



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ターゲットシーケンス法を用いた膵がんの薬物応答性に関与する遺伝子変異プロファイルの作成と変異情報の予後予測バイオマーカーとしての有用性に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	林, 秀幸
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2164 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11682号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58906
Type	doctoral thesis
File Information	Hideyuki_Hayashi_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

ターゲットシーケンス法を用いた膵がんの薬物
応答性に関与する遺伝子変異プロファイルの作成
と変異情報の予後予測バイオマーカーとしての有
用性に関する研究

(Studies on gene mutation profile of pancreatic
cancer obtained using a single targeted deep
sequencing assay and its utility as a prognostic
biomarker)

2015 年 3 月

北 海 道 大 学

林 秀幸

背景と目的

全世界における膵がんの死亡数は男女計で第 8 位であり、その罹患数は年々上昇傾向にある。膵がんは予後不良な難治がんであり、外科的切除が根治を期待できる唯一の治療法だが、約 80%の患者が診断時に既に切除不能な状態で発見され、また切除例も術後早期に再発することが多く、切除例の 5 年生存率も 10-15%とされている。切除不能進行再発膵がんの予後はさらに悪く、近年の無作為化比較試験でもその生存期間中央値は 5-11 ヶ月と不良である。

近年、次世代シーケンサーの普及により、臨床ゲノムシーケンスを用いたゲノムバイオマーカーの解析が進められ、いくつかのがん腫で患者の治療選択に実際に応用され始めている。ゲノムシーケンスによる治療標的の探索の結果、ゲノムバイオマーカーに基づいた薬剤選択が可能となり、真の個別化治療の実現に向け、研究が進められている。一方、膵がんにおいてはゲノムバイオマーカーに基づいた個別化医療は未だ実現していない。

膵がんに対しては長らく gemcitabine (GEM) 単剤療法のみが唯一有効な治療法とされていたが、近年 FOLFIRINOX 療法 (oxaliplatin, irinotecan, fluorouracil, leucovorin の多剤併用療法) や GEM+nab-paclitaxel 併用療法など、殺細胞性抗がん薬の併用療法が開発され、新たな標準治療とされている。一方、近年のがん領域における新規薬剤の開発は分子標的治療薬が中心となっており、膵がんもその例外ではないが、膵がんに対する分子標的治療薬の開発は失敗を繰り返してきた。上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 阻害薬の erlotinib は GEM との併用で、GEM 単剤療法に対する生存期間における統計学的な優越性を示した唯一の薬剤であるが、その差はわずかであり、また同治療は *EGFR* 遺伝子の変異の有無で個別化されてはいない。膵がんに関しては分子生物学的特徴が未だ解明されておらず、適切な標的が見つからないことが有効な分子標的治療薬の開発に難渋している最大の理由である。膵がんに対する今後の新規治療開発において、遺伝学的アプローチからの POC (proof of concept) に基づいた創薬が重要であり、膵がんにおける遺伝子異常の検索は将来の個別化医療の実現に向けて極めて重要な課題である。

膵発がんにおいては *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* の 4 遺伝子が主要なドライバー遺伝子として知られており、これらの遺伝子異常に協調してその他様々な遺伝子異常が関与していると考えられている。今回我々は、日本人膵がん症例を対象に、上記主要 4 ドライバー遺伝子を含めた 50 のがん関連遺

伝子における体細胞変異を検出することにより、膵がんの遺伝子変異プロファイルを明らかにし、既存の分子標的治療薬に対する薬物応答性を有する可能性がある症例の割合を明らかにすること、また膵がんの予後予測バイオマーカーとしてのゲノムバイオマーカーを同定する目的で本研究を立案した。

対象と方法

2005 年 3 月から 2012 年 6 月の期間に国立がん研究センター中央病院で浸潤性膵管癌（腺癌または腺扁平上皮癌）に対し、根治切除術を試みた症例（UICC 7th: pre-operative clinical Stage I and II）の内、包括同意の下「国立がん研究センター バイオバンク」で凍結保存組織検体が入手可能であった 100 症例を対象とした。またシーケンスの陽性コントロールとしてヒト由来浸潤性膵管癌細胞株計 19 種を準備した。

ゲノムシーケンスとはゲノムの構造を塩基配列レベルで決定するための塩基配列解析のことをいう。従来シーケンスは自動解析機（シーケンサー）で行われ、用いる反応の原理はサンガーによって開発されたジデオキシ法であったが、近年、次世代シーケンサーが登場し、これらの機器の登場により大規模なゲノム情報をより安価に短時間で網羅的に解析することが可能となった。一般的に次世代シーケンサーによるシーケンスは全ゲノムシーケンス、全エクソンシーケンス、ターゲットシーケンスおよび全トランスクリプトームシーケンスに分類され、解析目的に応じてそれぞれ用途が使い分けられている。臨床ゲノムシーケンスにおいては Cancer panel を用いたターゲットシーケンスが最も安価かつ効率的であり、ゲノムバイオマーカー研究や実臨床への応用が期待されている。Cancer panel は多数のがん関連遺伝子をディープシーケンス（同一領域を複数回、時には数千回シーケンスすること）し、がんにおける体細胞変異検出をシーケンスで行うためのキットのことであり、ターゲットを主にホットスポット（高頻度で突然変異を起こす部位）に絞るため、少量のサンプルを用いて高精度に低頻度の変異の検出が可能とされている。本研究においては Cancer panel を用いたターゲットシーケンスを主な研究手法として採用した。

本研究では臨床検体の新鮮凍結標本および細胞株からゲノム DNA を抽出し、50 のがん関連遺伝子における 190 ヶ所の変異 hot spot を対象とした Cancer panel を用いて、次世代シーケンサーによるターゲットシーケンスを行った。続いてターゲットシーケンス法で同定された遺伝子変異の validation を行う目的で、腫瘍検体とそれに対応する非腫瘍検体を用いてサンガー法を用いたダイレクトシーケンスを行った。

以上より最終的に作成された遺伝子変異プロファイルを基に、統計計学的手法を用いて遺伝子変異と臨床病理学的因子との関連解析を行った。遺伝子変異と各臨床病理学的因子の関連は Chi-squared test あるいは Fisher's

exact test を用いて検定した。生存解析は Kaplan-Meier 法を用いて行い、Log-rank 検定で生存曲線を比較検定した。予後因子解析は Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析および多変量解析で行った。いずれも $P < 0.05$ を統計学的に有意と考えた。全ての統計解析は IBM® SPSS® Statistics version 21.0 software (IBM Corp, Somers, NY, USA)を用いて行った。

結果

本研究の対象である浸潤性膵管癌術後 100 症例は、いずれの症例も術前診断では cStage IA-IIIB で根治切除が試みられたが、そのうち 10 症例が術後の病理診断で pStage IV と診断された。病理学的診断による浸潤性膵管癌 100 症例の内訳は腺癌 98 例、腺扁平上皮癌 2 例であった。

本研究におけるシークエンスの coverage depth は mean 4,685x (607-12,359x) であり、臨床検体の 97% (97/100) で何らかの遺伝子変異を認め、1 検体当たり平均 1.6 つの変異遺伝子を認めた。なお *KRAS* 変異は全体の 96% (96/100) で同定され、*KRAS* 変異アレル頻度から推定した腫瘍細胞含有率は平均 31% (2-93%) の結果であった。

臨床検体の遺伝子変異プロファイルとしては主要な遺伝子変異として *KRAS* (96%, 96/100), *CDKN2A* (42%, 42/100), *TP53* (13%, 13/100), *SMAD4* (7%, 7/100) の変異が認められた。一方、既存の分子標的治療薬に薬物応答性を持つ可能性のある druggable な変異としては *RET*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KIT* の変異がそれぞれ 1% (1/100) ずつ認められたのみであり、druggable な遺伝子変異を持つと考えられた症例は全体のわずか 4% (4/100) に過ぎなかった。最多の変異遺伝子である *KRAS* 変異の変異様式は G12D (48%, 46/96), G12V (32%, 31/96), G12R (10%, 10/96) が多く認められ、一方、*KRAS* 変異陰性症例は全体の 4% (4/100) に認められた。主要 4 ドライバー遺伝子の変異のパターンとしては *KRAS* の 1 遺伝子変異が 47% (47/100) と最も多く、*KRAS/TP53*, *KRAS/SMAD4* の 2 遺伝子変異がそれぞれ 29% (29/100), 7% (7/100) と続いて多く認められた。また *KRAS/TP53/SMAD4*, *KRAS/CDKN2A/TP53* の 3 遺伝子変異がそれぞれ 6% (6/100), 5% (5/100) に認められたが、4 遺伝子全てに変異を認めた症例はいなかった。

全症例を対象に主要 4 ドライバー遺伝子の変異と臨床病理学的因子 (pStage、腫瘍の占拠部位、病理学的分化度、再発様式、再発臓器、再発臓器数) との関連解析を行った。まず各遺伝子変異の有無と臨床病理学的因子との関連解析を行ったが、いずれも統計学的に有意な関連は認められなかった。一方、主要 4 ドライバー遺伝子の変異遺伝子数と臨床病理学的因子との関連解析を行った結果、変異遺伝子数が多い症例で病理学的分化度が低い傾向が認められた。

次に術後化学療法を施行した根治術後症例 71 症例を対象に生存解析を行った。まず主要 4 ドライバー遺伝子の各々の遺伝子変異別で生存解析を行ったが、各遺伝子の変異の有無に関しては全生存期間に有意な差は認められな

かった。一方、主要 4 ドライバー遺伝子の変異遺伝子数別に生存解析を行ったところ、変異遺伝子異数が多いほど予後不良な傾向を認め、変異遺伝子数が 0-2 の症例において、変異遺伝子数 3 の症例と比較し、全生存期間において有意に予後良好な結果が認められた(全生存期間中央値 40.0 ヲ月 vs. 12.6 ヲ月, Hazard ratio for death 0.29, 95% confidence interval 0.13-0.66, $P=0.0020$)。また年齢、性別、病理学的分化度、腫瘍の占拠部位、局所癌遺残度 (R 因子)、隣局所進展度 (T 因子)、リンパ節転移 (N 因子)、CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9)、主要 4 ドライバー遺伝子の変異遺伝子数の 9 項目で Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量および多変量解析を行った結果、主要 4 ドライバー遺伝子の変異遺伝子数 (0-2) のみが全生存期間の独立した予後良好因子となることが示唆された (Hazard ratio for death 0.20, 95% confidence interval 0.067-0.60, $P=0.0040$)。

考察

本研究における日本人膵がん患者 100 症例の主要 4 ドライバー遺伝子を含めた遺伝子変異の頻度は欧米からの既報と同様の結果であり、本研究における解析結果の正確性およびこれらの遺伝子変異が人種差なく膵発がん大きく寄与することが確認された。一方、膵がんにおいては既存の分子標的治療薬に対する薬物応答性につながる druggable な遺伝子変異を有する症例の割合は少ないことが確認された。

また膵がんにおいては *KRAS* 変異がその遺伝子変異の大半を占めることから、膵がんの治療開発においては *KRAS* を標的とした治療戦略が重要と考えられ、*KRAS* 変異および MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) に代表される *KRAS* の下流経路を標的とした治療開発が重要であることが再確認された。*KRAS* 変異タンパクは GTP/GDP 親和性が強く、また既知の薬剤結合部位が存在しないことから、*KRAS* 変異タンパクを直接阻害する治療法は今まで成功してこなかった。一方、近年 *KRAS* 変異パターンの中でも *KRAS* (G12C) 変異タンパクに不可逆的に結合し、その酵素活性を抑える小分子化合物が発見された。本研究コホートにおいては、*KRAS* (G12C) は全 *KRAS* 変異例の 4% (4/96%) を占めていた。本研究で採用したターゲットシーケンス法は、将来これらの阻害薬に対し薬物応答性を有する可能性がある症例を選別するのに有用な手段となるかもしれない。

細胞のがん化に寄与すると考えられる遺伝子異常はバイオマーカーとして有望であり、特に最近では Yachida らが米国の膵がん剖検症例 79 症例における主要 4 ドライバー遺伝子の状態と予後との関連について報告した。この研究はサンガーシーケンスによる *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* 遺伝子の変異の検出と免疫染色法による *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* タンパクのゲノムおよびエピゲノム異常からの不活化の検出を組み合わせで行われ、変異（あるいは不活化）遺伝子数 0-2 の症例で変異（あるいは不活化）遺伝子数 3-4 の症例よりも全生存期間が有意に延長する傾向が認められた。この結果は本研究の主要 4 ドライバー遺伝子の変異遺伝子数が患者の予後と相関するという知見と一致しているが、本研究において検出された変異遺伝子数は日常診療で実現可能な tumor DNA に対するターゲットシーケンスにより評価されており、予後予測バイオマーカーとしてのドライバー遺伝子変異検出の有用性を再確認したものである。加えて本研究では次世代シーケンサーを用いてドライバー遺伝子異常を迅速に評価するという新たな手法を提示している。

しかし本研究にもいくつかの限界がある。一つは本研究は後ろ向き研究

であり、本研究から得られた結果を実臨床に応用するに当たっては前向き研究による検証がなされなければならないことである。もう一つは遺伝子異常の検出に 50 のがん関連遺伝子のホットスポットのみを標的とした Cancer panel を用いたことである。それ故、本研究ではホットスポット以外の変異、*CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* 遺伝子のホモ欠失、エピジェネティックな不活化に関しては調べられていない。実際、*SMAD4* 遺伝子の変異およびホモ欠失は膵がん患者において予後不良因子であることが報告されているが、本症例コホートにおいては *SMAD4* 遺伝子の変異の有無と予後との関連は認められていない。さらに膵がんで変異が認められることが最近になって判明したような他の遺伝子に関しては本研究では調べられていない。膵発がんに関与する、より包括的な遺伝子異常プロファイルの作成により、予後予測バイオマーカーとして更なる有用な遺伝子セットを作成することが今後の課題である。

結語

本研究における主要 4 ドライバー遺伝子 (*KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4*) の変異頻度は欧米の既報と同様の結果であり、これらの遺伝子変異が人種差なく膵発がんに関与することが確認された。一方、膵がんにおいては既存の分子標的治療薬に対する薬物応答性につながる druggable な遺伝子変異を有する症例の割合は少ないことが確認された。

また今回我々は次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスで検出した主要 4 ドライバー遺伝子の変異遺伝子数が、膵がん根治術後症例の有望な予後予測バイオマーカーとなる可能性について明らかにした。すなわち膵がん切除検体の臨床ゲノムシーケンスにより、膵がん術後療法に関する有用な情報を得ることが出来、例えばシーケンスで得られた遺伝子変異情報が、術後により強力な補助療法を必要とする症例を選別するための予後予測バイオマーカーにもなり得ることが考えられた。

本研究の結果から膵がん診療における multiple gene testing の有用性が示唆され、包括的な遺伝子異常プロファイルの作成がより有用なゲノムバイオマーカーの同定につながることを考えられた。真の個別化医療の実現に向け、次世代シーケンサーを用いた探索的なゲノム解析により、更なる治療標的の同定とその標的に応じた薬剤の開発、ならびに薬剤選択のみならず、薬剤の治療効果や有害事象を予測するためのゲノムバイオマーカーが次第に確立されつつある。膵がん診療におけるゲノムバイオマーカーに基づいた新たな治療開発の可能性が今後期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始に渡って適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さいました国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野 分野長 河野隆志先生、国立がん研究センター中央病院 肝胆膵内科 科長 奥坂拓志先生、同医長 上野秀樹先生に感謝の意を表します。

また国立がん研究センターでの貴重な研修および研究の機会を与えて下さった北海道大学大学院医学研究科 内科学講座 消化器内科学分野 教授 坂本直哉先生、北海道大学病院 腫瘍センター 診療教授 小松嘉人先生にも重ねて感謝の意を表します。

本研究の臨床検体は国立がん研究センター バイオバンクより提供して頂きました。この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

本研究の一部は文部科学省科研費（基盤 C）Grant Number 26461039 および、がん研究振興財団（一般課題 A）の助成を受けたものです。

最後にこれまで私を支えて頂き、様々な場面でご指導ご鞭撻を賜った国立がん研究センター中央病院 肝胆膵内科、国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野、北海道大学大学院医学研究科 内科学講座 消化器内科学分野の全構成員の皆様方に心より感謝の意を表します。