

## 論文の内容の要旨

論文題目 淡明細胞型腎細胞癌における統合的分子解析

佐藤悠佑

淡明細胞型腎細胞癌 (ccRCC) は腎癌のおよそ 70-80% を占める。外科的に完全に摘除できた場合にのみ根治が期待でき、再発・転移例は予後不良である。3 番染色体短腕 (3p) のヘテロ接合性の消失 (LOH) に加え、*VHL* の変異あるいはプロモーターのメチル化により *VHL* が不活化し、低酸素誘導因子 (HIF) が蓄積することが知られている。また、近年のゲノム解析により、*PBRM1*、*BAP1*、*SETD2* など、3p に存在する他の遺伝子の変異が高頻度に生じていることが明らかとなった。しかしながら、様々なゲノム異常についての包括的な解析はなされておらず、ccRCC の分子病態はまだ十分に解明されたとはいえない。本研究では、ccRCC の分子病態の全体像を明らかにするために、106 例を対象に、全エクソン・全ゲノムシーケンシングによる遺伝子変異の検出をはじめ、ゲノムコピー数、遺伝子発現、DNA メチル化も含め、あらゆる観点からのゲノム異常を網羅的に検出し、統合的に解析した。

全ゲノムシーケンシング (14 例に施行) により、1 例あたり平均 1.7/megabase の変

異を検出した。また、遺伝子のコーディング領域については、全エクソンシーケンシング（106例に施行）により、1例あたり平均48.8個の変異を検出した。バックグラウンドの変異頻度と比較して、28個の遺伝子が有意に変異を生じており、*VHL*、*PBRM1*、*BAP1*、*SETD2*は特に高頻度に変異していた。これらの4遺伝子はいずれも3pに位置しており、この領域はコピー数解析においてもLOHが集積していた。*BAP1*および*SETD2*は、一部の症例においては変異アリル頻度が低く、サブクローナルな変異であることが示唆された。また、*BAP1*変異例は有意に全生存率が低く、*SETD2*変異例は高頻度に遠隔転移を生じていた。

また、*VHL*に異常のない症例の一部に、*TCEB1*の変異を認めた。*TCEB1*は8qに存在し、Elongin Cタンパクをコードしている。Elongin Cは、*VHL*およびElongin BとともにVHL complexを形成し、HIFのコピキチン化を促している。*TCEB1*変異例は常に8q LOHを伴っており、*VHL*の変異およびメチル化とは完全に排他的に生じていた。両者を合わせると、ccRCCの95%の症例がVHL complexの異常をきたしていた。*TCEB1*の変異はTyr79（7例）およびAla100（1例）の2か所のアミノ酸に対応する塩基のSNVのみが見られ、前者アミノ酸にhot spotを形成していた。これらのアミノ酸は、*VHL*との結合部位付近に位置しており、変異によって*VHL*との相互作用が失われるためにVHL complexの機能が喪失するものと考えられた。そこで、細胞株に野生型ならびに変異型のElongin Cを発現させ、免疫沈降を行ったところ、野生型Elongin Cは*VHL*との複合体形成が確認さ

れたものの、変異型 Elongin C は VHL との結合が阻害されていた。また、変異型 Elongin C を発現させるのみでは HIF の蓄積は見られなかったが、内因性に発現している Elongin C をノックダウンしたうえで、変異型 Elongin C を発現させたところ、HIF の蓄積が確認された。これらの結果から、*TCEB1* の変異と対側アリの欠失により、VHL complex が形成されず、HIF が蓄積して ccRCC が発生すると考えられた。

また、26%の症例において、PI3K-AKT-mTOR シグナリングに関わる遺伝子の変異を認めた。mTOR 阻害薬は既に ccRCC に対して使用されており、この結果は ccRCC の治療における mTOR 阻害薬の役割について、新たな視点を与えるものと考えられる。その他、p53 シグナリング/cell cycle checkpoint や SWI/SNF complex などのパスウェイに、高頻度にゲノム異常を生じていた。

DNA メチル化解析では、メチル化のパターンに基づいて症例をクラスタリングしたところ、高メチル化群、中メチル化群、低メチル化群の3群に分類された。高メチル化群では、ホメオボックス遺伝子群などポリコム複合体 (PRC2) の標的遺伝子が高度にメチル化されており、EZH2 が高発現していたことと合わせ、この群では PRC2 の機能が亢進していると考えられた。また、高メチル化群は、全エクソンシーケンスにおける変異数が有意に多く、コピー数の多倍体化や 14q LOH、9p LOH、BAP1 変異例の頻度が高かった。また、予後不良であり、PRC2 による遺伝子サイレンシングの制御の破綻が、悪性度の高い癌の発生に関与していることが示唆された。

本研究では多数の症例を対象とし、遺伝子変異の同定だけでなく、ゲノムコピー数、遺伝子発現、DNAメチル化も含めた網羅的かつ多方面からのアプローチにより、ccRCCで生じているゲノム異常のプロファイルを詳細に明らかにした。ゲノム異常プロファイルが、遠隔転移の頻度や予後などの臨床像と密接に関わっていることも明らかとなった。ccRCCにおいて、分子病態に基づいた症例の分類が、予後の予測や治療方針の検討に有用となりうることが示唆された。