

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

### [序論]

がんにおける遺伝子変異解析は、がんの本質的理解につながると考えられる。実際に、全ゲノム/エクソンシーケンスといった網羅的ゲノム解析により得られた知見をもとに、多くのがん腫で治療標的となる因子の同定や、予後因子の同定、治療層別化がなされている。近年では、網羅的ゲノム解析から得られる遺伝子変異の塩基置換のパターンから、その腫瘍のがん化の過程を理解することが進んでいる。

卵巣がんは、難治性で予後不良であるにも関わらず、生物学的背景に基づく治療の層別化がなされていない。特に、卵巣明細胞腺癌は標準化学療法のアプローチが低く、予後不良な組織型である。また、欧米の8%前後と比べ、本邦では25%前後と多く、生活習慣のみならず、遺伝的背景が異なる可能性も示唆されている。本研究では卵巣明細胞腺癌を解析対象とし、全エクソンシーケンスを用いて、新たな治療標的を同定する。さらに、遺伝子変異の塩基置換を解析し、生物学的背景に基づくサブクラスの同定を目的とした。

### [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月までに治療を受けた初発卵巣明細胞腺癌症例のうち、腫瘍凍結組織が得られた97例である。本研究は、両施設における倫理委員会で承認（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）を得て行われた。対象者からインフォームドコンセントを得て、検体を収集した。97症例の中で、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、全エクソンシーケンスを行った。

#### 2) DNA/RNA抽出

Qiamp DNA Mini および micro Kit (Qiagen, Valencia, CA)、AllPrep DNA/RNA Mini Kit を使用して DNA を抽出した。DNA の濃度は Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop) にて測定した。また、腫瘍組織の新鮮凍結検体については、薄切の後、HE染色を行い、腫瘍含有を確認の上で解析に使用した。

#### 3) ハイブリッドキャプチャーによるエクソン領域の濃縮

Agilent SureSelect Human All Exon Kit v4 (Agilent Technologies) を使用して、エクソ

ン領域を濃縮した。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。

#### 4) 全エクソンシーケンス解析

HiSeq2000, 2500 (Illumina 社) を用い、100 bp のペアエンドシーケンスを行った。各リードについて、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) 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、PCR Duplicate を除去し、Short-Read Micro re-Aligner を使用して局所での再アライメントを行った。

#### 5) 遺伝子変異の同定

腫瘍 DNA と対応する正常 DNA を比較することで、がんにおける体細胞変異を同定した。変異同定には、karkinos (URL : <http://sourceforge.net/projects/karkinos/>) を用いた。同ソフトウェアでは、LOH 領域におけるヘテロ SNP のアリ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し、遺伝子変異同定の効率が改善されている。アミノ酸置換を伴う変異 (Non-Synonymous Mutation) とアミノ酸置換を伴わない変異 (Synonymous Mutation)、挿入・欠失を伴う変異 (In-del) について、同定を行った。

### [結果]

全エクソンシーケンス解析を行った 78 症例の中で、変異数や腫瘍のコピー数変化より推定された腫瘍細胞の含有率から、評価妥当と判断した 75 症例を解析対象とし、以下の知見を得た。

1) 1 症例あたりの遺伝子変異数の中央値は 63 個であり、TCGA に報告された卵巣漿液性腺癌に比べて有意に変異個数が多かった ( $p < 0.0001$ , Welch's t-test)。

2) 1000 個以上の遺伝子変異を有する “hypermutator” が 3 症例 (4%) に同定され、いずれにもミスマッチ修復遺伝子の変異またはヌクレオチド除去修復に関わる *POLE* 遺伝子の変異が同定された。これら 3 例に再発は認められず、統計学的有意差は認められなかったが、変異の少ないがんに比べ予後が良い傾向が認められた。

3) 同定されたすべての遺伝子変異を用い塩基置換パターンを元に階層的クラスタリングを行い、2 つのサブグループを同定した。塩基置換が C:G>T:A が主体である C>T クラスタには 59 症例 (78.7%) が、C:G>A:T が主体の C>A クラスタには残りの 16 例 (21.3%) が含まれた。1 検体あたりの遺伝子変異の数は、C>A クラスタでは  $516 \pm 354$  個 (mean  $\pm$  SE) で、C>T クラスタでは  $72.1 \pm 32.4$  個 (mean  $\pm$  SE) で、C>A クラスタで有意に多かった ( $p < 0.0001$ )。塩基置換の前後の塩基も含めた検討では、C>T クラスタの 69.4% (41 症例) は、50% 以上で C:G>T:A 変異が CpG で生じていた。

4) 変異頻度の高い上位 4 遺伝子は、*ARID1A* (61.3%)、*PIK3CA* (54.7%)、*KRAS* (13.3%)、*TP53* (9.3%) であった。*ARID1A* と *PIK3CA* 変異は有意に共存しており、*PIK3CA* 変異陽性

例のうち 73.1%は *ARID1A* 変異が陽性であった ( $p=0.031$ )。一方、*ARID1A* 変異は *KRAS* 変異や *TP53* 変異とは排他的な関係にあった (各々  $p=0.039$ ,  $p<0.001$ )。また、*ARID1A*, *PIK3CA* 変異は、C>A クラスター症例 (各々 37.5%と 31.3%) よりも、C>T クラスター症例 (各々 67.7%と 87.8%) で有意に高頻度に認められた (各々  $p=0.042$ ,  $p=0.033$ )。一方、*TP53* 変異は、C>T クラスター症例 (5.3%) よりも C>A クラスター症例 (25.0%) で、有意に頻度が高かった。

5) 新規遺伝子変異として、guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha (*GNAQ*) と Kelch-like ECH-associated protein 1 (*KEAP1*) を同定した (各々 5.3%と 6.7%)。*ARID1A* 以外でクロマチンリモデリングに関わる遺伝子のうち、*SMARCA4*、*ARID1B*、*SMARCD1*、*SMARCD2*、*SMARCD3*、*SMARCC1*、*SMARCC2* にも変異が認められた。また、19 例 (25.3%) に、Notch シグナル経路の遺伝子変異が認められた。

6) 染色体コピー数異常を解析したところ、*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) の領域においてコピー数増加を高頻度に認めた。

#### [考察]

卵巣明細胞腺癌において、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との関連、(iii) 治療標的となりうるシグナル伝達経路の抽出、(iv) ドライバー変異となり得る新規の遺伝子変異の同定、について新たな知見を得た。

本研究で、卵巣明細胞腺癌でも hypermutator が存在する事が明らかとなった。これらの症例に対しては、大腸がんにおける hypermutator と同様にチェックポイント阻害剤が有効である可能性が考えられた。

遺伝子変異の塩基置換パターンを元に同定した 2 つのサブグループでは、1 例あたりの遺伝子変異数や、*ARID1A*、*PIK3CA*、*TP53* 遺伝子の変異頻度にも差を認め、2 つサブグループでは生物学的背景が異なることが示唆された。C>T クラスターにおける遺伝子変異は CpG サイトに高頻度に生じており、加齢の影響が示唆された。卵巣明細胞腺癌は子宮内膜症が発生母地とされ、内膜症性嚢胞内の過剰鉄による酸化ストレスが発がんに関わっているとされている。本解析検体でも C>A クラスターに属する変異は、酸化ストレスが関連する腫瘍や過剰鉄が関与する肝がんを確認されるパターンと同じであった。しかし、本研究で酸化ストレスが関連する C>A クラスターは全体の 21%に過ぎず、多くの症例では加齢の影響が強いと考えられた。現時点では、2 つのクラスターで年齢分布に差を認めておらず、今後更なる研究が必要である。

ドライバー変異となり得る新規遺伝子変異として同定された *GNAQ* 変異、*KEAP1* 変異は他癌腫において変異が同定されている遺伝子である。特に、*GNAQ* はメラノーマで高頻度 (眼内黒色腫の 46%) に変異が認められ、MAPK 経路の活性化に関与している。本症例で

も *KRAS* の変異 10 例とは相互排他的であり、治療標的となる可能性がある。

今後、2 つのクラスターの再現性や新規に同定された遺伝子変異の **Validate** を進める予定である。

(3964 字)