博士論文（要約）

生検組織標本及び末梢血遊離 DNA を用いた
ランゲルハンス細胞組織球症のゲノム解析

小　林　真　之

ランゲルハンス細胞組織球症（Langerhans Cell Histiocytosis, LCH）は、樹状細胞のひとつであるランゲルハンス細胞の特性をもつ細胞が腫瘍性に増殖し、炎症細胞を伴って全身の諸臓器を侵す疾患である。生命予後は悪くない疾患である一方で、症状の多彩さや医療従事者における疾患認知度の低さ、そして診断の難しさなどにより治療介入が遅れ、不可逆的な状態にまで進行してしまっているケースも多い。LCH は腫瘍性疾患と炎症性疾患の特性を併せ持っており、その発症機序や病態は不明な点が多かったが、2010 年に LCH 症例の過半数で BRAF の点突然変異（V600E）が同定されたことを受けて、現在は腫瘍性疾患であると考えられている。BRAF は細胞内シグナル伝達経路である MAP キナーゼ経路の下流に位置し、BRAF のコドン 600 のバリン（V）がグルタミン酸（E）に変わる点突然変異は悪性黒色腫など多くの悪性腫瘍におけるドライバー変異として知られている。現在、BRAF-V600E 陽性の LCH においてもこれが発症のドライバー変異と考えられており、実際に治療抵抗例に BRAF 阻害剤である vemurafenib が著効したとの報告がある。このため LCH 患者において BRAF-V600E の有無を確認することは極めて重要であるが、特殊な好発部位に伴う生検の難しさや組織における腫瘍占拠率が低いという特性から BRAF-V600E の同定は容易ではない。

近年、末梢血中の遊離 DNA（cell free DNA; cfDNA）が悪性腫瘍の遺伝子情報を検出する手段として注目されている。cfDNA は健常人においても 150-250 塩基程度の DNA 断片としてその血液中に存在しているが、これは体内の各組織における細胞死などの際に血中に放出されたものと考えられている。癌患者においては cfDNA に癌細胞由来の DNA 断片が多分に含まれていることが報告され

ており、患者の血中 cfDNA を用いて癌遺伝子の変異やエピゲノム異常を同定できたという報告を受けて、その研究は加速している。特に肺癌や乳癌においては侵襲的な検査を伴わず採血のみで行える生検、“Liquid biopsy”として臨床現場への応用も試みられようとしている。

本研究では生検困難な LCH に対して、生検に替わる手段として患者の末梢血 cfDNA を用いた非侵襲的な BRAF-V600E の検出、定量化を試みた。また、次世代シークエンサーを用いた網羅的ゲノム解析によって、BRAF-V600E を持たない LCH 患者検体から新たなドライバー変異や BRAF-V600E と協調的に働く未知なる遺伝子異常の探索を試みた。

cfDNA より BRAF-V600E を検出する手法として、アリル特異的なプライマーと野生型配列の増幅を抑制するブロッカーの組み合わせによるリアルタイム PCR を試みた。具体的には、BRAF-V600E 変異型を識別するフォワードプライマーとリバースプライマー、そして相対定量におけるコントロールとなる配列のプライマーセット、さらに野生型 BRAF 配列の 3’末端をリン酸化したオリゴ（ブロッカー）を設計した。BRAF-V600E は 1 塩基のみの点変異であるため、変異型に特異的な配列のプライマーセットを用いても増幅回数を重ねるに従って非特異的反応が起きてしまい、これが検出感度を下げる要因となる。このブロッカーを反応液に加えることで、変異型検出の際に野生型配列の非特異的増幅を阻害することが可能となり、検出感度の向上に繋がった。cfDNA は当院を受診され同意を得た成人 LCH 患者の末梢血の血漿より抽出し、リアルタイム PCR は MIQE ガイドラインに則って施行した。

まず BRAF-V600E 陽性症例において、同一末梢血検体における単核球 DNA

と cfDNA を同一条件下のアリル特異的リアルタイム PCR で反応させ結果を比較したところ、cfDNA は単核球 DNA に比べ 10 倍以上の LCH 由来 DNA を含んでおり、cfDNA は単核球 DNA よりも解析に適していると考えられた。また、LCH 患者は健常人に比べ cfDNA 量が有意に多いことも確認された。

疾患活動性の高かった LCH 患者 15 名の解析では 6 名（40 %）が cfDNA のアリル特異的リアルタイム PCR で BRAF-V600E 陽性であった。なお、健常人 8 人の cfDNA を陰性コントロールに用いたが、偽陽性例はなかった。LCH 患者 15 名中 14 名はアリル特異的リアルタイム PCR で良好な結果を得たが、1 名のみ繰り返し反応を行うも結果が非常にばらついた。そこで、その 1 名についてはデジタル PCR での定量を試みたところ、BRAF-V600E は 66.1 %と極めて高い比率で存在していることが判明した。また、治療開始前に BRAF-V600E が陽性であることが確認できた 2 名について、治療経過とともに末梢血 cfDNA の BRAF-V600E を追ったところ、いずれも治療反応と cfDNA における BRAF-V600E は相関していることが確認された。

次に、BRAF-V600E が組織でも末梢血 cfDNA でも確認されなかった 3 名の病変組織（頭蓋骨 FFPE 標本、リンパ節 FFPE 標本、皮膚病変）に対して、TruSight One シークエンスパネルで 4,813 遺伝子について網羅的な解析を行った。3 例において、ターゲット領域は平均 87.9 リードの深度（depth）で読み込まれており、Q30 の平均は 94.4 %と十分なカバレッジで読み込まれていた。得られたシークエンスデータに対して東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターにおけるスーパーコンピュータ Shirokane 3 と Genomon パイプラインを用いてクオリティチェックやマッピング、アノテーション作業などを行った。3 例合計で 786 の体

細胞変異（SNV: 679、insertion: 26、deletion: 81）が候補となったが、さらに癌との関連性が高いとされる COSMIC Cancer Gene Census に登録されている 609 遺伝子を中心に、さらに複数の SNP データベースや機能解析ツールを用いた候補遺伝子の絞り込みを行ったところ、3 例に共通するドライバー候補として KMT2C のミスセンス変異を複数同定した。これらの変異は COSMIC に癌関連変異として登録されており、その他複数の機能予測解析ツールにおいても病原性変異を疑わせる結果であった。しかしながら、候補すべてが Genomic Super Dups でも極めて高いスコアを示しており、segmental duplication である可能性を否定できなかった。この他、COSMIC Cancer Gene Census には登録されていないが、PI3 キナーゼの触媒サブユニットの一つである PIK3CD のミスセンス変異（c.G2049A：p.M683I）を 1 例で認めた。PIK3CD は 4 つのサブユニットのうち血液細胞に特化した存在として知られており、癌に関連する報告は多くないが、PI3 キナーゼ経路は MAP キナーゼ経路と同様に発癌において非常に重要なシグナル伝達経路であり、また互いに複数の共通する媒介物質を上流にもつことから、LCH においても PIK3CD の変異が発症に寄与している可能性は十分に考えられた。

本研究によって、LCH 患者の末梢血 cfDNA より非侵襲的に BRAF-V600E を検出することが可能となり、BRAF-V600E 陽性 LCH 患者においては病態を反映するバイオマーカーになり得る可能性が示された。また、新たなドライバー変異候補として PIK3CD のミスセンス変異を同定した。LCH は BRAF-V600E 変異の発見によって近年飛躍的に研究が進んだが、未だ動物モデルの報告も少なく、その詳細な発症機序は解明されていない。今後も引き続き、BRAF-V600E と協

調的に働く遺伝子変異や新たなドライバー変異の探索、さらには in vivo モデルの構築などによる病態解明が望まれる。