



Title	遺伝子プロファイリングによるRAS、BRAF変異型大腸癌の治療戦略の探索〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	西上, 耕平
Description	配架番号 : 2342
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12838号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67475
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Nishigami_abstract.pdf, 論文内容の要旨



(様式 9)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 西上 耕平

学 位 論 文 題 名

遺伝子プロファイリングによる *RAS*、*BRAF* 変異型大腸癌の治療戦略の探索

(Search of the treatment strategy for *RAS* and *BRAF* mutated colorectal cancer by gene profiling)

【背景と目的】

大腸癌は従来、欧米諸国において多い疾患であったが、日本においても食生活の欧米化に伴い 2000 年代にかけて急速な増加傾向を認めている。

大腸癌の治療法として、ここ数十年で化学療法が急速な進歩を示している。**FOLFOX**、**FOLFIRI** などの新規レジメンや抗 **VEGFR** 抗体薬、抗 **EGFR** 抗体薬などの分子標的薬の出現により、それまでと比較して飛躍的に高い治療効果が得られるようになり、切除不能症例に対しても 20 ヶ月を越える生存期間を得られるようになってきた。しかし、大腸癌は **heterogeneous** な疾患であり、一定の治療効果が得られない場合もある。このため近年、癌を分子生物学的特徴からグループ化し、そのグループごとに治療方針を決定する **precision medicine** が盛んに研究されている。さらに、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析結果から治療薬を探索する試みも臨床応用されつつある。

このため今回大腸癌の手術検体を **NGS** によるアンプリコンターゲットシーケンスを用いて遺伝子解析を行い、その結果から **precision medicine** による大腸癌の治療法の探索につながる遺伝子プロファイリングを行うことを目的とした。とくに、分子標的治療法が確立していない *RAS*、*BRAF* 変異癌の治療法に結びつくことを目的とした。

【対象と方法】

対象症例は、北斗病院にて切除治療された原発大腸癌検体を用いた。2007 年に手術された **FFPE** 検体 7 例、2013 年に手術された凍結検体 7 例から抽出した DNA を 48 遺伝子の **hot spot** をターゲットシーケンスする **Illumina Truseq Cancer Panel** による遺伝子解析に用いた。また、2006 年 1 月から 2008 年 7 月に手術された凍結検体を検体固定液の **PAXgene Tissue System** を用いて固定しパラフィン包埋した **PFPE** 検体 30 例から抽出した DNA を、160 遺伝子のエクソン領域をターゲットシーケンスする **GeneRead DNAseq Targeted Panel V2 (Human Comprehensive Cancer Panel)** による遺伝子解析に用いた。**Miseq** によりシーケンスをおこない、その結果は **BioReT System** と **GeneRead DNAseq Variant Calling Service** の 2 つの解析ソフトを用いて遺伝子変異を検出した。

【結果】

1. **Illumina Truseq Cancer Panel** を用いたアンプリコンターゲットシーケンスの結果

1) 凍結検体と **FFPE** 検体の DNA のクオリティーの比較検討

凍結検体と **FFPE** 検体においてコールされる変異数に大きな乖離を認め、**FFPE** 検体から非常に多くの変異数がコールされた。**Variant frequency**、**Read depth**、**Quality** 値の **cut off** を設定することにより、凍結検体と **FFPE** 検体のコールされる変異数を同等にすることはできたが、**FFPE** 検体の DNA のクオリティーが凍結検体に比べておとると考えられた。

2) **Druggable mutation** の検索

Druggable mutation は 18 例中 5 例 (27.8%) に認めた。ドライバーとなるような遺伝子

変異を認めない症例が 5 例、変異自体検出されない症例が 1 例あり、検出感度は不良であった。

2. GeneRead DNAseq Targeted Panel V2 (Human Comprehensive Cancer Panel)を用いたアンプリコンターゲットシーケンスの結果

1) Druggable mutation の検索

Druggable mutation は 30 例中 18 例 (60%)で認めた。その遺伝子の機能から 4 つのタイプ①PI3K/AKT/mTOR 関連遺伝子、②受容体型チロシンキナーゼ、③遺伝子修復に関与する遺伝子、④クロマチンリモデリングに関与する遺伝子に分けることができた。

また RAS/RAF/MAPK 経路関連遺伝子(*RAS*、*BRAF*) 変異と PI3K/AKT/mTOR 関連遺伝子変異の重複遺伝子変異症例が、ひとつの genotype と考えられた。

2) RAS/RAF/MAPK 経路関連遺伝子変異と PI3K/AKT/mTOR 関連遺伝子変異の重複遺伝子症例 (MAPK mt + mTOR mt)の予後解析

MAPK mt + mTOR mt 症例の overall survival が、その他の症例と比較して有意差をもって不良であった。また、RAS/RAF/MAPK 経路関連遺伝子変異を認めるが、PI3K/AKT/mTOR 関連遺伝子に変異を認めない症例 (MAPK mt + mTOR wt)は、逆に予後が良好な傾向を認めた。

3) MAPK mt + mTOR mt の臨床病理学的解析

MAPK mt + mTOR mt は右側結腸に多い傾向を示した。逆に、MAPK mt + mTOR wt はすべて左側結腸であった。

【考察】

FFPE 検体からの DNA のクオリティーは不良であり、ホルマリンによる DNA 損傷の影響が考えられた。FFPE 検体からの DNA を遺伝子解析に用いる際には、ホルマリン固定するまでの時間、ホルマリン固定時間、ホルマリン濃度等に十分留意して、DNA の損傷を極力少なくする必要があると考えられた。一方、検体固定液に PAXgene Tissue System を使用し、ターゲットとする遺伝数が多く、シーケンス範囲のひろい GeneRead DNAseq Targeted Panel V2 (Human Comprehensive Cancer Panel)を使用することにより、良好なシーケンス結果が得られ、druggable mutation も 60%の検出頻度で認められた。今後は copy number variation や融合遺伝子の解析などの問題を解決する必要があると考えられた。

また、MAPK mt + mTOR mt 症例は予後が不良で右側に多い傾向が認められ、ひとつの genotype と考えられた。MEK 阻害剤と mTOR 阻害剤の併用療法による有効性の報告も認められることから、今後の大腸癌に対する precision medicine に向けての一つの biomarker になりえると考えられる。また、その重複遺伝子変異の検出のためにも網羅的な遺伝子変異解析を行うことが今後 precision medicine を行う上で必須になることと考えられる。いままでは、単一の遺伝子変異に対して薬剤の選択をおこなっていたが、今後は網羅的な遺伝子解析による複合的な遺伝子変異の組み合わせに対する薬剤選択が必要になってくるのではないかと考えられた。

【結論】

今後のクリニカルシーケンスを見据えて、大腸癌手術検体で NGS を用いたアンプリコンターゲットシーケンスによる遺伝子解析を行った。検体固定液、パネルを変更することにより、60%の druggable mutation の検出頻度を得られた。

また、遺伝子プロファイリングから RAS/RAF/MAPK と PI3K/AKT/mTOR の関連遺伝子の重複変異例では、予後が不良で右側結腸に多い傾向を認めひとつの genotype と考えられた。このことが、今後の precision medicine を行う上での一つの biomarker になりえると考えられた。