

博士論文（要約）

Actionable fusion kinases in sporadic
microsatellite instability-high colorectal cancers

（高頻度マイクロサテライト不安定性を呈する
孤発性大腸癌の治療標的となり得る融合キナーゼ）

佐藤一仁

論文の内容の要旨

論文題目 Actionable fusion kinases in sporadic microsatellite instability-high colorectal cancers

(高頻度マイクロサテライト不安定性を呈する孤発性大腸癌の治療標的となり得る融合キナーゼ)

氏名 佐藤一仁

背景と目的

マイクロサテライト不安定性 (MSI) とは、DNA の複製の際に生じる塩基配列の間違いを修復する機能の低下により、ゲノム上に散在するマイクロサテライト反復配列(CACACA 等)が腫瘍組織において正常組織と異なる反復回数を示す現象である。National Cancer Institute (NCI)は、ベセスダパネル (1 塩基反復配列マーカ BAT25, BAT26、2 塩基反復配列マーカ D2S123, D5S346, D17S250) の計 5 マーカのうち、いずれか 2 つ以上のマーカで MSI が検出されれば高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-H)、1 つのマーカで検出されれば低頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-L)、5 マーカとも検出されなければマイクロサテライト安定性(MSS)と分類した。MSI-H のうち遺伝性のものをリンチ症候群(LS)と呼ぶ。LS では DNA ミスマッチ修復(MMR)遺伝子の生殖細胞系列変異を有するため、もう一方のアレルに後天的異常が加わると MMR 機構が損なわれる。それにより MSI が現れると共に癌遺伝子や癌抑制遺伝子に変異が蓄積し癌化する(Vasen, *Gut* 2013)。

近年、BAT25 および BAT26 が MSI であるものを厳密な MSI-H とすべきであると考えられるようになり(Jass, *EJC* 2002)、臨床的には BAT25 と BAT26 を含む 1 塩基反復配列マーカを用いる Promega 社のパネルを用いることが多くなった。NCI の定義する MSI-H 大腸癌が全大腸癌の約 10%を占めるのに対し、BAT25/BAT26 の両者が MSI である割合は約 5%に過ぎず、症例収集の難しさにより厳密な MSI-H のみを対象とした研究はほとんど無い。

最近、MSI-H が多くの体細胞変異すなわち変異関連抗原を有し免疫が賦活化されるため、MSI-H では免疫チェックポイント阻害薬 (抗 PD-1 抗体など) の奏効率が高く、アメリカ食品医薬品局で MSI-H 癌に対する治療薬として承認された。ただし、免疫チェックポイント阻害薬の薬価は高く肺臓炎などの副作用が報告されており、非奏効の MSI-H 癌をどう見分けるかが喫緊の課題となっている。

MSI大腸癌は再発後の予後が不良である (Guinney, *Nat Med* 2015) が、MSIをサブタイプ分類して予後を検討した報告はほとんどない。

本研究では、1998年3月から2016年6月までに東京大学および帝京大学で手術治療された約2,800例の大腸腫瘍のうち、ベセスダパネルとPromega社のパネルで共通に用いられている、BAT25/BAT26の両者がMSIを呈した149の厳密なMSI-H大腸腫瘍の網羅的解析を行い、MSI-H大腸癌のサブタイプ分類、細胞性免疫、治療標的、予後について検討した。

方法と結果

【MSI-H 大腸腫瘍の分類】

149 の MSI-H 大腸癌のうち 93 例の MSI-H 大腸癌に対しメチル化アレイを行ったところ、MMR 遺伝子の一つである *MLH1* メチル化の有無が明確であった。このため、*MLH1* のメチル化を分類の軸に用いることとし、*MLH1* メチル化により *MLH1* の発現がエピジェネティックに抑制（サイレンシング）されている 64 の大腸癌を *MLH1* メチル化(MM)大腸癌と名付けた。なお、*MLH1* 以外の他の MMR 遺伝子のメチル化はいずれも観察されなかった。MMR 遺伝子の生殖細胞系変異を有するリンチ症候群 (LS) 随伴大腸腫瘍が 22 あった一方で、MMR 遺伝子の生殖細胞系変異も *MLH1* サイレncing も認めない腫瘍が 21 あったが、これらはメチル化アレイで LS と同じクラスターに分類されたため、これらの癌はリンチ様(Lynch-like, LL)と名付けた。

MM 大腸癌は、右側大腸に多いのに比し、LS 随伴大腸腫瘍/LL 大腸癌は両側大腸に観察された。MM 群が LS/LL 群よりも、大腸癌手術時の患者年齢が高齢であり、再発後の予後が不良であった。

【全エクソン解析およびアレル別コピー数・変異シグナチャー・パスウェイ解析】

次に、149 の MSI-H 大腸腫瘍とそのペア正常部の全エクソン解析(WES)を行ったところ、MM 群では LS/LL 群よりも、挿入・欠失変異が多く、*BRAF* と *RNF43* の変異は頻発し、*KRAS*, *APC*, *TCF7L2* の変異は低頻度だった。

WES に基づくアレル別のコピー数解析により *TGFBR2*, *MLH1*, *CTNNB1* の Uniparental disomy が LS/LL に特異的に観察された。また変異シグナチャー解析により、*PMS2* の変異を有する癌において高い割合で認められたシグナチャーが同定された。

MSI-H 大腸腫瘍のパスウェイ解析では Wnt パスウェイ、RAS/RAF/Mitogen-activated protein kinase パスウェイ、ヒストン H3 メチル化関連パスウェイ、DNA 損傷応答パスウェイの変異が頻発していた。

【免疫学的検討】

WESの結果、MSI-H大腸腫瘍の21%に免疫関連遺伝子の機能喪失型変異が見られたため、同遺伝子変異に着目してCD8の免疫組織染色を行った。同遺伝子変異型のMSI-H大腸癌では、同遺伝子野生型のMSI-H大腸癌よりも腫瘍浸潤CD8陽性細胞数が少ないことが観察された。

次に、cDNA を用いた T 細胞受容体レパトア解析を行ったところ、MSS 大腸癌よりも MSI-H 大腸癌でより T 細胞受容体が多様であった。また、T 細胞受容体レパト

アは、MSI-H 大腸癌の中では、*CD8B* の messenger RNA の発現と負の相関が認められた。

【MSI-H 大腸癌のドライバ変異と機能解析】

トランスクリプトームシーケンス (RNA-seq) を行った 111 MSI-H 大腸腫瘍の中で、*KRAS*, *BRAF* の発癌ドライバ変異を各々 16%, 48% に認め、それらとは相互排他的に 11 の融合遺伝子が同定された。これら融合遺伝子の転写産物の発現を RT-PCR で確認し、サンガーシーケンスにより融合キナーゼのゲノムレベルでの融合部位を同定し、これら融合が後天的であることを確認した。

次に、同定した融合キナーゼを 3T3 細胞に高発現させ、フォーカスフォーメーションアッセイにより造腫瘍能を確かめた。さらに、キナーゼ阻害剤アッセイにより *INSR*, *RET*, *NTRK1*, *NTRK3* 融合遺伝子については、各キナーゼ阻害薬が特異的に融合遺伝子の形質転換能を抑制することを明らかにしたが、*BRAF* 融合遺伝子への *BRAF* 阻害薬 (PLX7904) の抑制効果は特異的ではなかった。

【費用対効果の高い融合キナーゼ検出法】

融合キナーゼを同定する目的で全 MSI-H 大腸癌に対して次世代シーケンサを行うのは高価であり現実的ではない。そこで 1998 年 3 月から 2016 年 6 月までの RNA-seq 未施行であった 13 の MSI-H 大腸癌と、2016 年 7 月～2017 年 4 月の 185 の原発性大腸癌を用いて追加解析した。まず MSI 検査を行い、MSI-H であった場合に、*KRAS/BRAF* 変異をサンガーシーケンスで同定し、*KRAS/BRAF* ドライバ変異がない MSI-H 大腸癌に対して、RNA-seq を行ったところ、僅か 10 の *KRAS/BRAF* のドライバ変異を持たない MSI-H 大腸癌から *NCOA4-RET* と *CUL1-BRAF* の 2 つの融合キナーゼを同定できた。

【予後解析】

MSI-H 大腸癌の予後解析を行った。意義が不明な変異を野生型に含めると、*BRAF*(V600E) は *BRAF* 野生型よりも有意に全生存率が不良であり ($P = 2.3 \times 10^{-2}$)、*BRAF*(V600E) は、*BRAF* 野生型から融合キナーゼを除いた群よりも全生存率は不良であった ($P = 9.5 \times 10^{-3}$)。一方、融合キナーゼを有する群は *KRAS* ドライバ変異を有する群よりも再発後の予後が不良であった ($P = 8.2 \times 10^{-3}$)。

考察

これまで MSI-H 大腸癌は遺伝性か孤発性という 2 つの分類がなされてきたが、本研究により MSI-H 大腸癌は MM、LS、LL という 3 群に分けられることを明らかに

した。これまで、臨床的に MSI-H と診断された場合に、LS を除外するためには全 MSI-H 症例に対して MMR 遺伝子の追加精査を要したが、本研究により MM 群は LS 群とは異なることが明らかになったため、*MLH1* メチル化の有無を調べることで、LS を除外するための追加精査を必要としない症例が明らかになった。

CD8 の免疫染色で免疫関連遺伝子が欠損すると抗原提示が出来なくなる可能性が示唆された。今後免疫チェックポイント阻害薬非奏効例に免疫関連遺伝子変異があるか確認できれば、同遺伝子変異をマーカーとして免疫チェックポイント阻害薬の非奏効群を予測可能となるかもしれない。

全大腸癌の 2%未満と言われている治療標的となり得る融合キナーゼが、本研究では、全 MSI-H 大腸癌の 10% (11/111)、*KRAS/BRAF* ドライバ変異のない MM MSI-H 大腸癌では 58% (11/19) と高頻度に認められることを明らかにした。

本研究では東京大学および帝京大学で集められた MSI-H 大腸癌の予後について解析を行い、融合キナーゼを有する群では再発後の予後が不良であったが、症例数が少なく他の因子を調整していない。今後、他施設において同様の方法で融合キナーゼを同定することが出来れば、より信頼性の高いデータとなり、各キナーゼ阻害剤を用いた臨床研究へと発展する可能性がある。