

論文の内容の要旨

論文題目 卵巣漿液性癌における次世代シーケンサーを用いた サブグループ、予後規定因子の同定

氏名 浅田 佳代

悪性腫瘍の発生・進展において、様々な遺伝子変異やエピジェネティックな異常が蓄積していることが知られている。ゲノムワイドな解析技術の急速な進歩により、遺伝子発現、染色体コピー数、メチル化について、網羅的に調べることが可能となっている。近年では全エクソンシーケンスを通して、癌腫によって変異プロファイルに特徴があることが明らかとなっており、発がんおよび進展に関わる生物学的背景との関連が示唆されている。さらに解析手法の発達によりビッグデータを扱えるようになったため、30 がん腫、約 7000 症例を集積したがん腫横断的な検討をもとに、点突然変異の塩基置換のパターンを 6 種類(C>A, C>T, C>G, T>A, T>C, T>G)だけでなく、その前後各 1 塩基の配列を加えた合計 96 種類(4x6x4=96)の変異頻度として集計、解析する「変異シグネチャー」が注目されており、さらに発がん過程の理解に寄与すると考えられている。

卵巣癌は婦人科癌において最も死亡率の高い悪性腫瘍である。卵巣は腫瘍が発生しても自覚症状に乏しく、進行期になってから発見される症例が約半分に及ぶ。卵巣癌の標準治療法は、積極的な腫瘍減量術とタキサンとプラチナ製剤による化学療法であり、手術完遂度と化学療法感受性が予後因子として知られている。卵巣がんの中で最も高頻度である高異型度卵巣漿液性癌においては、96%の症例で *TP53* 変異が認められ、51%の症例において相同組換修復関連遺伝子変異(HRD :Homologous Recombination Deficiency)が存在し、HRD の内訳として、遺伝性乳癌卵巣癌 (HBOC: Hereditary Breast and Ovarian Cancer) の原因遺伝子である *BRCA1/2* 生殖細胞変異に加え、*BRCA1/2* の体細胞変異、*BRCA1* の高メチル化などが明らかとなっている。また、*BRCA1/2* 変異と相互排他的な因子として、*CCNE1* 増幅が報告されている。しかしながら、本邦においては全エクソンシーケンスを含めた網羅的解析は未だ行われていない。本研究では高異型度卵巣漿液性癌について、次世代シーケンサーを用いた統合的ゲノム解析により、そのゲノムの全体像を通して、サブグループの生物学的特徴や予後を予測するバイオマーカーを明らかとし、新たな治療戦略を確立するための基礎的知見を得ることを目的とした。

対象は高異型度卵巣漿液性癌患者 78 例とし、全エクソンシーケンス、RNA シークエンス、メチル化アレイを行った。変異遺伝子群の同定、遺伝子変異シグネチャーおよび遺伝子発現プロファイルのそれぞれに基づくサブグループの同定、遺伝子変異プロファイルと化学療法感受性や手術完遂度との関連性についての検討、変異シグネチャーに関わるメチル化遺伝子の同定を行った。さらに、1 症例については腹水や転移・播種巣の全エクソンシーケンスを行い、原発巣と播種巣との変異遺伝子群の比較、腹水中のがん細胞から抽出される変異遺伝子群の特徴を解析した。

全エクソンシーケンスの結果、1 症例あたりに同定された遺伝子変異数の中央値は 95 個であった。個々の遺伝子変異を解析したところ、*TP53* は 95%の変異率を示した。*BRCA1* の体細胞変異を持つ症

例は 3.8%、*BRCA2* の体細胞変異を持つ症例は 2.6%であった。*BRCA1* の生殖細胞変異を持つ症例は 17.9%、*BRCA2* の生殖細胞変異を持つ症例は 9.0%であり、その他 HR 遺伝子として *RAD51C/RAD51D* の生殖細胞変異を持つ症例がそれぞれ 2.6%であった。*BRCA1* プロモーター領域の高メチル化 9.0%と合わせて、これら HR 関連遺伝子変異は、相互排他的に変異が存在しており、42.3%の症例(33 症例)において HR 関連遺伝子の変異・メチル化が陽性であることが明らかとなった。変異数と予後を調べたところ、変異が多い群の予後が有意に良好であった。また、手術により残存腫瘍をゼロにしえた症例では、変異数が多い傾向にあり、化学療法感受性の高い群(Treatment free interval >6 か月)では変異数が有意に多かった。次に、遺伝子変異の塩基置換パターンをもとに変異シグネチャーの解析を行ったところ、「BRCA シグネチャー」と「Age シグネチャー」が主たる変異パターンとして同定された。「BRCA シグネチャー優位群」は 76.9%を占め、「Age シグネチャー優位群」は 23.1%であった。BRCA シグネチャー優位群の遺伝子変異個数は中央値 102 個、平均値 109.1 個±49.3 個であり、Age シグネチャー(中央値 45 個、平均値 51.2 個±27.5 個)に比べ、有意に変異個数が多かった。*BRCA1/2* 変異陽性群では 25 例中 24 例が BRCA シグネチャーであり、有意に BRCA シグネチャー優位群が多かった。さらに、「BRCA シグネチャー優位群」は全生存期間が有意に長かった。次に全エクソンシーケンスにより検出された体細胞変異を用いて、パスウェイ解析を行ったところ、コヒーシン関連経路の遺伝子群が検出された。コヒーシンとは姉妹染色分体の接着に中心的な役割を果たすタンパク質複合体であり、HRD との関連性も示唆されている。ユーイング肉腫や骨髄性白血病で 5~20%に変異が同定されている。本研究では 10 例(12.8%)にコヒーシン関連経路の遺伝子変異が検出された。上述の HR 関連遺伝子変異との相互排他性が認められたことより、HRD に関与している可能性が考えられる。しかしながら、コヒーシン経路変異群では化学療法感受性は有意に低く、*BRCA1/2* 変異との相違点も明らかとなった。メチル化解析において「Age シグネチャー優位群」と「BRCA シグネチャー優位群」の 2 群に分け、CpG island のメチル化について、上位 10 遺伝子を抽出したところ、*protocadherin* に関わるものが 6 遺伝子を占めた。加齢によりメチル化される遺伝子として *protocadherin* は有名であり、Age シグネチャーを示す変異プロファイルに寄与していると考えられた。また、RNA シーケンス解析を行ったところ、4 つのクラスターに分類された。発現上昇している遺伝子群を相互に比較したところ、クラスター 1 が上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) 関連遺伝子、クラスター 2 では細胞増殖・細胞分化関連遺伝子、クラスター 3 ではサイトカインや炎症に関連した遺伝子、クラスター 4 では細胞分化に関連した遺伝子がそれぞれ抽出された。上記 4 クラスターと遺伝学的各因子との関係を調べたところ、*CCNE1* の増幅および Age シグネチャー陽性の症例では、21 例中 8 例が Proliferative タイプ、コヒーシン経路変異は 7 例中 5 例が Immunoreactive タイプであり、有意に相関していた。BRCA シグネチャーを示し、HRD 因子が陰性、コヒーシン経路変異陰性、*CCNE1* 増幅陰性例は Mesenchymal タイプに分類される傾向を認めた。

最後に、漿液性卵巣癌 1 症例において、原発腫瘍(左卵巣 2 ヵ所)、右卵巣 1 ヵ所、大網播種巣 2 ヵ所と腹膜播種巣 1 ヵ所、腹水を採取し、DNA を抽出し全エクソンシーケンスを行ったところ、腫瘍 DNA 全てにおいて認める変異遺伝子数は 30 個に過ぎず、その中には *TP53* も含まれていた。腹水中での検出率を見ると、前述の 30 個の変異の中で 29 個(96.7%)は腹水中でも検出された。また、腹水において検出率が高かったのは原発巣よりも腹膜播種巣で検出された変異群であった。

本研究により、高異型度卵巣漿液性癌について *TP53* 遺伝子変異が普遍的にみられることに加え、生殖細胞における *BRCA1/2* 変異率が本邦でも高頻度であることが示された。体細胞における *BRCA1/2* の変異、*BRCA1* のプロモーター領域の高メチル化の他、新たにコヒーシン経路の遺伝子変異が 13%に

存在していることを見出し、*BRCA1/2*変異を含めた HRD 陽性腫瘍と同様に、変異の蓄積パターンが "BRCA シグネチャー"優位であることを明らかとした。遺伝子変異個数の意義として、個数の多さは化学療法感受性と正に相関するのみならず、手術の完遂度とも相関することが示された。「Age シグネチャー」優位群において、*Protocadherin* の高メチル化が関与していることを明らかとした。発現アレイにおけるクラスタリングは、HRD 因子、コヒーシン経路変異、変異シグネチャーと密接に関連しており、卵巣漿液性癌のサブグループの生物学的特徴を反映していることが示唆された。腹水 DNA を用いた全エクソンシーケンス解析結果より、将来的に腫瘍検体の代替試料としての腹水の有用性も示唆された。今後、各遺伝子変異の生物学的意義、分子標的治療薬との関連性、コヒーシン経路における DNA 損傷修復の機能解析、BRCA シグネチャーと PARP 阻害剤 (*BRCA1/2*変異陽性卵巣癌において欧米で保険収載済み) 感受性との関連性の解析といった課題を調べていくことが必要である。今後、卵巣漿液性癌における個別化治療を進める上での基礎的知見として本研究成果を活用していくことが期待される。