論文の内容の要旨

論文題目　　次世代シークエンサーを用いた大腸癌症例の網羅的遺伝子解析

氏名　　大賀　貴文

大腸がんは日本人の悪性新生物の中で罹患者数第一位、死亡者数第二位であり、今後も高齢化に伴い患者数は増加することが予測されている。現在までに大腸がんの原因遺伝子の大規模な探索がなされ、遺伝性大腸がんや過誤腫性ポリープをきたす症候群の原因遺伝子が同定されている。また様々なヒストン修飾や DNA のシトシンメチル化といったエピジェネティックな機構の変化や、*NAV2-TCF7L2*、*VTI1A-TCF7L2*、*RAD51C-ATXN7* 融合遺伝子の発現が報告されている。大腸がん症例の大規模なゲノム解析結果が TCGA より報告されており、また大腸がんの原発巣と転移巣を比較した小規模なゲノム解析もいくつか報告があるが、転移巣に有意な変異を認めた報告はなく、いまだ大腸がんの転移に関する原因遺伝子の特定に至っていない。

そこで今回我々は次世代シークエンサーを用いて 28 症例の大腸がん症例を「肝転移を有する症例」（$n$ = 12、A 群）と「肝転移を有さない症例」（$n$ = 16、B 群）に分け、A 群原発巣腫瘍部、A 群肝転移巣腫瘍部、A 群正常部、B 群腫瘍部、B 群正常部の全エキソーム解析、RNA-Seq 解析を行い、網羅的遺伝子解析を行うことで発がん及び転移に関連する遺伝子の同定を試みた。

A 群は 12 人で男性 3 人、女性 9 人、平均年齢 60.8 歳で平均原発腫瘍径は 48.1 mm × 45.3 mm であった。深達度は漿膜下層浸潤が 8 人と多く、またリンパ節転移を 8 人に認めた。B 群は男性 7 人、女性 9 人、B13 症例が 27 歳と若く、平均年齢 66.4 歳で平均腫瘍径は 71.8 mm × 57.8 mm であった。1 例は漿膜下浸潤し、リンパ節転移を認めていたが、その他 15 症例の深達度は結腸がんでは漿膜下層浸潤、直腸がんでは傍腸管、直腸組織浸潤であり、リンパ節転移は認めなかった。

MuTect、SID、VarScan パイプラインを用いて体細胞変異を算出したところ、全症例では計 6,855 個の体細胞変異を認め、missense 変異が 4,102 個（60%）、synonymous 変異が 1,597 個（23%）、nonsense 変異が 290 個（4%）、indel 変異が 732 個（11%）、splice site 変異が 126 個（2%）であった。A 群のみでは計 2,936 個の体細胞変異を認め、B 群は MSH 陽性症例を含んでいたため計 3,919 個の体細胞変異を認めた。A 群の原発巣と転移巣の間で変異の数、

頻度に差を認めなかった。

MSH 陽性症例である B06 腫瘍と腫瘍率の低い A07 転移巣と B15 腫瘍部を除いて検体ごとの indel 変異、missense + nonsense 変異、synonymous 変異頻度を計算したところ、全症例での平均の indel 変異頻度は 0.06/Mb（5.46 個）、missense + nonsense 変異頻度は 0.97/Mb（87.03 個）、synonymous 変異頻度は 0.34/Mb（30.49 個）であった。また A 群原発巣、転移巣、B 群腫瘍部に分けて変異頻度を計算したが、3 群において Kruskal-Wallis 検定にて変異頻度に有意な差は見られなかった。

Mutsig パイプラインを用いてドライバー変異候補（Q 値 <0.05）の探索をしたところ、全検体では *APC*、*TP53*、*KRAS*、*PTEN*、*ARID1A*、*SMAD4*、*FBXW7*、A 群では *APC*、*TP53*、*KRAS*、*PTEN*、B 群では *APC*、*TP53*、*KRAS* を認めた。全検体から選出された 7 遺伝子において A 群 B 群間で Fisher 検定を行ったが 2 群間で頻度に差がある遺伝子はなかった。A 群のみでは *PTEN* のみ有意な変異遺伝子として同定された。PTEN は PI(3,4,5)P3 を脱リン酸化し、PI(4,5)P2 へと変換させる働きを持つ酵素であり、PTEN の阻害により細胞内に PI(3,4,5)P3 が蓄積することで PI3K-AKT pathway が活性化し、がん細胞が増殖、浸潤することから PTEN はがん抑制遺伝子として働くと考えられている。膠芽腫や乳がん、前立腺がんなど様々ながんや大腸がんにおいても PTEN の変異や欠失が報告されている。大腸がん細胞株 HCT116 を用いた研究で PTEN のノックダウンにより細胞の浸潤が促進することが報告されており、今回の解析結果と合わせて PTEN の変異が大腸がんの転移に関して重要な役割を果たしていることが示唆される。

MuTect、SID、VarScan パイプラインにて nonsynonymous 変異を検出し、変異数と種類を調べた。全検体では nonsynonymous 変異数 7 以上認める遺伝子は *APC*、*TP53*、*TTN*、*KRAS*、*MUC16*、*RYR2*、*NEB*、*FAT3*、*FBXW7*、*ARID1A*、*COL18A1*、*DMD*、*DNAH5*、*PTEN*、*SMAD4* であった。A 群では nonsynonymous 変異数 5 以上認める遺伝子は *APC*、*TP53*、*KRAS*、*TTN*、*MUC16*、*RYR2*、*NEB*、*ADAMTS10*、*FAT3*、*FBXW7*、*FSIP2*、*NELL1*、*PTEN*、*RXFP3*、B 群では nonsynonymous 変異数 5 以上認める遺伝子は *APC*、*TTN*、*TP53*、*KRAS*、*MUC16*、*RYR2*、*SPEG* であった。A 群 B 群間で Fisher 検定を行ったが 2 群間で頻度に差がある遺伝子はなかった。A 群のみで nonsynonymous 変異数 5 以上を示す遺伝子の中で B 群では変異を認めない遺伝子は *ADAMTS10*、*NELL1*、*RXFP3* の 3 遺伝子であり、*RXFP3* は現在までに転移に関する報告はないが、*ADAMTS10*、*NELL1* は転移に関する報告がなされている。大腸がんにおいての報告はまだなく、今回新たに大腸がんの転移に関わる可能性が示唆された。

CNV 解析では全検体で 1p、4、15、18、17p、22q 番染色体の欠失、7、8、13、20 番染

色体の増幅を有意に認めた。このコピー数変化は現在までの報告と相似性を認め、これらコピー数変化を有意に認める領域に大腸がんの発生や増殖に関する遺伝子が存在することが示唆された。また A10 症例の原発巣腫瘍部で *EGFR* の突出したコピー数の増幅、B11 症例の腫瘍部で *ERBB2* の突出したコピー数の増幅を認め、これら 2 つの遺伝子の増幅は各症例におけるドライバー変異であると考えた。A 群原発巣と転移巣の CNV を比較すると、A02 症例は原発巣と転移巣の CNV プロファイルが異なることからクローンが異なることが示唆された。その他の症例は原発巣と転移巣の CNV プロファイルに共通性を認め、また転移巣においてコピー数変化が追加で起きており、この領域に転移に関わる遺伝子が存在することが推測された。しかし今回の解析では個々の症例で様々な部分の増幅や欠失が起きており、転移巣に特徴的なコピー数変化を認めず、CNV 解析から大腸がんの転移に関する遺伝子を予測するのは困難であった。

A 群原発巣、転移巣、B 群のそれぞれから 3 群に特異的にみられる nonsynonymous 変異を MuTect、SID、VarScan パイプラインにて抽出し、Ingenuity Pathway Analysis を用いて pathway 解析を行い、どのようなタンパク質の機能カテゴリーが濃縮されているか検討した。A 群原発巣のみで体細胞変異を認めた遺伝子群においてはがん化に関わるパスウェイは濃縮されなかった。これは A 群原発巣のみでは原発巣、転移巣で共通する遺伝子群の中にドライバー遺伝子が含まれるためと考えられる。B 群腫瘍部のみで体細胞変異を認めた遺伝子群においては hereditary breast cancer signaling を濃縮し、また転移を有さない群にも関わらず Epithelial adherens junction signaling が濃縮された。A 群転移巣のみで体細胞変異を認めた遺伝子群においては Wnt/$Ca^{2+}$ pathway と PCP pathway が濃縮された。この 2 つの経路は β-カテニン非依存性 Wnt シグナル経路であり、胃がんや大腸がんにおいて活性化することで細胞の遊走、浸潤が誘導されることが報告されている。今回の解析では Wnt 受容体である Fz family、またその下流にある PLC、MAPK9 の変異を認めており、これら遺伝子の変異により β-カテニン非依存性 Wnt シグナル経路が活性化することが大腸がんの転移に関与することが示唆された。

RNA-seq のデータをもとに、deFuse パイプラインを用いて融合遺伝子の探索を試み、A09 転移巣で *ADAP1-GET4*、B03 腫瘍で *ADAP1-SUN1* を out of flame で、その他 7 つの融合遺伝子を in-flame で認めた。また研究室独自のアルゴリズムでも融合遺伝子を探索し、*ADAP1* 融合遺伝子として A09 転移巣で *ADAP1-GEMIN4*、A04 転移巣で *ADAP1-NOC4L*、B03 腫瘍で *ADAP1-TMEM8A* を in-flame で認め、発現、配列を RT-PCR で確認した。

今回新たに認めた *ADAP1* 融合遺伝子はいずれも同じエキソンで切れて 3’側のパートナ

一遺伝子と融合しており、ArfGAP domain は保持するものの、機能活性に必要と思われる PH domain を欠失していた。そのため GTP 結合活性型 ARF6 を GDP 結合不活性型 ARF6 に変換する ADAP1 の ArfGAP の機能を喪失し、GTP 結合活性型 ARF6 を蓄積することでがん化に寄与していると推測された。今回同定された *ADAP1* 融合遺伝子の中で *ADAP1-GET4*、*ADAP1-SUN1* のみ全長 cDNA を RT-PCR にて増幅することに成功し、この 2 つの融合遺伝子を HEK293T 細胞に導入し過剰発現させ、Arf6 activation assay にて活性型 ARF6 のタンパク定量を Western blotting にて行ったところ、推測通り活性型 ARF6 の発現が増加することを確認することができた。今回の実験では全ての *ADAP1* 融合遺伝子の全長 cDNA を RT-PCR で増幅することができなかったが、増幅できなかった 3 つの *ADAP1* 融合遺伝子も同様に過剰発現することで活性型 ARF6 が蓄積することが予想され、また *ADAP1-GEMIN4*、*ADAP1-TMEM8A* は in-frame で 3’側の遺伝子と融合しており、更なる機能を有している可能性がある。

以上、本論文では転移に関する遺伝子として *PTEN*、*ADAMTS10*、*NELL1*、*RXFP3* を同定し、転移に関わる pathway として β-カテニン非依存性 Wnt シグナル経路を同定した。CNV 解析では全検体において有意なコピー数変化のパターン、EGFR や ERBB2 の増幅、転移巣で様々なコピー数変化が追加されることを認めた。また 12 個の新規融合遺伝子を同定し、*ADAP1* 融合遺伝子を 3 症例で 5 種類認め、*ADAP1* 融合遺伝子の過剰発現により活性型 ARF6 の発現が増加することを確認した。今回の解析は症例数が少なく、また今後 *in vitro*、*in vivo* の実験によって同定した遺伝子の機能をさらに調べる必要があると考える。しかし今回の解析はこれまでの大腸がんのゲノム解析結果を支持する結果に加え、大腸がん転移に関する候補遺伝子、また大腸がんの発生に関する新たな融合遺伝子の候補、転移に関するシグナル経路を同定した点で大腸がんの発生及び転移のメカニズム解明に寄与するものと期待する。今後さらにより多くの症例でゲノム解析を行い、機能解析することで大腸がんの増殖、転移を抑制する治療標的の発見及び治療薬の開発につなげることが重要である。