

博士論文（要約）

個別化医療に向けた骨軟部腫瘍における
臨床および基礎的研究

小 倉 浩 一

論文の内容の要旨

論文題目 個別化医療に向けた骨軟部腫瘍における臨床および基礎的研究

氏名 小倉 浩一

欧州における希少がんのワーキンググループ RARECARE (Surveillance of Rare Cancers in Europe) によると「希少がん」は年間発生数が人口 10 万人あたり 6 人以下と定義されている。骨軟部肉腫は年間発生数が人口 10 万人あたり 2.8 人と代表的な希少がんである。さらに 2013 年版の最新の WHO 分類によると骨軟部肉腫の組織型は 50 種類以上にも及び、その多様性が個々の骨軟部肉腫の希少性にさらに拍車をかけている。このような背景から、骨軟部肉腫の個々の組織型について十分な症例・検体を収集して解析を進めることは臨床研究および基礎研究のいずれにおいても困難を極める。したがって、臨床研究においてはエビデンスの構築や標準治療の開発、患者個々の特性に応じた個別化治療の導入などの点において、他のがんと比較して大きく遅れをとっている。一方、近年、多くのがんにおいて分子遺伝学的背景が解明され、分子遺伝学的背景に基づいた個別化治療の開発と臨床現場への導入が積極的に行われているが、骨軟部肉腫においては分子背景などの病態解明、バイオマーカーの同定、新規治療薬の開発などは十分になされておらず、基礎研究においても、これらを他のがんと同様に行っていくことは骨軟部肉腫の今後の極めて重要な課題である。本研究では、希少がんである骨軟部肉腫における個別化医療の開発の促進を目的として、臨床および基礎的な視点に立った 2 つの研究成果を報告する。

第一に、個別化医療を目指した臨床研究として、国際連携により補助化学療法および手術にて治療を行った骨肉腫症例を 1070 例集積し、骨肉腫の予後に関連する因子に関する検討を行い、全生存率、無転移生存率を予測するノモグラムを開発し、その外的妥当性を検証した。その結果、全生存率、無転移生存率のいずれのノモグラムも非常に良好な予測能を有する予測モデルであることが明らかになった。我々が開発したノモグラムは骨肉腫において外的妥当性が証明された唯一のノモグラムであり、本ノモグラムを使用することで、個々の症例に対して正確な予後を予測することが可能となり、治療方針の決定や経過観察の一助となる可能性がある。しかし、我々が開発したノモグラムは日本、韓国といったアジアのコホートに基づいた予測モデルであり、国際標準として臨床現場で用いられるためには、欧米のコホートを初めとし、人種、治療方法などが異なる海外のコホートを用いた外的妥当性の検証が必要である。また、最終的には我々が開発したノモグラムを用いたり

スク分類による個別化医療の実現を目指すためには症例数の蓄積を行い、予後情報をリアルタイムに予測モデルに反映させることで予測精度を改善していくことが必要である。

第二に、骨軟部肉腫の中でも、薬剤抵抗性かつ難治性であり、解析に足る検体数が確保可能な代表的腫瘍という観点から粘液線維肉腫に焦点を絞り、次世代型標準治療としての分子背景に基づく個別化治療開発を促進すべく、最新のゲノムシーケンス解析技術を駆使した臨床検体を用いたゲノム・エピゲノム統合的解析を行い、体細胞レベルで起こる遺伝子の構造異常（突然変異、遺伝子増幅、遺伝子欠損）や DNA メチル化異常を網羅的に検索し、臨床病理学的なデータと対比することで腫瘍発生や悪性化機構の分子遺伝学的解明を試みた。

粘液線維肉腫はかつて悪性線維性組織球腫の一亜型として扱われており、特徴的な臨床病理像から、2002 年の WHO 分類の改訂以来、明確に定義された独立した疾患概念として扱われるようになった背景がある。疾患自体の希少性に加え、このような疾患概念の変遷のため、これまで網羅的かつ探索的なゲノム異常の解析は十分に行われてきておらず、粘液線維肉腫に特異的な遺伝子異常はほとんど知られていなかった。その後、粘液線維肉腫の一部の症例にコピー数変異（染色体 5p の増幅や *CDKN2A*、*CDKN2B*、*TP53* などのがん抑制遺伝子の欠失）や体細胞変異（11%に *NF1* の不活性型変異、3%に *PTEN* の不活性型変異）があることが報告されたが、これらの知識は未だ断片的なものであり、粘液線維肉腫という疾患を分子遺伝学的に理解するには至っていなかった。

本研究では、前述した疾患概念の変遷を考慮し、過去に悪性線維性組織球腫と診断された症例も含めた病理診断の見直しを行い、現在の診断基準に則った正確な病理診断を行ったうえで、粘液線維肉腫症例を選択し、国内最大級の肉腫凍結組織を有する国立がん研究センターバイオバンクに保存されている多数の臨床検体を用いて、体細胞レベルで起こる遺伝子の構造異常（突然変異、遺伝子増幅、遺伝子欠損）や DNA メチル化異常を網羅的に検索し、ゲノム・エピゲノム統合的な解析を行った。さらに、TCGA (The Cancer Genome Atlas) に登録・公開されている粘液線維肉腫 25 例のデータに cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) よりアクセスし、これらのシーケンスのデータを統合し、それぞれの遺伝子変異の頻度を算出した。その結果、*TP53* (28/66, 42%)、*RB1* (12/66, 18%)、*NF1* (9/66, 14%)、*CDKN2A* (8/66, 12%)、*CDKN2B* (8/66, 12%)、*ATRX* (7/66, 11%)、*CCND1* (7/66, 11%)、*NTRK1* (6/66, 9%) *JAK1* (5/66, 8%) など頻度の高い体細胞変異、コピー数変異を同定した。これらのうち、過去に報告のない新規のドライバー変異として *ATRX* 変異、*CCND1* 増幅、*JAK1* 増幅を同定した。さらに、変異の分布に注目することで、p53 経路および細胞周期関連遺伝子に高頻度に異常がみられ (65%)、なおかつ、頻度の高い 3 つの細胞周期関連遺伝子である *RB1* 変異、*CDKN2A* または *CDKN2B* ホモ接合性欠失、*CCND1* 増幅がほぼ相互排他的に生じており、細胞周期の中でも G1 期から S 期への移行（いわゆる *RB1* 経路）の調節異常が粘液線維肉腫の発生に深く関与していることを見出した。また、これまで粘液線維肉腫において分子遺伝学的な背景と臨床病理学的なデータの関連性を示した報告はないが、本

研究の結果から *RB1* 変異で規定される粘液線維肉腫では遠隔転移や腫瘍死、*CDKN2A*、*CDKN2B* ホモ接合性欠失で規定される粘液線維肉腫では腫瘍死の傾向が強いのに対し、*ATRX* 変異で規定される粘液線維肉腫では局所再発傾向は強いことが明らかになった。すなわち、遠隔転移とそれに引き続く腫瘍死に関連する分子異常と粘液線維肉腫の特徴とされる局所浸潤性、局所再発と関連する分子異常は、それぞれ異なった生物学的形質に帰結することが示唆された。また、RNA シークエンスの結果、1 例において *BRAF* 癌遺伝子を含む新規融合遺伝子 *SLC37A3-BRAF* 融合遺伝子を同定した。*BRAF* は RAS-RAF-MAPK における細胞内シグナル伝達を介して細胞増殖に関与するリン酸化蛋白質であり、様々な腫瘍で *BRAF* 変異による下流シグナルの活性化による悪性形質の獲得が報告されている。また、*BRAF* はキナーゼ活性を有することから、治療標的となる可能性が期待される。さらに、DNA メチル化のパターンにもとづいて症例をクラスタリングしたところ、粘液線維肉腫は 3 つのサブグループに分類されることを明らかにした。

しかしながら、本研究では、TCGA のデータベースに登録されている症例をあわせても症例数が 66 例であり、さらに症例数を増やして検討する必要がある。また、同定した *SLC37A3-BRAF* 融合遺伝子について、腫瘍発生への関与を確認するためには、細胞培養を用いた機能解析が必要である。今後、これらの結果も統合することで、粘液線維肉腫のゲノム・エピゲノムの全体像のさらなる理解が可能となり、分子遺伝学的背景に基づいた個別化治療の開発と臨床現場への導入につながることが期待される。