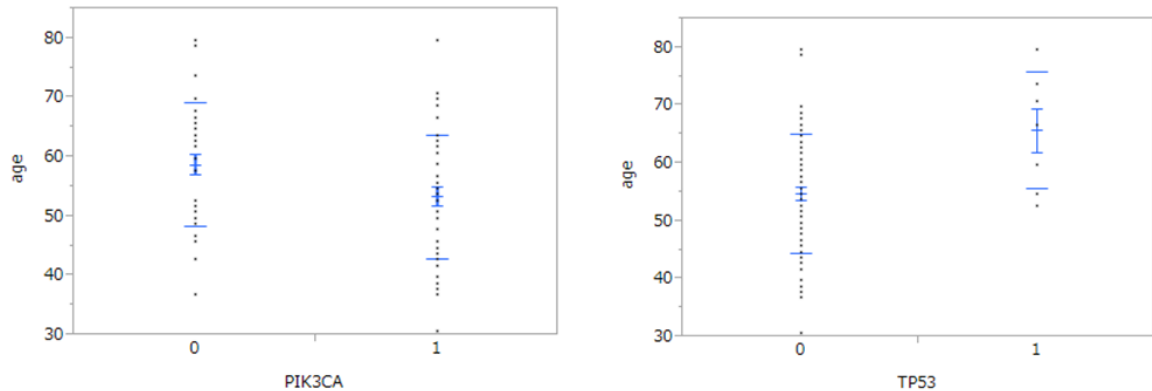


図 24 *PIK3CA*, *TP53* 遺伝子変異の有無と年齢

PIK3CA, *TP53* 遺伝子変異の有無と年齢との相関を比較検討した。0 は変異陰性を、1 は変異陽性を示す。Mann-Whitney's U test において、*PIK3CA* 変異陽性は有意に若年層に多く、*TP53* 変異は有意に高齢者に多いことが明らかとなった (いずれも $p < 0.05$)。青は標準偏差を表す

5) *ARID1A*, *PIK3CA*, *KRAS*, *TP53* 遺伝子変異の共存性と相互排他性

高頻度に変異が認められた 4 遺伝子について、それぞれに対する共存性と排他性を検討した。まず、*ARID1A* 変異陽性例では 65% に *PIK3CA* 変異陽性 (46 例中 30 例) であり、逆に *PIK3CA* 変異陽性例では 73% (41 例中 30 例) で *ARID1A* 変異が陽性であった。すなわち、*ARID1A* と *PIK3CA* の変異を有意に共存する事が明らかとなった ($p = 0.031$ by Fisher's exact test) (表 6)。次に、*ARID1A* 変異陽性例における *KRAS* 変異は 6% (46 例中 3 例) であり、*KRAS* 変異陽性例の 10 例のうち 7 例は *ARID1A* 変異陰性の 29 症例で確認された。また、*ARID1A* 変異陽性例における *TP53* 変異陽性例は 2.2% (46 例中 1 例) であり、*TP53* 変異陽性例の 7 例のうち 6 例は *ARID1A* 変異陰性の 29 症例で確認された。すなわち *ARID1A*

の変異と *KRAS*, *TP53* の変異は有意に排他的であることが明らかとなった(それぞれ、 $p=0.039$, 0.031 by Fisher's exact test)

		<i>ARID1A</i>			<i>PIK3CA</i>			<i>KRAS</i>		
		Mut	WT	p value	Mut	WT	p value	Mut	WT	p value
<i>PIK3CA</i>	Mut	30	11	0.031						
	WT	16	18							
<i>KRAS</i>	Mut	3	7	0.039	5	5	1.0			
	WT	43	22		36	29				
<i>TP53</i>	Mut	1	6	<0.001	2	5	0.23	1	6	1.0
	WT	45	23		39	29		9	59	

表 6 各遺伝子変異の重複性と排他性

赤は遺伝子変異同士が有意に共存すること、緑は遺伝子変異同士が有意に排他的であることを示す。

6) *ARID1A*, *PIK3CA*, *TP53* 遺伝子変異と塩基置換によるクラスターとの相関

高頻度に変異が認められた 4 遺伝子と、図 15 に分類した塩基置換に基づくクラスターとの相関を検討した (図 25)。*ARID1A* 変異陽性症例 46 症例のうち 40 症例 (86.9%) は C>T クラスターに属していた。C>T クラスターに属する症例 (n=59) で、*ARID1A* の変異が陽性であった症例は 67.7% (40 症例) であり、C>A クラスターに属する症例 (n=16) で *ARID1A* の変異が陽性である 37.5% (6 症例) と比較して有意に多いことが明らかとなった ($p=0.042$ by Fisher's exact test)。

次に *PIK3CA* 変異陽性例 41 症例中、36 症例 (87.8%) が C>T クラスタ
ーに属していた。*ARID1A* の変異と同様に、C>T クラスタに属する症例
で *PIK3CA* の変異が陽性であったのは 36 症例 (61%) で、C>A クラスタ
ーに属する症例での 31% (5 症例) と比して有意に頻度が高い事が明らかと
なった ($p=0.033$ by Fisher's exact test)。さらに、*ARID1A*, *PIK3CA* の変異共
存例では 93% (30 症例中 28 症例) が C>T クラスタに入る事が示され
た (図 25)。

TP53 変異については、C>T クラスタ症例における *TP53* 変異陽性例
は 5.3% (59 症例中 3 症例) で、C>A クラスタ症例における *TP53* 変異
陽性例の 25% (16 症例中の 4 症例) に比して有意に頻度が低いことが明ら
かとなった ($p=0.019$ by Fisher's exact test)。

以上から、C>T クラスタ、C>A クラスタでそれぞれの遺伝子の変異
頻度に違いがある事が明らかとなった。

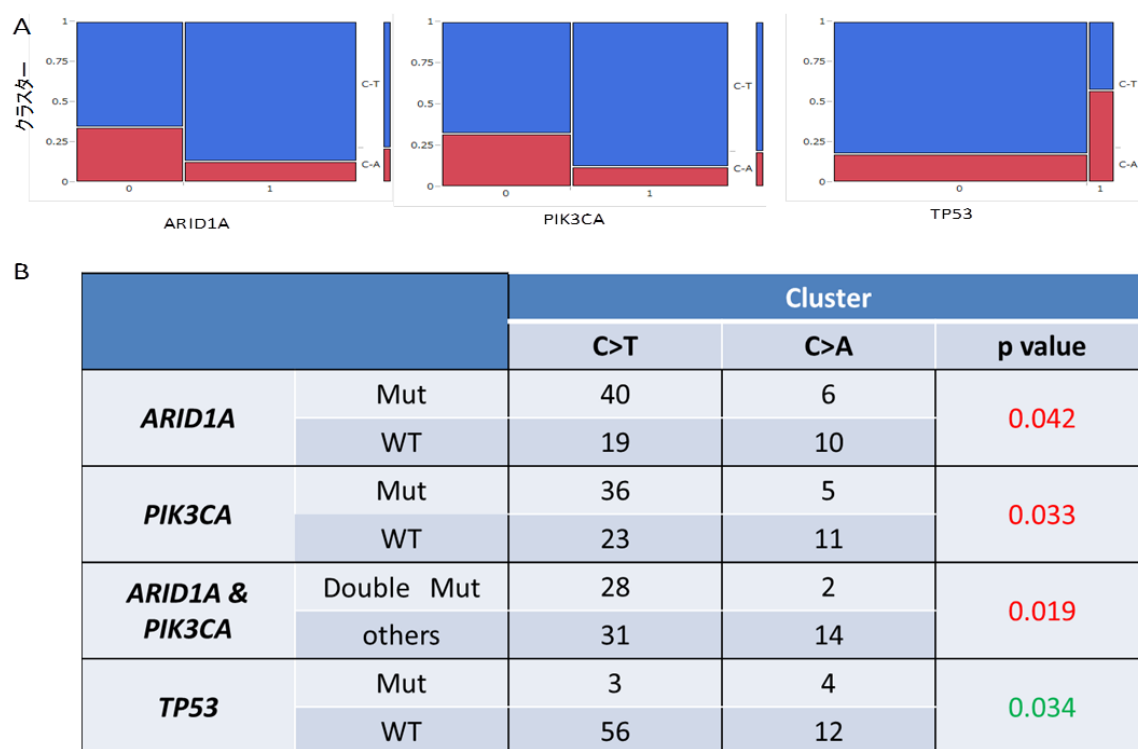


図 25 *ARID1A*, *PIK3CA*, *TP53* 遺伝子変異と塩基置換パターンのクラスター

A. *ARID1A*, *PIK3CA*, *TP53* の各遺伝子変異陽性症例が塩基置換において、C>A クラスター、C>T クラスターのいずれに分布するかを図示した。0 は変異陰性、1 は変異陽性である。B. *ARID1A*, *PIK3CA*, *TP53* の各遺伝子変異とクラスターとの関連を Fisher's exact test で検定した。*ARID1A*, *PIK3CA* 変異陽性群と *TP53* 遺伝子変異陽性群との間に負の相関がみられ、*ARID1A*, *PIK3CA* 変異共存群では、有意に C>T クラスターの頻度が高いことがわかる。

7) 新規のドライバー遺伝子の探索

次に新たなドライバー変異を同定するために、*ARID1A*, *PIK3CA*, *KRAS*, *TP53* の4つの遺伝子変異をいずれも認めない8症例に着目した。8例のうち2例以上でみられる遺伝子変異を調べたところ、guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha (*GNAQ*) と Kelch-like ECH-associated protein 1 (*KEAP1*) が抽出された。

GNAQ 変異は 75 例中 4 症例 (5.3%) で認められ、うち 2 例は *ARID1A*, *PIK3CA*, *KRAS*, *TP53* の 4 遺伝子変異がすべて陰性で、*ARID1A* 変異との共存 1 例、*TP53* 変異との共存 1 例であった。*KRAS* および *PIK3CA* といった、RAS/PI3K 経路遺伝子変異とは共存していなかった (図 26)。*GNAQ* は *KRAS* と同様に MAPK 経路の活性化に関与すると考えられている (57, 58)。これら 4 症例の *GNAQ* 変異はすべて T96S であった。

KEAP1 変異は計 5 例 (6.7%) で同定され、*ARID1A*, *PIK3CA*, *KRAS*, *TP53* の 4 遺伝子の変異陰性例が 2 例、*KRAS* 変異との共存 1 例、*ARID1A*, *PIK3CA* 両方の変異陽性が 1 例であった (図 27 図 21)。*KEAP1*-Nrf2 経路は酸化ストレスに対する生体応答の制御機構において、重要な機能を担っており、*KEAP1* はがん抑制遺伝子と考えられている(59-61)。

GNAQ、*KEAP1* とともに他癌腫で変異が報告されており、ドライバー変異の一つと考えられているが、卵巣明細胞腺癌では未報告であり、今回新規に同定された変異であった。両遺伝子変異と C>T クラスタ、C>A クラスタとの相関を検討したが、いずれの遺伝子変異も塩基置換のクラスタとの相関は認めなかった (表 7)。

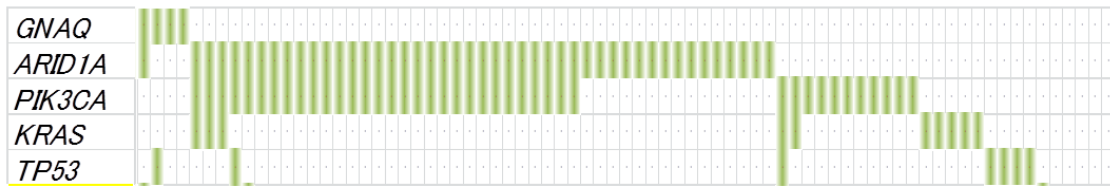
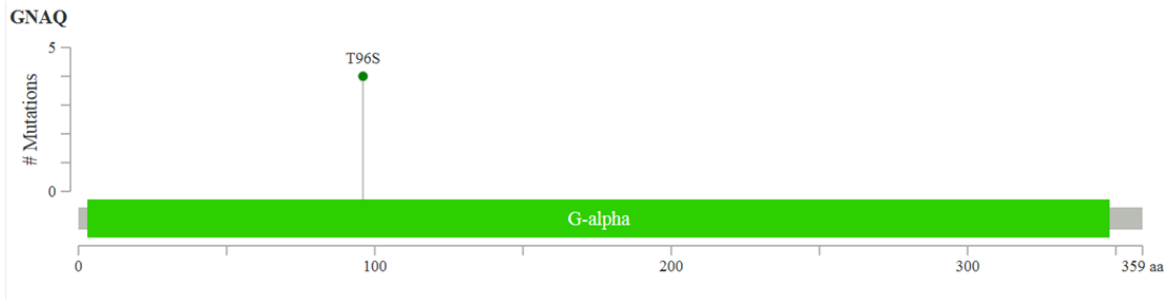


図 26 *GNAQ* 遺伝子変異の内訳

GNAQ 遺伝子は 359 アミノ酸をコードしており、本研究で同定された変異はすべて T96S であった。*ARID1A*, *TP53* 遺伝子変異との共存が各 1 例存在した。

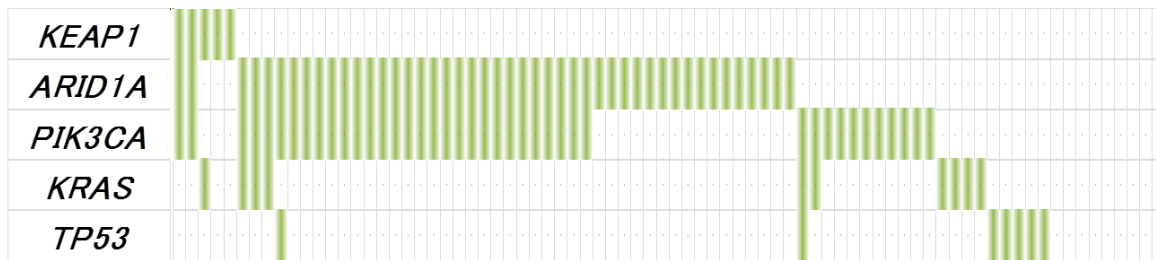
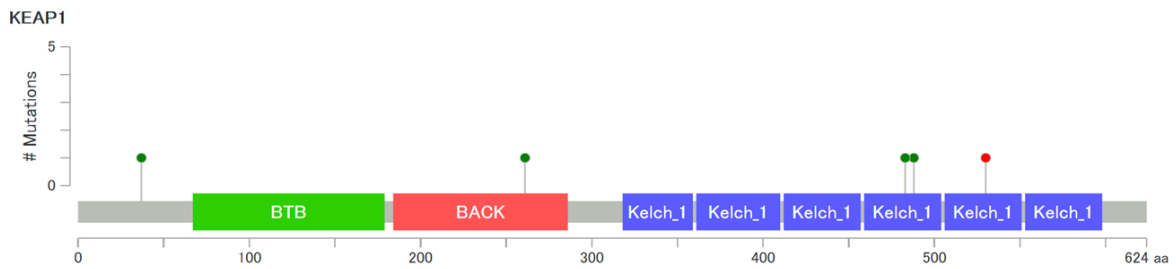


図 27 *KEAP1* 遺伝子変異の内訳

		Cluster		P_value
		C>T	C>A	
GNAQ	Mut	2	2	0.197
	WT	57	14	
KEAP1	Mut	3	2	0.280
	WT	56	14	

表 7 GNAQ および KEAP1 の遺伝子変異と塩基置換クラスターとの相関

8) 塩基置換によるクラスター分類と相関のある変異遺伝子群の同定

次に、卵巣明細胞腺癌における塩基置換パターンと関連する遺伝子変異についてさらに検索を行った。4例（5.3%）以上で変異が認められ、かつ有意に C>A クラスターに変異頻度の高い遺伝子として、histone cluster 1, H3b

(*HIST1H3B*) {ヌクレオソームを構成する4種のヒストンタンパク質 (H2A、H2B、H3 および H4) のうち、H3.1 をコードする遺伝子}、protocadherin-15 (*PCDH15*) (カルシウム依存性に細胞間接着に関わる)、*MYC*、dual specificity phosphatase 13 (*DUSP13*) {蛋白脱リン酸化酵素である} の4つが同定された

(8)。中でも *HIST1H3B* の変異は C>A クラスターのみで認められ (n=4)、C>T クラスターには認められなかった。*PCDH15* は変異7例 (9.3%) のうち、4例が C>A クラスターで同定され、*Myc* と *DUSP13* 遺伝子については、変異4例 (5.3%) のうち、3例が C>A クラスターであり、有意に C>A クラスターで頻度が高かった。

		Cluster		
		C>T	C>A	p value
HIST1H3B	Mut	0	4	0.015
	WT	59	12	
PCDH15	Mut	3	4	0.034
	WT	56	12	
MYC	Mut	1	3	0.029
	WT	58	13	
DUSP13	Mut	1	3	0.029
	WT	58	13	

表 8 C>A クラスターで高頻度に認められる変異遺伝子群

C>A 群で 3 例以上 ($\geq 19\%$)、全体で 4 例 ($\geq 5.3\%$) 以上の変異を示した 4 遺伝子。がん遺伝子の *MYC* も C>A クラスターで変異頻度の高い遺伝子の一つに挙げられた。Fisher's exact test により検定。

9) 変異率の高いシグナル伝達経路と関連する変異遺伝子群の同定

シグナル伝達経路に着目すると、単一でも変異頻度の高いものとして、*ARID1A* が関わるクロマチンリモデリング経路 (SWI/SNF 複合体構成因子) と *PIK3CA* 変異が関わる PI3K 経路 (RTK 経路を含む) が挙げられる。そこで、*ARID1A* や *PIK3CA* 以外にこれらの経路に変異遺伝子が存在するかを検討した。

ARID1A 変異以外で変異率の高い SWI/SNF 複合体構成因子として、SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 (*SMARCA4*) (6 例、8.0%)、AT-rich interaction domain 1B (*ARID1B*) (5 例、6.7%)、SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin,

subfamily d, member 1, 2 (それぞれ *SMARCD1*, 2) 、 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2, 3 (それぞれ *SMARCD2*, 3) 、 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1, 2 (それぞれ *SMARCC1*, 2) が各 1-2 例に認められた (図 28) 。 *ARID1A* 変異との重複が多いものの、 *SMARCA4* 変異陽性のうち 3 例は *ARID1A* 変異陰性であり、また *ARID1B* 変異との共存例も 1 例存在した。 これらをあわせると、全体で 50 例 (67%) において、クロマチンリモデリング複合体の構成タンパクに変異が認められることが明らかとなった。

RTK/PI3K 経路に着目すると、 Insulin receptor substrate 1 (*IRS1*) 、 Fibroblast growth factor receptor 2 (*FGFR2*) 、 platelet-derived growth factor receptor, beta (*PDGFRB*) 、 Insulin Receptor (*INSR*)、 PR65 subunit of protein phosphatase 2A (*PPP2R1A*) 変異がそれぞれ 4 例ずつ (5.3%) 認められた (図 29) 。 これらを統合すると、 53 例 (71%) で RTK/PI3K 経路に遺伝子変異が陽性であり、 *KRAS* 変異単独陽性 5 例を合わせると、 58 例 (77%) において、 RAS/RTK/PI3K 経路の変異が陽性であることが示された (図 29) 。

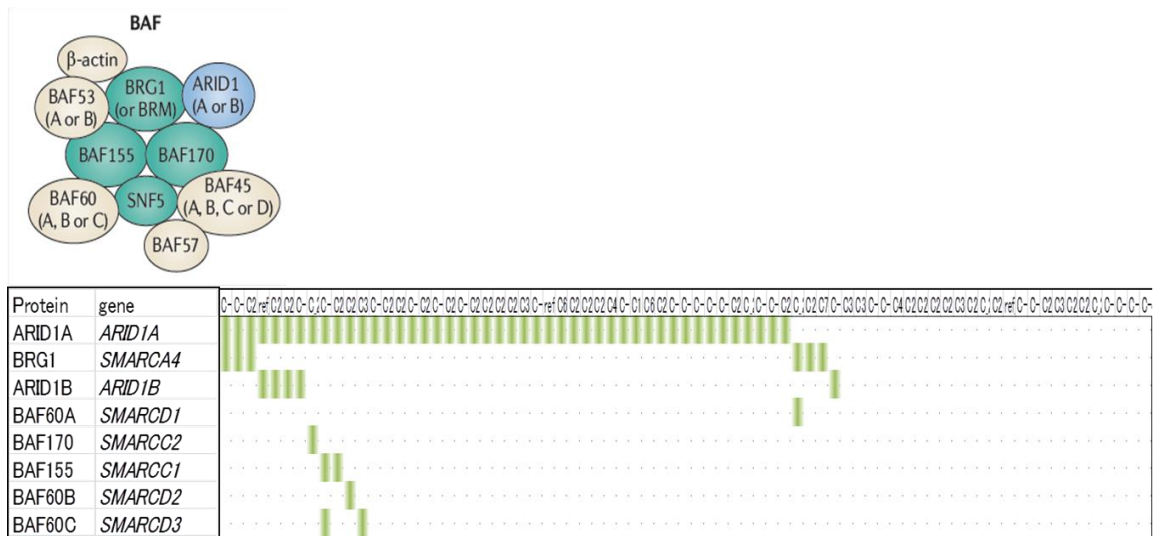


図 28 クロマチンリモデリング複合体の構成タンパクとその遺伝子変異
ARID1A に加えて、クロマチンリモデリング複合体 (BAF 複合体) の構成分子をコードする遺伝子変異に着目した。*ARID1A* との共存例が多いが、*BRG1* や *ARID1B* のように、*ARID1A* 変異陰性のもので他の構成分子に変異を有するものが存在した。

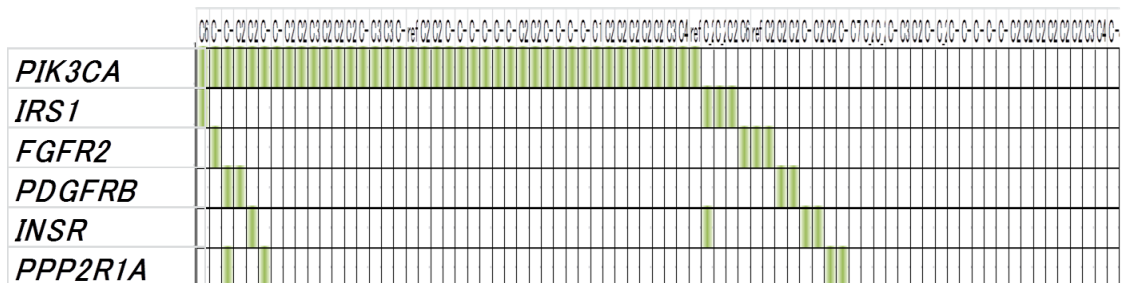


図 29 RTK/PI3K 経路変異の内訳

PIK3CA 変異のほか、RTK (もしくはそのリガンド) 構成因子として、*IRS1*、*FGFR2*、*PDGFRB*、*INSR*、*PPP2R1A* 変異が同定された。他の RTK や *PIK3CA* 変異とは、相互排他的な例が多く存在した。

次に、Reactome/KEGG の pathway を利用し、高率に障害されている pathway を検討したところ、Notch シグナルが同定された。*NOTCH1/3/4* 変異がそれぞれ、5 例 (6.7%)、4 例 (5.3%)、3 例 (4.0%) に認められ、その他にも delta-like 1 (*DLL1*) が 3 例 (4.0%)、ADAM metallopeptidase domain 17 (*ADAM17*) が 2 例 (2.7%)、

deltex 3 like, E3 ubiquitin ligase [Homo sapiens (*DTX3L*)、deltex 4, E3 ubiquitin ligase (*DTX4*) が各 2 例 (2.7%) で変異が同定された (図 30)。1 例を除き、これらの変異は相互排他的であり、全体で 19 例 (25%) に変異が認められた。これらの変異と、C>T クラスター、C>A クラスターとの相関は認められなかった (表 9)。

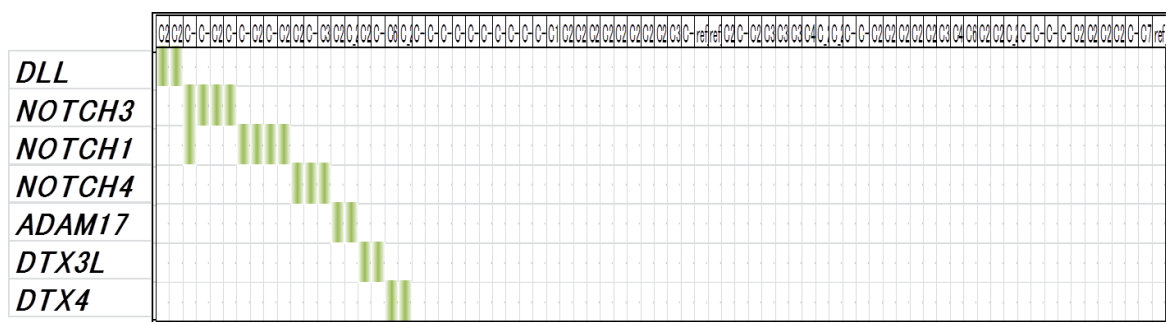


図 30 Notch シグナル伝達経路変異の内訳

Notch シグナリング構成因子として、*DLL1*、*NOTCH1/3/4*、*ADAM17*、*DTX3L*、*DTX4* の変異が同定された。1 例を除き、相互排他的であり、全体で 19 例(25%) で変異がみられた。

		Cluster		P_value
		C>T	C>A	
Notch Signaling	Mut	11	7	0.504
	WT	48	9	

表 9 Notch pathway の変異と塩基置換クラスターの相関

＜ 2 ＞染色体コピー数異常における卵巣明細胞腺癌の特徴

全エクソンシーケンスの *karkinos* による解析過程で同定された卵巣明細胞腺癌のコピー数解析の結果についても、36 症例について検討した。さらに、31 例については、GeneChip® Mapping 250K Assay Kits (Nsp) SNP アレイを用いたコピー数解析の結果 (49)との再現性を確認した。SNP アレイのコピー数解析には、Genome Imbalance Map 法 (62)を用いている。その結果、がん抑制遺伝子である *ARID1A* 遺伝子 (1p35.3)、*SMARCA4* (19p13.2) の領域において、染色体コピー数減少を、がん遺伝子である *PIK3CA* (3q26.3)、*EGFR* (7p12)、*BRAF* (7q34)、*c-Myc* (8q24.21)、*KRAS* (12p12.1) においてコピー数増加が高頻度に存在していた (図 31 図 31)。また、Whole-arm の増加・欠失 (3q 増加や 8q 増加など)を示すものが多く存在する事が明らかとなった (図 31)。

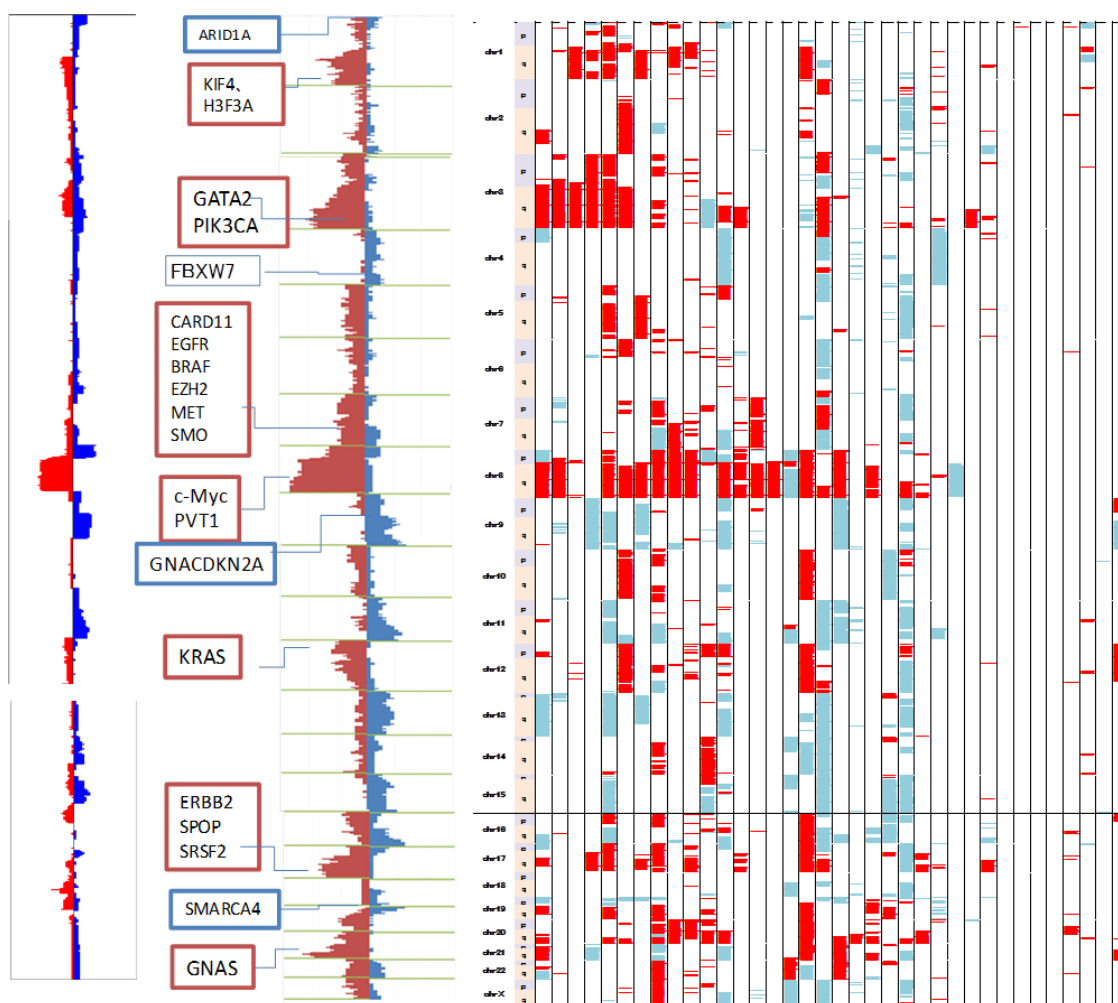


図 31 染色体コピー数異常の解析

全エクソンシーケンス結果（各領域のリード数）をもとに、染色体コピー数の推定を行った。右側に 36 例の各々についてのコピー数変化を示す。赤色の領域はコピー数増加を、青色の領域はコピー数の減少を示す。31 例については、SNP タイピングアレイ (250K, Affymetrix 社)も施行し、全エクソンシーケンス結果と矛盾しないことを確認した。コピー数異常を呈した領域の中で、代表的ながん遺伝子を赤枠で、がん抑制遺伝子を青枠で示した。

第 4 章 <考察>

本研究では、卵巣明細胞腺癌に着目し、主として、臨床検体の全エクソンシーケンス解析を通して、(i) 卵巣明細胞腺癌の遺伝子変異プロファイルの解明、(ii) 塩基置換パターンに基づくサブクラスターの同定と各遺伝子変異の相関の

有無、(iii)治療標的となりうるシグナル伝達経路の抽出、(iv)新規のドライバー候補遺伝子の同定について、新たな知見を得た。

1) 卵巣明細胞腺癌の遺伝子変異プロファイル、変異個数と染色体コピー数異常の特徴

遺伝子変異数や高頻度に変異が見られる遺伝子が個々の癌腫で異なり(9, 35)、種々の外的・内的因子が遺伝子変異の蓄積と相関するため、各癌腫における遺伝子変異プロファイルは、その Carcinogenesis と深く関連する。メラノーマ、肺癌、MSI 陽性の大肠癌では、それぞれ UV、喫煙、ミスマッチ修復遺伝子異常が遺伝子変異の蓄積に寄与しており、変異の数は多くなる。一方、小児がんのように、特定の発癌因子や加齢による因子がないような癌腫では変異個数は少ない(通常 Non-synonymous mutation が 20 個以下) ことが報告されている(29, 35)。本研究で同定された遺伝子変異の数は比較的多く、頭頸部がんと同程度の遺伝子変異数であった。喫煙による酸化ストレスが発がんに関与するとされている頭頸部がんと、卵巣子宮内膜症性嚢胞(チョコレート嚢胞)内の遊離鉄による酸化ストレスがその発がんに関与している(63)とされる卵巣明細胞腺癌で、遺伝子変異数が同程度である事は興味深い事である。また、卵巣子宮内膜症性嚢胞との併存する事が少ない卵巣漿液性腺癌に比べ、明細胞腺癌では遺伝子変異数が有意に多い事が明らかとなった。漿液性腺癌は上皮性卵巣がんの主

要な組織型であり、*BRCA1/2* 変異率が Germline、somatic あわせて 20%以上に認め、相同組換修復経路の異常が約 50%に認められる事が明らかとなっている (29, 52, 64)。しかし、本研究で解析した明細胞腺癌にはこれらの変異は認めなかった。卵巣子宮内膜症との併存率や化学療法の感受性という臨床学的な違いと共に、遺伝学的背景においても卵巣明細胞腺癌と漿液性腺癌では異なっており、個別に治療戦略が構築されるべきであることを支持する結果と考えられる。

次に、卵巣明細胞腺癌でも hypermutator が存在する事が本研究で始めて明らかとなった。同定された全遺伝子変異数が 1000 を超える症例では、ミスマッチ修復遺伝子の変異や *POLE* 変異を認めており、ミスマッチ修復機構や DNA ポリメラーゼのプルーフリーディング機構の異常の関与が示唆された。また、わずか 3 例ではあるが予後良好な傾向にあった。子宮体癌では hypermutator である症例は予後良好である事が知られており (31)、この報告にも一致する結果であった。また、本研究でミスマッチ修復遺伝子の変異が認められなかったものの、100 個以上の遺伝子変異を有している症例が 18 例存在している。今後、これらの症例でマイクロサテライト不安定についての検討や、DNA メチル化による *MLH1* の発現抑制についての検討を加え、ミスマッチ修復機構異常の有無と遺伝子変異数の関係を明らかにしたい。興味深い事に、ミスマッチ修復遺伝子の異常を認める hypermutator 腫瘍については、*programmed cell death 1* (PD-1) , cytotoxic

T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) 等が強発現し、チェックポイントインヒビターが有用であることが近年示されており(65)、明細胞腺癌においても一部の症例で有用である可能性がある。

染色体コピー数異常は遺伝子変異とは別に遺伝子発現を Genetic に調節する因子であるが、エクソーム解析に基づく染色体コピー数解析において、遺伝子変異を有するようながん遺伝子(*PIK3CA*, *KRAS* 等) やがん抑制遺伝子 (*ARID1A* や *SMARCA4* 等)の領域で、コピー数増加や減少を来たす症例が存在しており、染色体コピー数異常による発現調節と遺伝子変異の双方の重要性が示唆された。我々がすでに報告しているように、本研究でも、卵巣明細胞腺癌においては、長腕・短腕全体といった、染色体の腕レベルでの染色体コピー数異常の頻度が漿液性腺癌より有意に高頻度であり、漿液性腺癌に比べて限局的なコピー数異常は少ないことが確認された(49)。

2) 塩基置換パターンに基づくサブクラスターの同定

がんの個別化医療の確立に向けて、生物学的背景に基づいた層別化、それぞれに対する治療戦略を確立する必要がある。遺伝子変異の塩基置換パターンがそのがん化の過程を反映している可能性を踏まえ、本研究でも塩基置換パターンに基づいて階層的クラスタリングを用いて明細胞腺癌の層別化を行った。そ

の結果、C から T への塩基置換パターンが主体である C>T クラスタ(79%)と、C から A への塩基置換パターンが主体である C>A クラスタ(21%)に分類された。活性酸素による酸化ストレスが発がんに関連する腫瘍では、遺伝子変異の塩基置換は C:G>A:T が有意であり(66, 67)、子宮内膜症と同様に過剰鉄が発癌因子の一つである肝細胞がんにおいても C:G>A:T 変異の頻度が高いことが知られている(68)。さらに、塩基置換変異の前後も合わせた 96 パターンによる分類において、図 2 で示す Signature 4 は C:G>A:T の変異が主体であるが、これは喫煙と関連するがんによく見られる事が明らかとなっており(35)、喫煙による酸化ストレスでも同様の変異が誘発される可能性がある。卵巣明細胞腺癌において C:G>A:T 変異が主体となるサブグループが存在することは、卵巣明細胞腺癌が卵巣子宮内膜症性嚢胞の内部における酸化ストレスによりがん化するとの説を支持する結果と考えられる。

その一方、C>A クラスタは全体の約 2 割にとどまっており、約 8 割の症例は、遺伝子変異数が少ない C>T クラスタに属していた。すなわち、酸化ストレスを背景が発がんに関与する症例は実際には少ない可能性がある。C>T クラスタにおける遺伝子変異の塩基置換を前後の塩基も含めて分類すると、CpG における C において高頻度に変異していることが明らかとなったが、これは図 2 の Signature 1A, 1B と同様であり、年齢が高い症例で多く見られる変異パターン

であった。これはゲノム DNA の CpG 配列部分での cytosine のメチル化による 5-メチルシトシンの生成と、5-メチルシトシンの脱アミノ化の結果生じると考えられている (69, 70)。卵巣子宮内膜症性嚢胞において 50 歳以上では有意に卵巣癌の頻度が上がること (71)が知られているが、C>T クラスタが約 8 割を占めることは、卵巣明細胞腺癌の多くで加齢が関与することを支持するものである。しかし、本研究では C>A クラスタと C>T クラスタで年齢分布に差は見られなかった。この理由として、C>T クラスタに、C:G>T:A 変異が CpG 以外の部位に高頻度であるサンプルが含まれていたことが関係している可能性がある。

図 18 C>T クラスタにおいて、CpG での塩基置換変異が少ない 18 症例の塩基置換の分布に示すように、C>T クラスタにおいて C:G>T:A 変異が TCA 配列の C に高頻度に見られる一群が存在する。これは、図 2 における Signature 2 と同様であり、APOBEC3 ファミリーの発現異常が関与しており、年齢が関連する Signature1A, 1B とは異なっている可能性がある。今後、症例数の増加により、詳細な塩基置換変異による層別化が可能となれば、年齢が大きな要素であるクラスタをより高精度で抽出できるかもしれない。また、APOBEC3B によるヒトゲノムへの C:G>T:A 変異の導入が、癌遺伝子に C>T の変異を惹き起こし、悪性リンパ腫で発がんの要因となっている事も示されている(37)。これは、細胞内の酵素による発癌メカニズムとの概念であり、APOBEC3B の発現や酵素活性の

調節でがん化の予防や進行阻止につながる可能性も考えられる。症例数の増加に伴い *APOBEC3B* の関与する群が確立されれば、卵巣内膜症性嚢胞においても、がん化予防という観点から層別化された管理の基盤となる可能性も考えられる。

今回、同定された2種類のクラスターにおいては、臨床進行期、年齢、予後といった臨床病理学的な因子とは有意な相関を示さなかったが、遺伝子変異数や *ARID1A* や *PIK3CA*、*TP53* と言ったドライバー変異の頻度には差を認めた。2つのクラスター間で、遺伝子変異を起こすメカニズムと共に、その結果もたらされる変異ドライバー遺伝子の違いも存在することが明らかとなった。

3) 治療標的となりうるシグナル伝達経路の抽出

遺伝子変異頻度に基づいた治療標的経路としては、まず *PIK3CA* 変異により活性化を受ける *PI3K* 経路が挙げられる。*RTKRAS/PI3K* 経路の変異率は71%であり、創薬ターゲットになりうることから効果に期待がもてる。卵巣明細胞腺癌株における *PI3K/mTOR* 同時阻害剤の抗腫瘍効果を検討した我々の報告において、*in vitro*、*in vivo* いずれにおいても卵巣明細胞腺癌で高い抗腫瘍効果が確認された (72)。特に、*TP53* 変異が陰性の場合、*TP53* 依存性アポトーシスも誘導されることより、C>T クラスターにおいて有望な治療戦略となる可能性がある。

次に、*ARID1A* 変異により機能が失われる *SWI/SNF complex* も治療標的として近年注目されている。ヒストンメチル化酵素阻害剤である *EZH2* 阻害剤は、*ARID1A* 変異卵巣癌株において、合成致死作用を有することが報告され (73-75)、ヒトがんで第 I/II 相臨床試験が進行中である。クロマチンリモデリングの異常により種々の遺伝子発現が影響を受けるが、*ARID1A* 変異のある癌で *EZH2* を阻害すると、*PIK3IP1* を介して *PI3K* 経路も抑制され、合成致死に至ると提唱されている (74)。特に、*ARID1A*, *PIK3CA* の *Double mutant* の明細胞腺癌で、*EZH2* のように *Epigenetic* な機構を標的とした治療が有効である可能性がある。その他にも、クロマチンリモデリング経路の遺伝子変異が多数、本研究において同定された。*ARID1B*、*SMARCA4*、*SMARCCD1/2/3* といった遺伝子変異が挙げられる。これらは *ARID1A* 変異との共存例も多く、協調的に作用している可能性もある。近年、*SMARCA4* 遺伝子変異 (*BRG1* 蛋白をコードする) が肺癌で高頻度に存在し、*SMARCA4* 変異陽性の肺癌において、*SMARCA2* 阻害剤を用いると合成致死を来たすという報告がなされている (76, 77)。さらに、*EZH2* 阻害剤が、*BRG1* 変異陽性の肺癌において、エトポシドの感受性を高めるとすることも報告された(78)。以上より、クロマチンリモデリングの異常を呈していることを利用して合成致死を図るような新規治療法に今後期待がかかる。

そのほか、個々の遺伝子変異率は低いものの、全エクソン解析で網羅的に変異を抽出すると、Notch シグナル経路についても、遺伝子変異陽性頻度が 2 割以上に存在することが明らかとなった。Notch シグナルは他癌腫でも変異が認められており、Gamma-Secretase Inhibitor (GSI)をはじめとした阻害薬が開発され、臨床試験が進められている (79)。卵巣明細胞腺癌のみでなく、他の癌腫とともに臨床試験を組み立てていくことで、卵巣癌治療における個別化につながる可能性がある。

4) 新規のドライバー候補遺伝子の同定

本研究で高頻度に変異が見られた遺伝子は、既報と同様に *ARID1A*, *PIK3CA* の変異頻度が 50%以上、*KRAS* 変異(13%)、*TP53* 変異(9%)であり、既報と同様であった。再現性が確認されており、本研究のシーケンス結果および解析法の妥当性示すと考えられる。本研究により、他癌腫で検出されているものの、これまで卵巣明細胞腺癌で報告されていなかった遺伝子変異も同定された。

その一つが *GNAQ* で、メラノーマで高頻度（眼内黒色腫の 46%）に変異が認められている (58, 80)。*GNAQ* は MAPK 経路の活性化に関与しているが、本症例でも *KRAS* の変異 10 例とは相互排他的であった。4 例中 *ARID1A* 変異は 1 例のみで、*ARID1A*、*PIK3CA* いずれも変異陰性の 18 例中 8 例（44%）において、

KRAS または *GNAQ* 変異が陽性であった。今回同定された変異はすべて T96S であったが、メラノーマで同定されている変異はほとんどが Q209 の変異である。Q209 の変異については、がん化との関連や機能的変化について多数報告されている (80, 81)。一方、T96S の変異がどのようにがん化に寄与するかは不明である。しかし、Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) のデータベースでは、乳がんや肺がんなど他がん腫でも複数症例(2016年1月時点で15例)で T96S の変異が同定されており、ドライバー変異である可能性を示唆している。

2 つ目の *KEAP1* 変異は肺癌の 12% で認められており (15)、*KEAP1-Nrf2* 経路は酸化ストレスと深く関わっている事が知られている (61, 82)。さらに、*KEAP1* の機能抑制による *Nrf2* の恒常的発現は予後不良因子とされている (59, 61)。今回同定された *KEAP1* 変異は、E488K、E37K、Q530X、R483C、R261W の 5 つであった。酸化ストレスに関わる C>A クラスターでより高頻度な傾向はあったが、C>T クラスターにも存在し有意差はなかった。今後、解析症例の増加に伴い C>A クラスターで有意に多い事が示される可能性もあるが、L231V、S224Y、P318L、R71L などの変異は *KEAP1* による *Nrf2* の抑制には関与せず、パッセンジャー変異である事も示されており (83)、本研究で同定された変異においても一部はがん化に寄与していない変異である可能性も考えられた。

本研究においては、今後の更なる検討が必要な **Limitation** が存在する。まず、サンプル数が限られた中での分類のため、別のサンプルセットを用いて塩基置換クラスターと変異遺伝子プロファイルの関連について **Validate** していく必要がある。また、次世代シーケンサーによる解析において、低頻度ではあるが 8-オキソグアニンの部位に **C:G>A:T** の変異が入るアーチファクトが報告されており (84)、それを除去するソフトウェアも用いた解析も考慮される。次に、発現アレイやメチル化アレイといった他の網羅的ゲノム解析を加え、今回の全エクソン解析と統合することでより病態やクラスターの特徴を明らかとしていくことも望まれる。さらに、治療標的経路や遺伝子変異についての機能解析を行い、より合理性の高い新規の治療法を確立していくことが求められる。将来的な臨床試験への橋渡しとなるよう、本研究成果を有効に活用していくことが必要となる。

第5章 <結論>

本研究により、卵巣明細胞腺癌における遺伝子変異のプロファイルを網羅的に明らかとした。卵巣明細胞腺癌においては、*ARID1A*、*PIK3CA* 変異の頻度がいずれも 50%以上を占め、両者は高頻度に共存しており、*TP53* 変異とは相互排他的な関係にあった。今回初めて、卵巣明細胞腺癌が塩基置換パターンにより 2 つに分類される事を示した。すなわち、主に年齢と相関する塩基置換のパターンであり、*ARID1A*、*PIK3CA* 変異頻度が高い C>T クラスタと、酸化ストレスと相関する塩基置換のパターンで、遺伝子変異数が多い C>A クラスタである。さらに、卵巣明細胞腺癌にもミスマッチ修復遺伝子や DNA ポリメラーゼに異常を認める hypermutator が存在する事が明らかとなった。*Notch* シグナル、*GNAQ*、*KEAPI* といった新たな治療標的経路・分子の存在も明らかとなった。今後の更なる検討により、卵巣明細胞腺癌において新規治療法の開発につながるものと期待される。

参考文献

1. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
2. C. M. Croce, Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine* **358**, 502-511 (2008).
3. A. Balmain, Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nature reviews. Cancer* **1**, 77-82 (2001).
4. B. Timmermann *et al.*, Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis. *PloS one* **5**, e15661 (2010).
5. E. Shtivelman, B. Lifshitz, R. P. Gale, E. Canaani, Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* **315**, 550-554 (1985).
6. Y. Samuels *et al.*, High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 554 (2004).
7. J. D. Carpten *et al.*, A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**, 439-444 (2007).
8. T. J. Lynch *et al.*, Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine* **350**, 2129-2139 (2004).
9. C. W. Brennan *et al.*, The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **155**, 462-477 (2013).
10. Y. Sato *et al.*, Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nature genetics* **45**, 860-867 (2013).
11. R. G. Verhaak *et al.*, Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* **17**, 98-110 (2010).
12. R. Govindan *et al.*, Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* **150**, 1121-1134 (2012).
13. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543-550 (2014).
14. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330-337 (2012).
15. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519-525 (2012).
16. I. Varela *et al.*, Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* **469**, 539-542 (2011).

17. S. Jones *et al.*, Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 228-231 (2010).
18. K. C. Wiegand *et al.*, ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *The New England journal of medicine* **363**, 1532-1543 (2010).
19. A. Fujimoto *et al.*, Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nature genetics* **44**, 760-764 (2012).
20. N. Cancer Genome Atlas Research, Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061-1068 (2008).
21. L. Ding *et al.*, Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **455**, 1069-1075 (2008).
22. M. Soda *et al.*, Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**, 561-566 (2007).
23. K. Takeuchi *et al.*, RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nature medicine* **18**, 378-381 (2012).
24. T. Kohno *et al.*, KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature medicine* **18**, 375-377 (2012).
25. E. L. Kwak *et al.*, Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **363**, 1693-1703 (2010).
26. F. Casaluce *et al.*, ALK inhibitors: a new targeted therapy in the treatment of advanced NSCLC. *Targeted oncology* **8**, 55-67 (2013).
27. Y. L. Choi *et al.*, EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *The New England journal of medicine* **363**, 1734-1739 (2010).
28. Levi A. Garraway, Eric S. Lander, Lessons from the Cancer Genome. *Cell* **153**, 17-37.
29. B. Vogelstein *et al.*, Cancer genome landscapes. *Science (New York, N.Y.)* **339**, 1546-1558 (2013).
30. E. Hodis *et al.*, A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251-263 (2012).
31. C. Kandoth *et al.*, Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **497**, 67-73 (2013).
32. X. Wei *et al.*, Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nature genetics* **43**, 442-446 (2011).
33. Y. Totoki *et al.*, High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nature genetics* **43**, 464-469 (2011).

34. C. Greenman *et al.*, Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**, 153-158 (2007).
35. L. B. Alexandrov *et al.*, Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415-421 (2013).
36. S. Nik-Zainal *et al.*, Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* **149**, 979-993 (2012).
37. S. A. Roberts *et al.*, An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nature genetics* **45**, 970-976 (2013).
38. R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians* **63**, 11-30 (2013).
39. T. Sugiyama *et al.*, Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* **88**, 2584-2589 (2000).
40. M. Kobel *et al.*, Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS medicine* **5**, e232 (2008).
41. W. G. McCluggage, Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology* **43**, 420-432 (2011).
42. M. Takano, H. Tsuda, T. Sugiyama, Clear cell carcinoma of the ovary: is there a role of histology-specific treatment? *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **31**, 53 (2012).
43. A. Okamoto *et al.*, Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus review for clear cell carcinoma of the ovary. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **24**, S20-25 (2014).
44. H. Yoshikawa *et al.*, Prevalence of endometriosis in ovarian cancer. *Gynecologic and obstetric investigation* **50 Suppl 1**, 11-17 (2000).
45. H. Jimbo *et al.*, Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* **59**, 245-250 (1997).
46. H. Kobayashi, S. Imanaka, H. Nakamura, A. Tsuji, Understanding the role of epigenomic, genomic and genetic alterations in the development of endometriosis (review). *Molecular medicine reports* **9**, 1483-1505 (2014).
47. K. Yamaguchi *et al.*, Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes. *Oncogene* **29**, 1741-1752 (2010).

48. C. Gomez-Raposo, M. Mendiola, J. Barriuso, D. Hardisson, A. Redondo, Molecular characterization of ovarian cancer by gene-expression profiling. *Gynecologic oncology* **118**, 88-92 (2010).
49. Y. Uehara *et al.*, Integrated copy number and expression analysis identifies profiles of whole-arm chromosomal alterations and subgroups with favorable outcome in ovarian clear cell carcinomas. *PloS one* **10**, e0128066 (2015).
50. K. T. Kuo *et al.*, Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *The American journal of pathology* **174**, 1597-1601 (2009).
51. R. C. Wu, T. L. Wang, M. Shih Ie, The emerging roles of ARID1A in tumor suppression. *Cancer biology & therapy* **15**, 655-664 (2014).
52. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609-615 (2011).
53. B. G. Wilson, C. W. Roberts, SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nature reviews. Cancer* **11**, 481-492 (2011).
54. H. Li, R. Durbin, Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 1754-1760 (2009).
55. N. Homer, S. F. Nelson, Improved variant discovery through local re-alignment of short-read next-generation sequencing data using SRMA. *Genome biology* **11**, R99 (2010).
56. M. Meyerson, S. Gabriel, G. Getz, Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature reviews. Genetics* **11**, 685-696 (2010).
57. H. Populo, J. Vinagre, J. M. Lopes, P. Soares, Analysis of GNAQ mutations, proliferation and MAPK pathway activation in uveal melanomas. *The British journal of ophthalmology* **95**, 715-719 (2011).
58. J. S. Khalili *et al.*, Combination small molecule MEK and PI3K inhibition enhances uveal melanoma cell death in a mutant GNAQ- and GNA11-dependent manner. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 4345-4355 (2012).
59. A. Kobayashi, T. Ohta, M. Yamamoto, Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. *Methods in enzymology* **378**, 273-286 (2004).
60. B. Padmanabhan *et al.*, Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Molecular cell* **21**, 689-700 (2006).
61. J. D. Hayes, M. McMahon, NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends in biochemical sciences* **34**, 176-188 (2009).

62. S. Ishikawa *et al.*, Allelic dosage analysis with genotyping microarrays. *Biochemical and biophysical research communications* **333**, 1309-1314 (2005).
63. H. Kobayashi, Ovarian cancer in endometriosis: epidemiology, natural history, and clinical diagnosis. *International journal of clinical oncology* **14**, 378-382 (2009).
64. I. Sohn, W. Y. Jung, C. O. Sung, Somatic hypermutation and outcomes of platinum based chemotherapy in patients with high grade serous ovarian cancer. *Gynecologic oncology* **126**, 103-108 (2012).
65. D. T. Le *et al.*, PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England journal of medicine* **372**, 2509-2520 (2015).
66. M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 1195-1214 (2003).
67. B. van Loon, E. Markkanen, U. Hubscher, Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA repair* **9**, 604-616 (2010).
68. S. Toyokuni, Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrototoxic disease. *Cancer science* **100**, 9-16 (2009).
69. J. S. Welch *et al.*, The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **150**, 264-278 (2012).
70. G. P. Pfeifer, Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Current topics in microbiology and immunology* **301**, 259-281 (2006).
71. H. Kobayashi *et al.*, Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **17**, 37-43 (2007).
72. T. Kashiyama *et al.*, Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR inhibitor DS-7423. *PloS one* **9**, e87220 (2014).
73. S. K. Knutson *et al.*, Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Molecular cancer therapeutics* **13**, 842-854 (2014).
74. B. G. Bitler, N. Fatkhutdinov, R. Zhang, Potential therapeutic targets in ARID1A-mutated cancers. *Expert opinion on therapeutic targets* **19**, 1419-1422 (2015).

75. B. G. Bitler *et al.*, Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nature medicine* **21**, 231-238 (2015).
76. P. P. Medina *et al.*, Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Human mutation* **29**, 617-622 (2008).
77. T. Oike *et al.*, A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer research* **73**, 5508-5518 (2013).
78. C. M. Fillmore *et al.*, EZH2 inhibition sensitizes BRG1 and EGFR mutant lung tumours to TopoII inhibitors. *Nature* **520**, 239-242 (2015).
79. X. Yuan *et al.*, Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer letters* **369**, 20-27 (2015).
80. A. N. Shoushtari, R. D. Carvajal, GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma. *Melanoma research* **24**, 525-534 (2014).
81. J. L. Huang, O. Urtatiz, C. D. Van Raamsdonk, Oncogenic G Protein GNAQ Induces Uveal Melanoma and Intravasation in Mice. *Cancer research* **75**, 3384-3397 (2015).
82. M. B. Sporn, K. T. Liby, NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature reviews. Cancer* **12**, 564-571 (2012).
83. B. E. Hast *et al.*, Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination. *Cancer research* **74**, 808-817 (2014).
84. M. Costello *et al.*, Discovery and characterization of artifactual mutations in deep coverage targeted capture sequencing data due to oxidative DNA damage during sample preparation. *Nucleic acids research* **41**, e67 (2013).

謝辞

本研究を行うにあたって、大変多くのご指導を賜りました東京大学先端科学技術研究センターゲノムゲノムサイエンス部門 油谷浩幸教授、東京大学医学部産科婦人科学教室 藤井知行教授、大須賀穰教授、埼玉医科大学国際医療センター婦人科腫瘍科 藤原恵一教授、長谷川幸清准教授に深く感謝いたします。

また、本研究をすすめるにあたり、細部にわたりご指導いただきました東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス 辰野健二研究員、山本尚吾研究員、辻真吾研究員、上田宏生研究員、上原ゆり子先生、浅田佳代先生、目黒裕子様、梅田高呂様、東京大学医学部産科婦人科学教室 矢野哲客員准教授、織田克利准教授、曾根献文助教、池田悠至助教、栗川怜子様、萩原吟重様、富田香織様に心より厚く御礼申し上げます。