



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	西上, 耕平
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：2342 他
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/2115/67477
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Nishigami_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

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 treatment strategy for *RAS* and *BRAF*
mutated colorectal cancer by gene profiling)

2017 年 9 月

北海道大学

西上 耕平

学 位 論 文 (要約)

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 treatment strategy for *RAS* and *BRAF*
mutated colorectal cancer by gene profiling)

2017 年 9 月

北海道大学

西上 耕平

【緒言】

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。日本では現在、大腸癌の死亡数は、女性では第 1 位、男性では肺癌、胃癌に次いで第 3 位となっている。罹患率においても女性で乳癌に次いで第 2 位、男性では胃癌、肺癌に次いで第 3 位となっている。

大腸癌の治療法として、ここ十数年で化学療法が急速な進歩を示している。FOLFOX、FOLFIRI などの抗がん剤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、そのグループごとで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につながる遺伝子プロファイリングならびにバイオマーカーの探索を行うことを目的とした。

【実験方法】

対象症例は、2006 年から 2013 年に北斗病院において手術で切除された、原発大腸癌 47 例を使用した。47 例のうち、凍結検体 7 例と FFPE 検体 11 例を 48 遺伝子の hot spot をターゲットシーケンスする Illumina Truseq Cancer Panel に用いた。また、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)に用いた。(凍結検体と PFPE 検体は 1 例重複している。) これらより抽出した DNA を用いてライブラリーを作成し、Miseq でシーケンスをおこなった。そのシーケンス結果は 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の検出を行った。

【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、解析ソフトにかける前の Miseq よりコールされ

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。これは、ホルマリンによる DNA 損傷が原因と考えられた。Read depth 100 以上で、Quality Pass したものを抽出したうえで Variant frequency の cut off 値を 0.10 以上に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。しかし、FFPE 検体の DNA のクオリティーが凍結検体の DNA に比べて劣り、データの信頼性が低いと考えられた。

2) Druggable mutation の検索

Druggable mutation は 18 例中 5 例 (27.8%) と検出頻度は不良であった。また、ドライバーとなるような遺伝子変異を認めない症例を 6 例、変異自体検出されない症例を 1 例認めた。このため、よりターゲットとする遺伝子が多く、CNV の解析も可能な GeneRead DNaseq Targeted Panel V2 (Human Comprehensive Cancer Panel) を使用して、再度遺伝子変異解析を行うこととした。

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%) と良好な検出頻度であった。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 (MAPK mt + mTOR mt) が、ひとつの genotype と考えられた。

一方、CNV の解析は精度不良であり、今回の解析法では信頼性が低いと考えられ今後の課題となった。

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、今回の遺伝子解析の結果、MAPK mt + mTOR mt 症例は予後が不良で右側結腸に多い傾向が認められ、ひとつの genotype と考えられた。このような症例に 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、このような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 を行う上で重要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。

【総括および結論】

今回の研究において、①検体固定液として PAX gene Tissue System を用い、Amplicon Targeted Sequence Panel として GeneRead DNAseq Targeted Panels V2 (Human Comprehensive Cancer Panel)を使用することにより、大腸癌に対し良好な druggable mutation の検出率を得ることができ、②アンプリコンターゲットシーケンスによる遺伝子変異解析のデータを用いた大腸癌の遺伝子プロファイリングにおいて、KRAS もしくは BRAF 変異と PIK3CA/AKT/mTOR 関連遺伝子の重複変異の genotype 群が、予後が不良で右側結腸に多い傾向が認められた。

以上のことから、今後はさらに NGS による遺伝子変異解析を含めた網羅的な癌遺伝子解析による precision medicine の開発が進むことが期待される。