



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12838
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87581
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Nishigami.pdf



学 位 論 文

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

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

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	6 頁
実験方法	8 頁
実験結果	19 頁
考察	37 頁
総括および結論	46 頁
謝辞	47 頁
引用文献	48 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1. 著者名 : Kohei Nishigami, Hiroshi Nishihara, Toshiaki Akahane,
Hiroyuki Kawami, Hideyuki Hayashi, Lei Wang,
Mishie Tanino, Masumi Tsuda, Hajime Kamada,
Shinya Tanaka

タイトル : Clinical benefit of clinico-genotypical analysis by
amplicon targeted sequence for precision oncology in
colorectal cancer.

ジャーナル名 : Medical Oncology

【緒言】

大腸癌の疫学

大腸癌は従来欧米諸国において多い疾患であったが、その他の地域においても増加傾向を示している。日本においては1950年から2006年までに死亡者数が11倍に増加しており、日本人の食生活の欧米化が一因と考えられている¹。日本において、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¹。大腸癌の罹患率は女性では乳癌についで第2位、男性では胃癌、肺癌に次いで第3位となっている¹。男女とも罹患数は死亡数の約2倍であり¹、これは大腸癌の生存率が比較的高いことに関連しており治療に対する効果が期待できる疾患であると考えられる。

大腸癌の治療方法

大腸癌の治療としては、主に①外科的切除（内視鏡的切除）②化学療法（抗癌剤、分子標的治療薬）③放射線治療（欧米では直腸癌に対する術前治療、緩和的治療）が行われている。現在でも治癒を目指すには切除治療が不可欠ではあるが、ここ十数年で化学療法が急速に進歩したことにより徐々にその有用性、重要性が増してきている。十数年前までは、大腸癌の標準化学療法は5-Fluorouracil/leucovorinが主流であったが、その後、オキサリプラチン、イリノテカンなどの新規抗癌剤を使用したFOLFOX、FOLFIRIなどのレジメンの開発、さらには抗VEGFR抗体薬、抗EGFR抗体薬などの分子標的治療薬の出現により、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った。化学療法の適応症例も切除不能症例のみでなく、術後化学療法ならびに術前化学療法と多岐にわたるようになり、大腸癌の生存率向上に貢献している。以前は、切除不能症例の生存期間は1年にも満たない状況であったが、これら新薬の登場により20ヶ月を超える生存期間を得られるようになってきた^{2,3}。このように化学療法が進歩してきたことにより、最近では切除不能症例に化学療法が著効し切除可能になった症例に対し、手術加療で完全切除を目指すコンバージョンセラピーも積極的に行われるようになってきている。切除不能な肝転移症例に対するC-mab + FOLFOX6とC-mab + FOLFIRI療法では、奏効率68%、57%、R0切除率38%、30%と良好なコンバージョン率を示した報告もある⁴。ただ、大腸癌はheterogeneousな疾患であり、化学療法が一定の治療効果を得

られない場合もあり、大腸癌のさらなる予後改善のためには今後さらに奏効率を向上させる必要がある。実際、大腸癌は、*APC*, *RAS*, *DCC*, *p53*などの遺伝子変異が段階的に起こる多段階発癌の関与、DNAのメチル化、ミスマッチ修復遺伝子が関与する遺伝性大腸癌などさまざまな遺伝子的要因の関与が言われており、その違いによって有効な治療が異なってくることが予想される。

大腸癌の Precision medicine

このように大腸癌にはさまざまな遺伝子的、分子生物学的要因が関与しているため、奏効率の向上をめざすにあたって、症例ごとの癌の遺伝学的特徴に応じて治療方針を決定する *personalized medicine* や、癌の網羅的遺伝子解析結果に基づき癌を分子生物学的に *subgroup* 化し、その *subgroup* ごとに治療方針を決定する *precision medicine* が近年盛んに研究されている。大腸癌においても網羅的な遺伝子解析から分子生物学的 *subgroup* 化をおこなった研究⁵⁻¹¹が報告されているが (Table 1)、現時点では一般臨床において実用化には至っていない。最近では、大腸癌の *MSI-high* の症例において抗 *PD1* 抗体薬が有効であるとの報告もあり、今後の臨床応用が期待されている¹²。さらに、*NGS* を用いた遺伝子変異解析結果からの治療薬の探索も行われるようになり、2016年4月より北海道大学病院がん遺伝子診断部でも臨床応用がはじまっている。

Table 1. CMS (Consensus Molecular Subtypes) of colorectal cancer⁸

CMS1 MSI immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, Hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration , TGF- β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse- free and overall survival

現状の大腸癌に対する個別化医療としては、副作用の面でイリノテカンの使用にあたって *UGT1A1* 遺伝子多型を調べることでイリノテカンの副作用の出現、重篤度を予測することが行われている。これは、イリノテカンの活性代謝体 SN-38 のグルクロン酸抱合にかかわる *UGT1A1* 活性に影響する遺伝子の多型性が知られるようになり、活性が低い多型では副作用が強く出現するためである¹³⁻¹⁶。一方治療に対しては、*RAS* 変異型大腸癌において抗 *EGFR* 抗体薬の上乗せ効果が期待できないことから^{3,17}、抗 *EGFR* 抗体薬は *RAS* 野生型大腸癌にのみ選択可能となっている。これは、*RAS* に変異が起こることにより、下流へのシグナルが亢進しており、上流の *EGFR* でシグナルをブロックしても下流へのシグナルを抑制することはできないためと考えられている。さらに、*RAS* の下流因子である *BRAF* の変異例では一定の見解は得られていないが、少なくとも抗 *EGFR* 抗体薬の効果が低いと考えられる¹⁸。

RAS、*BRAF* に関して

RAS は、動物の肉腫の原因として発見された癌遺伝子であり、人間の癌においても *RAS* の突然変異がみられることが明らかにされた。実際、大腸癌のみならず、肺癌、膵癌などさまざまな癌腫において変異が確認されており、癌の進展に大きな役割があると考えられている。*RAS* に変異を生じると、*RAS* が活性化しその下流へのシグナル伝達が活性化し細胞増殖、アポトーシスの抑制が亢進し、癌化に関わるとされている (Fig 1)。大腸癌においては、約 40% に *RAS* の変異を認め^{5,19}、予後に関しては一定の見解を得られていないが^{20,21}、前述したように抗 *EGFR* 抗体薬が無効とされている^{3,17}。*RAS* は多くの癌に関与しているため *RAS* の阻害剤の開発が期待されたが、研究が進むにつれ、*RAS* は GTP 結合タンパクであるが、GTP の結合性があまりに強く、この結合を阻害することは困難と考えられた²²。また、タンパク構造解析により *RAS* は表面がスムーズで凹凸が少なく、タンパク同士の結合阻害も困難であり、現在のところ有用な *RAS* 阻害剤は開発されていない²²。一方、*BRAF* は、*RAS* の下流に位置するシグナル伝達分子であり、大腸癌においては 5-8% 程度で変異を認め^{5,19}、変異例は予後不良とされている。*BRAF* も変異をおこすと *RAS* と同様に下流への活性が亢進して癌の増殖進展に関わる。メラノーマでは、*BRAF* 阻害剤が有効であり治療に使用されているが、大腸癌では単剤で十分な有効性は認められなかった²³。

このように、*RAS*、*BRAF* 変異大腸癌は、現状の大腸癌に対する分子標的治療に対し多大な影響を及ぼしているが、それら分子を直接阻害

する薬がないもしくは直接阻害しても十分な効果を認めないため、MEK阻害剤などのRAS、BRAFのさらに下流を阻害する薬剤を用いた治療法の研究が行われている段階であり、RAS、BRAF変異大腸癌に対する分子標的治療は確立されていないのが現状である。

このため今回大腸癌手術検体を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おこない、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ならびにバイオマーカーの探索を目的とした。

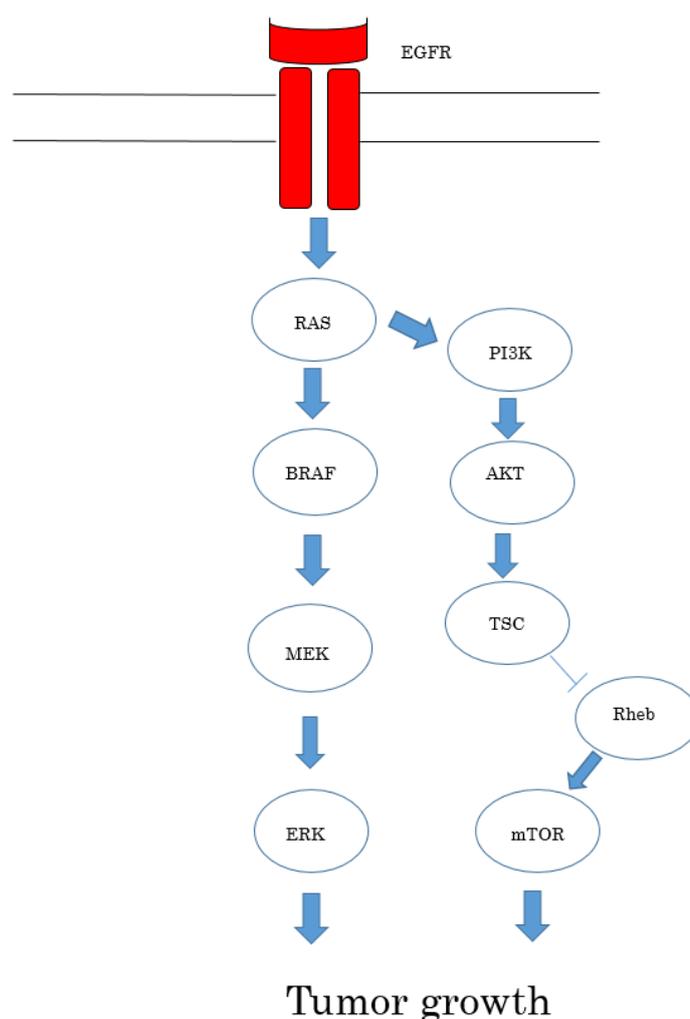


Fig 1.RAS/RAF/MAPK 経路と PI3K/AKT/mTOR 経路 ; RAS や BRAF は、変異することにより活性化し下流へのシグナルが亢進し、腫瘍増殖に関与する。PI3K/AKT/mTOR 経路も癌化に関与し、RAS/RAF/MAPK 経路と相互作用している。

略語表

本文中、図中で使用した略語は以下の通りである。

AKT1; RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
APC; Adenomatous polyposis
ARID1A; AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ATM; Ataxia telangiectasia mutated
BRAF; v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1; Breast cancer susceptibility gene 1
CIMP; CpG island methylator phenotype
C-mab; Cetuximab
CNV; Copy number variation
DCC; Deleted in colorectal cancer
DDR2; Discoidin domain-containing receptor 2
EGFR; Epidermal growth factor receptor
ERBB2; Human epidermal growth factor receptor 2
FBXW7; F-box/WD repeat-containing protein 7
FFPE; Formalin fixed paraffin embedded
GTP; Guanosine triphosphate
H&E; Hematoxylin & eosin
HIF-1; Hypoxia inducible factor-1
LOH; Loss of heterozygosity
MAPK; Mitogen-activated protein kinase
MEK; MAPK/ERK kinase
MLH1; MutL homolog 1
MSH2; MutS protein homolog 2
MSI; Microsatellite instability
MTOR; mammalian target of rapamycin
muc; mucinous adenocarcinoma
NGS; Next generation sequencer
OS; Overall survival
PARP; Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PCR; Polymerase chain reaction

PD-L1; Programmed death-ligand 1
PFPE; PAXgene-fixed paraffin embedded
PIK3CA; Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase, catalytic
subunit alpha
por; Poorly differentiated adenocarcinoma
PTEN; Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
RAS; Kirsten rat sarcoma
RFS; Relapse free survival
SCNV; Somatic copy number variant
SNV; Single nucleotide variant
tub; Tubular adenocarcinoma
UGT1A1; Uridine diphosphate glucuronosyltransferase1A1)
VEGFR; Vascular endothelial growth factor receptor
VHL; Von Hippel-Lindau
*; Stop codon

【実験方法】

対象症例

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。(本実験は社会医療法人北斗の医の倫理審査委員会での審議において承認された。北斗医倫審 第84号。)

47例のうち、凍結検体7例とFFPE検体11例をIllumina Truseq Cancer Panelで使用した。また、凍結検体を検体固定液PAXgene Tissue Systemにて固定しパラフィン包埋としたPFPE(PAXgene Tissue System Fixed Paraffin Embedded)検体30例をGeneRead DNAseq Targeted Panels V2(Human Comprehensive Cancer Panel)で使用した。(凍結検体Fro1とPFPE検体110Tは重複している。)Table 2にそれぞれの症例の年齢、性別、部位、病期を示した。

PFPE検体は4 μm に薄切して切片を作成後、hematoxylin & eosin(H&E)染色をおこない、標本をそれぞれ作製した。作成した標本から、腫瘍の存在、組織型、腫瘍含有率を確認した。(Table 3)

Table 2. 対象症例の年齢、性別、腫瘍部位、病期

症例番号	年齢	性別	部位	病期
FF1	72	M	Ra	II
FF2	69	M	S	II
FF3	68	F	S	II
FF4	52	F	S	IV
FF5	86	F	S	II
FF6	73	M	T	IV
FF7	71	F	Rs	IIIa
FF8	78	M	Rs	IIIb
FF9	85	M	Rs	IIIa
FF10	80	M	A	IIIb
FF11	77	M	Rs	IIIa
Fro1	63	F	A	IIIa
Fro2	69	M	S	IV
Fro3	64	F	Ra	I

Fro4	77	F	Ra	IIIb
Fro5	69	M	Rs	IIIa
Fro6	58	M	Rb	IV
Fro7	73	F	A	IIIb
58T	56	M	A	IV
70T	82	F	A	IIIa
71T	86	M	A	IIIa
72T	80	F	A	IIIa
74T	72	M	Ra	IV
76T	70	F	S	IV
78T	66	M	A	II
79T	68	M	Rb	IIIa
81T	55	M	Rb	IIIa
82T	79	F	Rs	II
83T	75	M	Ra	IIIa
84T	73	F	Ra	II
85T	84	F	Ra	II
86T	68	M	Rb	IIIa
87T	61	F	S	IV
106T	60	M	Rb	I
108T	72	M	Rs	I
110T	63	F	A	IIIa
113T	82	F	S	I
120T	60	F	S	II
121T	62	M	Rb	I
129T	55	M	Ra	IV
130T	89	F	A	II
131T	63	M	T	II
132T	61	F	Rb	I
133T	76	M	S	IIIa
134T	72	F	S	II
135T	69	M	Rs	II
136T	44	M	D	II
137T	72	M	Ra	II

Table 3. PFPE 検体の大腸癌組織型と腫瘍含有率

No.	組織型	腫瘍含有率
58	tub1	50%
70	tub2	60%
71	tub2	90%
72	tub2	80%
74	tub2	40%
76	tub2	60%
78	tub2	60%
79	muc	50%
81	tub2	80%
82	tub1	50%
83	tub1	60%
84	tub2	40%
85	tub2	90%
86	tub2	60%
87	tub2	40%
108	tub2	80%
110	tub2	80%
113	tub2	50%
120	tub1	90%
121	tub1	80%
129	tub1	80%
130	muc	80%
131	tub2	40%
132	tub2	80%
133	por1	50%
134	tub2	20%
135	tub2	80%
136	tub2	70%
137	tub1	30%

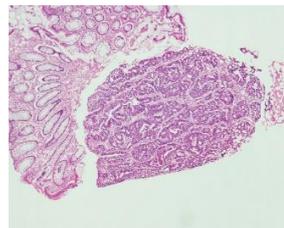
大腸癌凍結検体 → PAX gene Tissue System で固定。



PFPE 作製



HE 組織標本を作製して、癌の含有率（存在の有無）、組織型を確認。



DNA の抽出



標的遺伝子 PCR 増幅



ライブラリーの作成



NGS ラン



NGS データの解析

GeneRead DNaseq Variant Calling Service

BioReT System

Fig 2. PAX gene Tissue System を用いた NGS によるアンプリコンターゲットシーケンス遺伝子解析のワークフロー：PAX gene Tissue System を用いた場合、HE 標本を作製し、腫瘍の含有率、組織型を確認した。

1. DNA 抽出

1) 凍結検体

凍結検体片約 10mg を破砕し、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。Qubit dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies) で濃度測定を行った。

2) FFPE 検体

10 μ m の厚さで 5 枚薄切し、QIAamp DNA FFPE Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。Qubit dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies) で濃度を測定し、Infinum HD FFPE QC Assay (Illumina) にて DNA のクオリティーチェックを行った。

3) PFPE 検体

凍結組織より作成した PFPE 組織を 10 μ m の厚さで 5 枚薄切し、PAXgene Tissue DNA Kit (PreAnalytiX) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。また、CNV 解析の基準用として、3 検体の正常部を PFPE とし腫瘍部同様に DNA を抽出した (Fig 2)。

ゲノム DNA の濃度は、Qubit dsDNA BR assay kit と Qubit fluorometer 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ならびに GeneRead DNA QuantiMIZE Assay Kit (Qiagen) にて測定した。

2. アンプリコンターゲットシーケンス

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

癌に関わる 48 遺伝子 (Table 4) の hot spot をターゲットシーケンスし、遺伝子変異を検出解析する Illumina Truseq Cancer Panel を使用した。

Table 4. Illumina Truseq Cancer Panel でターゲットとする 48 遺伝子

<i>ALB1</i>	<i>AKT1</i>	<i>ALK</i>	<i>APC</i>	<i>ATM</i>	<i>BRAF</i>
<i>CDH1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CSF1R</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB2</i>
<i>ERBB4</i>	<i>FBXW7</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>FLT3</i>

<i>GNA11</i>	<i>GNAQ</i>	<i>GNAS</i>	<i>HNF1A</i>	<i>HRAS</i>	<i>IDH1</i>
<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>KDR</i>	<i>KIT</i>	<i>KRAS</i>	<i>MET</i>
<i>MLH1</i>	<i>MPL</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>NRAS</i>	<i>PDGFRA</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	<i>PTPN11</i>	<i>RB1</i>	<i>RET</i>	<i>SMAD4</i>
<i>SMARCB1</i>	<i>SMO</i>	<i>SRC</i>	<i>STK11</i>	<i>TP53</i>	<i>VHL</i>

① Hybridization of Oligo Pool

96 ウェル PCR プレートに 5 μ l のコントロール DNA を 1 ウェルに、5 μ l のゲノム DNA を残りのウェルに加える。5 μ l のコントロールオリゴプールをコントロール DNA が入ったウェルに加える。5 μ l の AFP1 をゲノム DNA を入れたウェルに加える。40 μ l の OHS1 をそれぞれウェルに加えてピペティングで混和する。1,000 \times g、20 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心後、95 $^{\circ}$ C で 1 分間インキュベートする。その後、40 $^{\circ}$ C で 80 分間インキュベートする。

② Removal of Unbound Oligos

FPU プレート (Filter plate assembly unit) に 45 μ l の SW1 を各ウェルに加える。2,400 \times g、20 $^{\circ}$ C で 2 分間遠心する。80 分間インキュベーション後、1,000 \times g、20 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心する。さきの 96 ウェル PCR プレート内の各サンプルの全量を FPU プレートの同じ位置に移す。2,400 \times g、20 $^{\circ}$ C で 2 分間遠心する。FPU プレートを 45 μ l の SW1 を各ウェルに加え 2,400 \times g で 2 分間遠心し洗浄する。この洗浄を 2 回繰り返す。45 μ l の UB1 を各サンプルのウェルに加える。2,400 \times g で 2 分間遠心する。

③ Extension-Ligation

45 μ l の ELM3 を FPU プレートの各サンプルのウェルに加える。FPU プレートを 37 $^{\circ}$ C のオーブンに入れ、45 分間インキュベートする。

④ PCR Amplification

4 μ l の i5 プライマーを IAP (Indexed Amplification Plate) プレートの各 column に加える。4 μ l の i7 プライマーを IAP プレートの各 row に加える。Extension-Ligation していた FPU プレートを 2,400 \times g で 2 分間遠心する。25 μ l の 50mM NaOH を FPU プレートの各サンプル

ルのウェルに加える。室温で5分間インキュベートする。インキュベートしている間に、IAPプレートにPMM2/TDP1 PCRマスターミックスをIAPプレートの各ウェルに加える。FPUプレートから溶出したサンプルをIAPプレートに移す。1,000×g、20℃で1分間遠心する。サーマルサイクラーにてPCRを行う。

⑤ PCR Clean-Up

IAPプレートを1,000×g、20℃で1分間遠心する。ライブラリ増幅が成功しているかどうかをバイオアナライザー（DNA 1000Chip）で確認する。45μlのAMPureXPビーズをCLP（Clean-up Plate）の各ウェルに加える。IAPプレート内のPCR産物の全量をCLPプレートに移す。CLPプレートを1,800 rpmで2分間攪拌する。室温で10分間静置する。マグネットスタンド上に2分間静置後、上清を捨てる。200μlの80%エタノールを各サンプルに加え、マグネットスタンド上に30秒間静置し、上清を捨てる。この洗浄作業を2回繰り返す。CLPプレートをマグネットスタンドから下し、ビーズを10分間乾燥させる。30μlのEBTをCLPプレートの各ウェルに加え、1,800 rpmで2分間攪拌する。室温で2分間静置する。プレートをマグネットスタンド上に2分間静置する。CLPプレートから20μlの上清をLNP（Library Normalization Plate）に移す。LNPプレートを1,000×gで1分間遠心する。

⑥ Library Normalization

45μlのLNA1/LNB1混合液をLNPプレートの各ウェルに加える。1,800 rpmで30分間攪拌する。マグネットプレート上で2分間静置後、上清を取り除く。LNPプレートをマグネットスタンドから下し、LNW1でビーズを2回洗浄する。30μlの0.1N NaOHをLNPプレートの各ウェルに加え、サンプルを溶出する。LNPプレートを1,800 rpmで5分間攪拌する。2分間静置する。LNPプレートの上清を、SGP（Storage Plate）に移す。SGPプレートを1,000×gで1分間遠心する。

⑦ Library Pooling and Miseq Sample Loading & Miseq Run

SGPプレートからシーケンスする各ライブラリをcolumnごとに5μlずつ取り、8連のPCRチューブに移す。8連のPCRチューブの溶液をPALチューブに移して、よく混合する。594μlのHT1をDAL（Diluted Amplicon Library）チューブに加える。6μlのPALを、HT1を含むDALチューブに加える。DALチューブを96℃のヒート

ブロックで2分間インキュベートする。インキュベート後、DAL チューブを1-2回転倒混和し、すぐに氷と水のアイスボックスに入れ急冷する。DAL チューブをアイスボックスで5分間冷やす。溶解した MiSeq 試薬カートリッジの Load Samples のところに 600 μ l の DAL をロードする。MiSeq でライブラリのシーケンスを行う。

2) GeneRead DNaseq Panel PCR Reagent V2 (Human Comprehensive Cancer Panel, Qiagen) を用いたアンプリコンターゲットシーケンス
アンプリコンターゲットシーケンスには、GeneRead DNaseq Panel PCR Reagent V2 (Human Comprehensive Cancer Panel, Qiagen) を使用した。これは、癌に関わる 160 遺伝子 (Table 5) のエクソン領域をターゲットとするパネルであり、遺伝子変異のみでなく CNV の解析も行うことが可能である。

Table 5. GeneRead DNaseq Targeted Panels V2 (Human Comprehensive Cancer Panel) の 160 の遺伝子リスト

<i>ABL1</i>	<i>CIC</i>	<i>FLT3</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>PTCH1</i>
<i>AKT1</i>	<i>CREBBP</i>	<i>FUBP1</i>	<i>MAP4K3</i>	<i>PTEN</i>
<i>AKT2</i>	<i>CRLF2</i>	<i>GATA1</i>	<i>MDM2</i>	<i>PTPN11</i>
<i>ALK</i>	<i>CSF1R</i>	<i>GATA2</i>	<i>MED2</i>	<i>RAC1</i>
<i>AMER1</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>GATA3</i>	<i>MEN1</i>	<i>RB1</i>
<i>APC</i>	<i>CYLD</i>	<i>GNA11</i>	<i>MET</i>	<i>RET</i>
<i>AR</i>	<i>DAXX</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MLH1</i>	<i>ROS1</i>
<i>ARID1A</i>	<i>DDB2</i>	<i>GNAS</i>	<i>MSH2</i>	<i>SDHB</i>
<i>ARID2</i>	<i>DDR2</i>	<i>GPC3</i>	<i>MSH6</i>	<i>SETD2</i>
<i>ASXL1</i>	<i>DICER1</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>MTOR</i>	<i>SF3B1</i>
<i>ATM</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>H3F3A</i>	<i>MUTYH</i>	<i>SLC7A8</i>
<i>ATRX</i>	<i>ECT2L</i>	<i>HIST1H3B</i>	<i>MYC</i>	<i>SMAD4</i>
<i>BAP1</i>	<i>EGFR</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MYD88</i>	<i>SMARCA4</i>
<i>BCL6</i>	<i>EP300</i>	<i>HRAS</i>	<i>NF1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>BCOR</i>	<i>EPCAM</i>	<i>HSPH1</i>	<i>NF2</i>	<i>SMO</i>
<i>BRAF</i>	<i>ERBB2</i>	<i>IDH1</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>SPOP</i>
<i>BRCA1</i>	<i>ERBB3</i>	<i>IDH2</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>SRC</i>
<i>BRCA2</i>	<i>ERBB4</i>	<i>IKZF1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>STK11</i>

<i>BRIP1</i>	<i>ERCC5</i>	<i>IL6ST</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>SUFU</i>
<i>BTK</i>	<i>ESR1</i>	<i>IL7R</i>	<i>NPM1</i>	<i>TERT</i>
<i>BUB1B</i>	<i>EZH2</i>	<i>JAK1</i>	<i>NRAS</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>CARD11</i>	<i>FAM46C</i>	<i>JAK2</i>	<i>PALB2</i>	<i>TNFRSF14</i>
<i>CBL</i>	<i>FANCA</i>	<i>JAK3</i>	<i>PAX5</i>	<i>TP53</i>
<i>CBLB</i>	<i>FANCD2</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PBRM1</i>	<i>TSC1</i>
<i>CD79A</i>	<i>FANCE</i>	<i>KDR</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>TSC2</i>
<i>CD79B</i>	<i>FAS</i>	<i>KIT</i>	<i>PHF6</i>	<i>TSHR</i>
<i>CDC73</i>	<i>FBXO11</i>	<i>KLF6</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>U2AF1</i>
<i>CDH1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>KMT2D</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>VHL</i>
<i>CDK12</i>	<i>FGFR2</i>	<i>KRAS</i>	<i>PMS2</i>	<i>WT1</i>
<i>CDK4</i>	<i>FGFR3</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>XPC</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FH</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>PRDM1</i>	<i>ZNF2</i>
<i>CHEK2</i>	<i>FLCN</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>ZRSR2</i>

① Target enrichment

GeneRead DNaseq Panel PCR Reagent V2 (Qiagen) を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法にて標的遺伝子を増幅した。

② Sample pooling and Purification

96 well plate に PCR 産物 40 μ l と AMPure XP 36 μ l 混和し磁性ビーズに結合させ室温で 5 分静置した。磁性ラック上でさらに 5 分静置し、溶液が透明になったことを確認後、ビーズを攪乱しないよう上清を除去した。AMPure XP beads 64 μ l を混和し 5 分間静置。磁性ラックにのせ 5 分間静置後、ビーズを攪乱せぬよう上清を除去。80%エタノール 200 μ l 加え、室温で 30 秒静置した後、上清を除去し、これを 2 回繰り返した。15 分静置し、ビーズを完全に乾燥させ後、28 μ l の蒸留水を加え混和し、DNA を溶出させた。磁性ラック上にて静置して溶液が透明になった後、25 μ l の上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。Agilent 2100 bioanalyzer で DNA 濃度を測定した。

③ ライブラリ作製

a. GeneRead DNA Library I core kit (Qiagen) を用いて、End repair (末端修復)、A addition (A 付加)、adapter-ligation を行った。

b. Cleanup of adapter-ligated DNA with AMPure XP beads

精製 DNA 90 μ l に Agencourt AMPure XP を 108 μ l 加え、よく混和し室温で 5 分間静置。96 well plate に移し、磁性ラックに乗せ溶液が透

明になった後、ビーズが乱れぬよう気を付けながら上清を除去。磁性ラック上で 80%エタノール 200 μ l を加え、プレートを振りビーズを洗うことを 2 回繰り返した。10 分間静置しビーズが完全に乾いたのち、19 μ l の滅菌蒸留水を加えてよく混和した後、溶液が透明になるまで磁性ラック上に静置した。17 μ l の上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。

c. PCR amplification of purified library

精製したライブラリを GeneRead DNA I Amp kit (Qiagen) で PCR 増幅させ

d. Cleanup of amplified library with AMPure XP beads

50 μ l の PCR 溶液に 40 μ l の AMPure XP beads を加えよく混和した。室温で 5 分間静置した。磁性ラック上で上清とビーズが分離して溶液が透明になった後、86 μ l の上清を 96well plate に移した。20 μ l の AMPure XP beads を上清に加えよく混和し室温 5 分静置した。溶液が透明になるまで磁性ラック上にのせたのち、ビーズが乱れぬように上清を除去した。80%エタノールで 2 回洗浄後、10 分間で完全にビーズを乾かした。30 μ l の滅菌蒸留水で DNA ライブラリービーズを溶出した。磁性ラック上で溶液が透明になるまで静置した後、28 μ l の上清を PCR チューブに移した。

e. Sequencing

ライブラリを滅菌蒸留水で希釈し、0.2N 水酸化ナトリウムと混和した後、室温で 5 分静置してライブラリを変性させた。変性ライブラリを Hybridization Buffer で希釈し、12.5 pM PhiX (Illumina) を混和した。ライブラリ希釈液を MiSeq V2 Reagent kit (Illumina) の試薬カートリッジに 600 μ l 添加し、MiSeq2000 (Illumina) でシーケンスした。

3. データ解析

1) Illumina Truseq Cancer Panel の結果の解析

Miseq から得られた FastQ ファイルを BioReT System (Amelieff, Tokyo, Japan) を用いて解析をおこなった。BioReT System では、GATK UnifiedGenotyper と GATK VariantFiltration を用いて一塩基変異 (SNV, single nucleotide variants) と塩基の挿入/欠失 (insetion/deletion, indel) を検出した。検出した変異の内、胚細胞性変異

と思われるものは、変異陽性率ならびに dbSNP と Human Genetic Variation Database (HGVD) を参考に除外した。

2) GeneRead DNaseq Targeted Panels V2 (Human Comprehensive Cancer Panel) の結果の解析

Miseq から得られた FastQ ファイルを BioReT System (Amelieff, Tokyo, Jpan) ならびに GeneRead DNaseq Variant Calling Service (Qiagen, <http://ngsdataanalysis.sabiosciences.com/NGS2/>) で解析をおこなった。

GeneRead DNaseq Variant Calling Service では、変異ならびに CNA の検出を行った。CNA のリファレンスとして、上記 30 検体の中から、3 検体の正常部から抽出したゲノム DNA より得られた解析データを用いた。BioReT System では、GATK UnifiedGenotyper と GATK VariantFiltration を用いて一塩基変異 (SNV, single nucleotide variants) と塩基の挿入/欠失 (insetion/deletion, indel) を検出した。検出した変異の内、胚細胞性変異と思われるものは、変異陽性率ならびに sbSNP と Human Genetic Variation Database (HGVD) を参考に除外した。

最終的に変異に関しては、GeneRead DNaseq Varinat Calling Service と BioReT System の双方の解析システムで検出されたものを抽出した。

【実験結果】

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遺伝子変異解析

1) NGS を用いたアンプリコンターゲットシーケンスを行う上での、**Miseq** からコールされる変異数から見た凍結検体と **FFPE** 検体の **DAN** のクオリティーの比較検討。

① 凍結検体と **FFPE** 検体のコールされる変異数の比較

変異解析ソフトにかける前の **Miseq** よりコールされる変異数を比較した。凍結検体においては、**60** 前後の変異数であるが、**FFPE** 検体では、**110~440** の変異数と非常に多くの変異が検出され、凍結検体と **FFPE** 検体において明らかな変異数の乖離が認められた。(Fig 3)

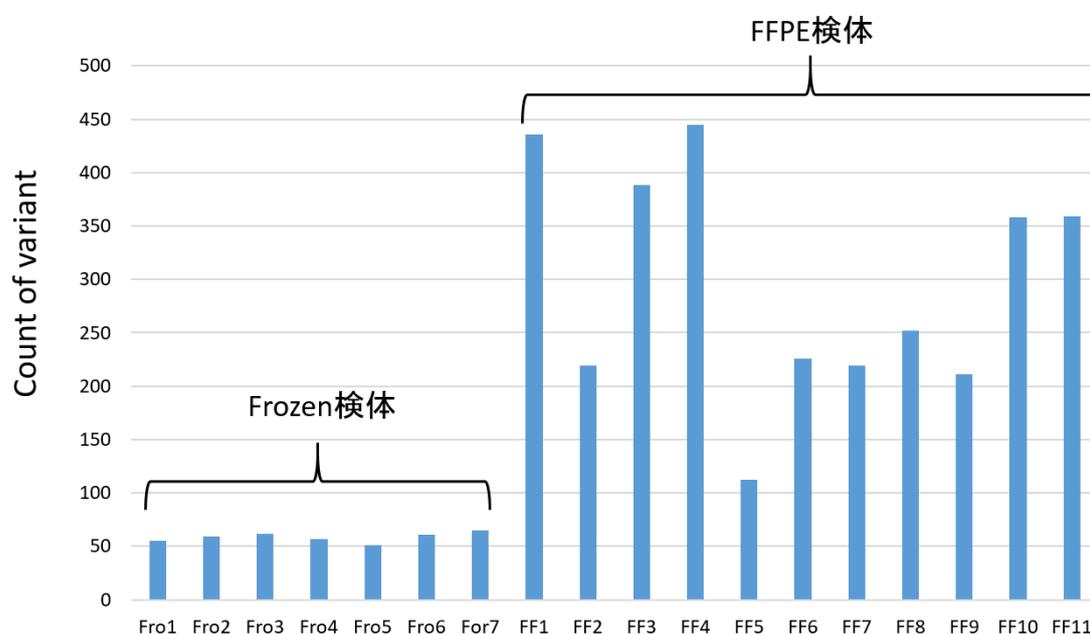


Fig 3. **Miseq** よりコールされる変異数 : **FFPE** 検体では、**Frozen** 検体と比較して非常に多くの変異が検出された。

② **Quality** 値、**Read Depth**、**Variant Frequency (VF)** のカットオフ値による変異数の変化

まず、コールされた変異の **Quality** 値が **pass** したもの、**Read Depth** が ≥ 100 の変異のみを抽出したうえで、**Variant Frequency** の **cut off** 値によって変異数がどのように変化するかをみた。

凍結検体においては、VF の cut off 値を 0.05 以下にセットすると、変異数が 16~26 程度となり、それ以上 cut off 値を上げて変異数に変化はあまり認めなかった。(Fig 4) 一方、FFPE 検体においては、VF の cut off 値を 0.05 以下にセットしてもほとんどの症例が変異数 50 以上であった。このため、cut off 値を 0.10 以下まで上げると、凍結検体の変異数とほぼ一致する 20 前後の変異数となった。(Fig 5)

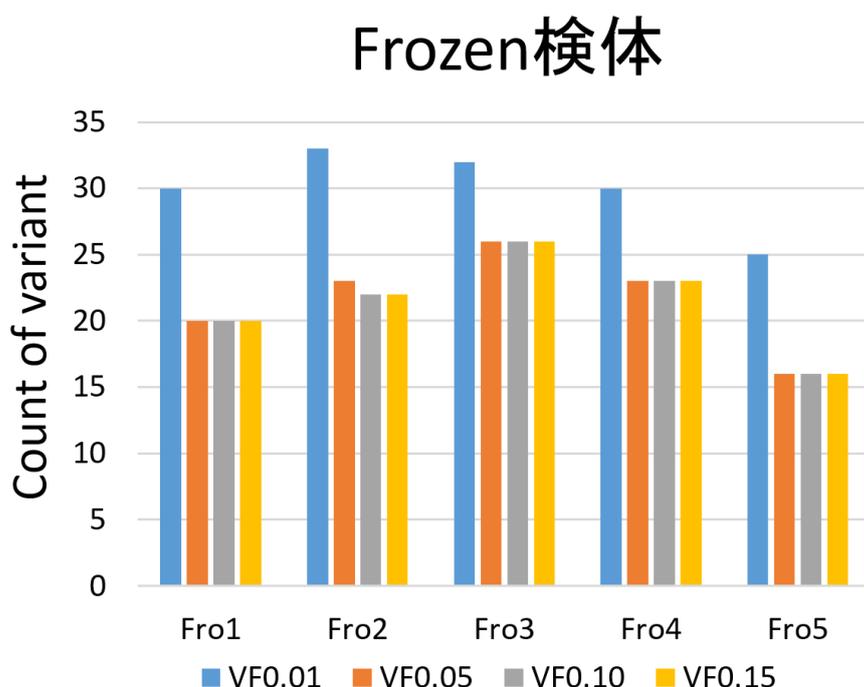


Fig 4. Frozen 検体での VF の cut off 値による変異数の推移 : VF の cut off 値が 0.05 から 0.15 では、変異数は 20 前後でほとんど変化は認めなかった。

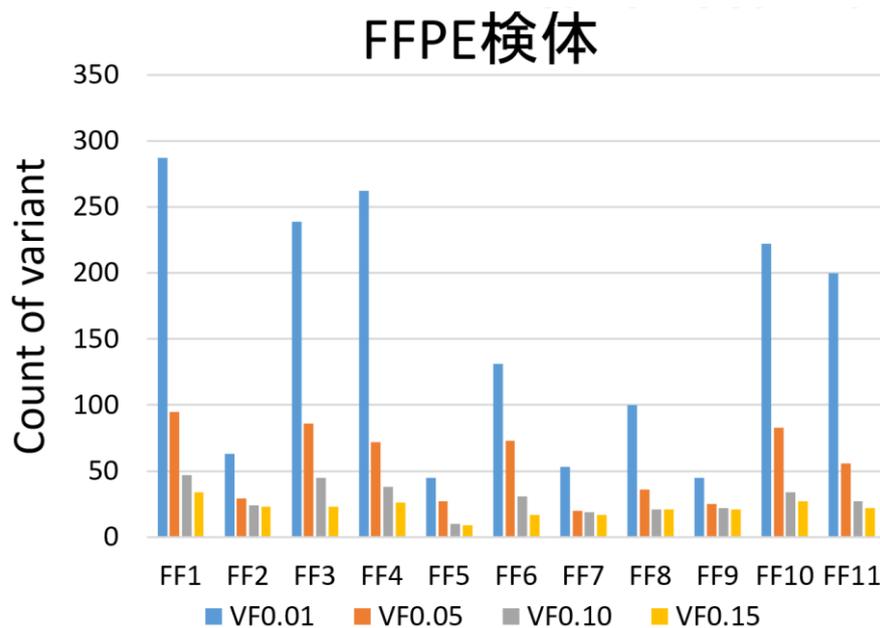


Fig 5. FFPE 検体での VF の cut off 値による変異数の推移：VF の cut off 値を 0.10 まで上げると、凍結検体と同等の 20 前後の変異数となった。

2) Actionable mutation と Druggable mutation の検索

Actionable mutation を認めた症例は 18 例中 9 例（50%）であった（Fig 6）。検出された actionable mutation は、*KRAS* 7 例、*BRAF* 1 例、*PIK3CA* 2 例、*EGFR* 2 例、*SMAD4* 1 例、*VHL* 1 例であった。Druggable mutation は 18 例中 5 症例（27.8%）に認め、*EGFR* 変異に対しては、抗 *EGFR* 抗体薬ならびに各種チロシンキナーゼ阻害薬、さらに FF10 症例の *EGFR T790M* に対してはタグリッソ（オシメルチニブ）が有効な可能性がある。*PIK3CA* 変異に対する *PIK3CA*、*AKT*、*mTOR* 阻害剤、*FBXW7* に対しては *mTOR* 阻害剤、*VHL* 変異に対する *HIF-1* 阻害剤、*KIT* 変異に対するイマチニブ、*ATM* 変異に対するオラパリブが有効な可能性が考えられた。

一方、ドライバーと思われる遺伝子変異を認めない症例が 6 例、変異自体検出されなかった症例を 1 例認めた。

以上の結果のように 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遺伝子解析からでは、十分な druggable mutation が得られなかった。このため、さらに遺伝子数、シーケンス範囲の広い GeneRead DNAseq Panel PCR Reagent V2 (Human Comprehensive Cancer Panel, Qiagen) を用いてアンプリコンターゲットシーケンスを行うこととした。

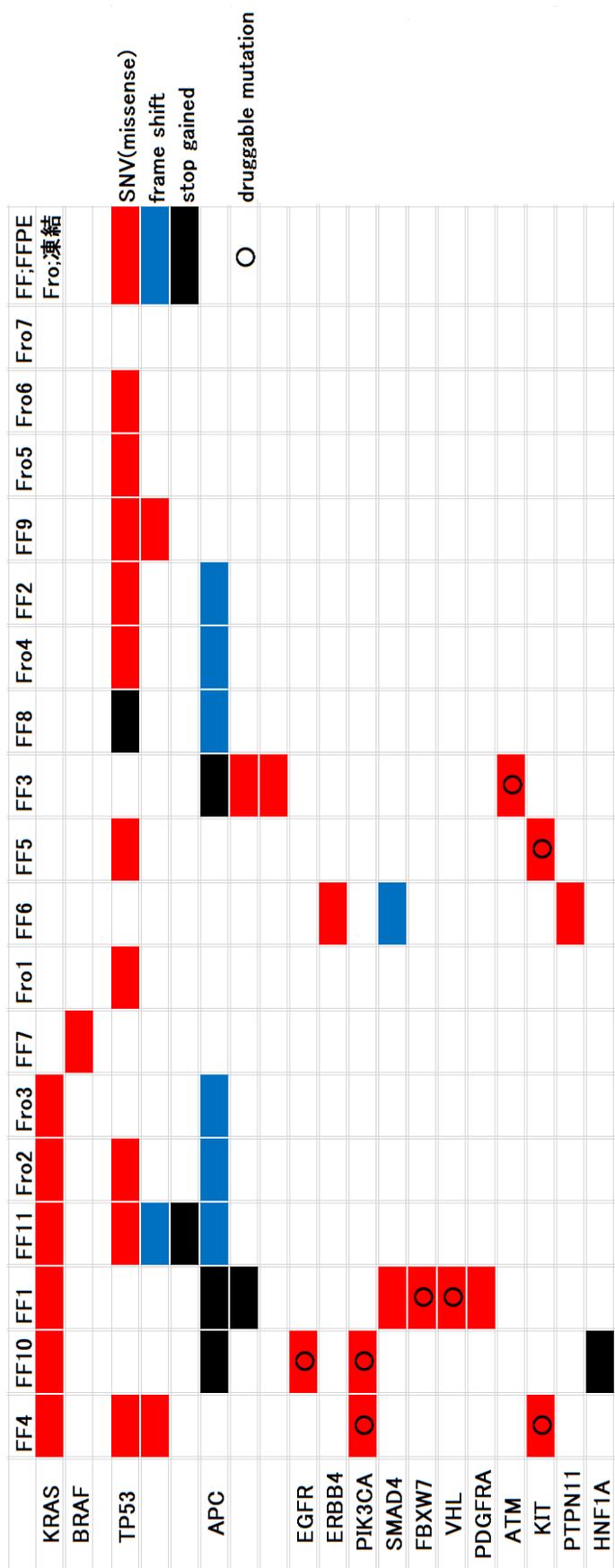


Fig 6. Illumina Truseq Cancer Panel を用いた遺伝子変異解析により検出された遺伝子変異と druggable mutation。: Druggable mutation は、18 例中 6 例（27.8%）に認められた。変異自体検出されなかった症例を 1 例認めた。

SNV を赤、frame shift を青、stop gained を黒で示した。

Druggable mutation は、○で示した。

2. GeneRead DNaseq Panel PCR Reagent V2 (Human Comprehensive Cancer Panel, Qiagen)を用いたアンプリコンターゲットシーケンスの遺伝子変異解析

1) 症例の臨床病理学的特徴

Table 6. 症例の臨床病理学的特徴

Characteristics	Patients (n=30)
Age, median (range), y	69 (44-89)
Sex, n (%)	
M	17 (57)
F	13 (43)
Histological type, n (%)	
Tub1-2	27 (90)
Por	1 (3)
Muc	2 (7)
ly, n (%)	
(-)	14 (47)
(+)	16 (53)
v, n(%)	
(-)	12(40)
(+)	18(60)
Tumor location, n (%)	
Rt	8 (27)
Lt	22 (73)
Stage, n (%)	
I	5 (17)
II	11 (37)
IIIa	9 (30)
IIIb	0 (0)
IV	5 (17)

原発大腸癌切除患者 30 例の臨床病理学的特徴を Table 6 にまとめた。平均年齢は 69 才、男性が 57%、女性が 43%であった。脾弯曲部を境として

右側結腸が 8 例（27%）、左側結腸が 22 例（73%）であった。StageIVの 5 例を除く Stage I~III の 25 例は、根治的切除術が施行された。根治切除をされた 25 例中 8 例に再発を認めた。

2) 検出された遺伝子変異

GeneRead DNaseq Targeted Panels V2 (Comprehensive Cancer Panel) で検出された Missense 変異、frameshift 変異、stop gained 変異を Table 7 に示す。110T 症例の KRAS Leu19Phe 変異は既知の報告²⁴ から codon12、13、146 の変異とは別の phenotype と考えられたため、野生型として扱った。

Table 7. GeneRead DNaseq Targeted Panels V2 (Comprehensive Cancer Panel) で検出された遺伝子変異。

No.	変異遺伝子	Effect	AA change	VF	腫瘍含有率
58T	<i>MTOR</i>	Missense	Ala2532Val	0.19259	50%
	<i>MTOR</i>	Missense	Asp1569His	0.11365	
	<i>PIK3CA</i>	Missense	His1047Arg	0.13945	
	<i>KRAS</i>	Missense	Ala146Thr	0.17903	
	<i>BRCA2</i>	frameshift	Gln1782fs	0.14875	
	<i>RB1</i>	Missense	Thr620Met	0.15603	
	<i>CIC</i>	Missense	Arg351Trp	0.19149	
	<i>DAXX</i>	Missense	Arg538His	0.14526	
	<i>TNFAIP3</i>	Missense	Val377Met	0.14890	
	<i>KMT2D</i>	Frameshift	Pro647fs	0.15879	
	<i>JAK3</i>	Missense	Gly62Ser	0.06082	
	<i>ARID1A</i>	Missense	Gly791Trp	0.19208	
	<i>IDH1</i>	Missense	Thr75Ala	0.12981	
	<i>CBLB</i>	Missense	Leu660Arg	0.12347	
	<i>APC</i>	Frameshift	Pro1992fs	0.11732	
	<i>ROS1</i>	Missense	Ala2311Thr	0.15659	
	<i>MYC</i>	Missense	Pro12Ser	0.06433	
	<i>PTCH1</i>	Missense	Pro1318Ser	0.16286	
	<i>ABL1</i>	Missense	Ala414Val	0.11301	
	<i>NOTCH1</i>	Missense	Ala1329Pro	0.18660	
<i>KMT2D</i>	Missense	His3128Arg	0.12910		

	<i>DICER1</i>	Stop gained	Arg656*	0.17479	
	<i>FLCN</i>	Missense	Val430Met	0.21024	
	<i>JAK3</i>	Missense	Thr8Met	0.14582	
	<i>AMER1</i>	frameshift	Asp307fs	0.32670	
70T	<i>APC</i>	Frameshift	Lys1454fs	0.27842	60%
	<i>APC</i>	Frameshift	Glu1554Lys	0.22828	
	<i>BRAF</i>	Missense	Val600Glu	0.20352	
	<i>AKT1</i>	Missense	Glu17Lys	0.25414	
	<i>CDH1</i>	Frameshift	Arg124fs	0.24253	
	<i>EP300</i>	Frameshift	Lys1468fs	0.23789	
	<i>CREBBP</i>	Missense	Ser980Asn	0.22657	
	<i>GRIN2A</i>	Missense	Leu1336Val	0.36842	
	<i>SMAD4</i>	Missense	Leu47Arg	0.15244	
	<i>AR</i>	Missense	Arg31His	0.17442	
	<i>ATRX</i>	Missense	Gly832Ala	0.23994	
71T	<i>APC</i>	Frameshift	His1490fs	0.30233	90%
	<i>KRAS</i>	Missense	Gly12Asp	0.42988	
	<i>TP53</i>	Missense	Arg273Cys	0.50702	
	<i>SDHB</i>	Missense	Ile97Met	0.08163	
	<i>FBXW7</i>	Missense	Cys533Phe	0.13971	
	<i>APC</i>	Stop gained	Lys561*	0.35211	
72T	<i>TP53</i>	Stop gained	Arg306*	0.60425	80%
	<i>GNAS</i>	Missense	Glu47Lys	0.08360	
74T	<i>KRAS</i>	Missense	Gly12Asp	0.08489	40%
	<i>TP53</i>	Missense	Val216Met	0.12106	
76T	<i>APC</i>	Stop gained	Arg499*	0.28127	60%
	<i>APC</i>	Frameshift	Arg1314fs	0.17900	
	<i>TP53</i>	Missense	Leu130Pro	0.49320	
	<i>ARID1A</i>	Frameshift	Pro1590fs	0.42116	
78T	<i>PIK3CA</i>	Missense	Asn345Lys	0.13386	60%
	<i>APC</i>	Stop gained	Gln1429*	0.12766	
	<i>KRAS</i>	Missense	Gly12Val	0.18536	
	<i>SMAD4</i>	missense	Ala532Asp	0.20413	
79T	<i>APC</i>	Stop gained	Lys1308*	0.20416	50%

	<i>APC</i>	Frameshift	Ala725fs	0.26898	
	<i>KRAS</i>	missense	Gly12Asp	0.20329	
81T	<i>TP53</i>	Stop gained	Arg342*	0.61286	80%
	<i>PDGFRA</i>	missense	Val193Ile	0.25298	
82T	<i>EGFR</i>	Missense	Ala722Val	0.22551	50%
	<i>ERBB3</i>	missense	Arg475Trp	0.18945	
	<i>PTPN11</i>	missense	Thr468Met	0.10882	
	<i>TP53</i>	missense	Arg273Cys	0.22535	
	<i>TP53</i>	frameshift	Pro152fs	0.19409	
	<i>ERBB2</i>	missense	Arg678Gln	0.24640	
	<i>JAK1</i>	frameshift	Pro430fs	0.18908	
	<i>SUFU</i>	missense	Pro482Leu	0.21123	
	<i>TSC2</i>	missense	Ser1379Leu	0.35417	
	<i>GRIN2A</i>	missense	Arg1241Gln	0.19377	
	<i>GRIN2A</i>	missense	Val109Ile	0.16581	
	<i>GRIN2A</i>	missense	Ala818Val	0.21748	
	<i>GRIN2A</i>	missense	Phe708Ile	0.19435	
	<i>NOTCH2</i>	missense	Ala2123Pro	0.11242	
	<i>NOTCH2</i>	missense	Arg1824His	0.15584	
	<i>CDC73</i>	missense	Arg399Gln	0.13738	
	<i>FBXO11</i>	missense	Thr623Ile	0.19005	
	<i>BAP1</i>	frameshift	Glu198fs	0.17981	
	<i>PBRM1</i>	missense	Arg576Cys	0.19908	
	<i>FGFR3</i>	frameshift	Ser402fs	0.15254	
	<i>APC</i>	missense	Asn933Ser	0.10176	
	<i>NPM1</i>	missense	Asp165Glu	0.18804	
	<i>NPM1</i>	missense	Asp166Glu	0.19022	
	<i>PRDM1</i>	missense	Ser258Phe	0.22238	
	<i>TNFAIP3</i>	missense	Ala717Thr	0.20462	
	<i>FGFR2</i>	missense	Leu10Pro	0.21156	
	<i>KMT2D</i>	frameshift	Ala3187fs	0.14634	
	<i>KMT2D</i>	missense	Ala2500Val	0.26250	
	<i>MAP2K1</i>	frameshift	Ile343fs	0.15859	
	<i>CREBBP</i>	missense	Gly1374Arg	0.19093	

	<i>CYLD</i>	missense	Arg557Cys	0.12411	
	<i>BRCA1</i>	missense	Thr77Met	0.07868	
	<i>STK11</i>	missense	Arg310Trp	0.23030	
	<i>MAP2K2</i>	missense	Pro236Leu	0.21849	
	<i>JAK3</i>	missense	Pro446Ser	0.07212	
	<i>AMER1</i>	missense	Glu933Lys	0.08333	
	<i>AR</i>	missense	Arg539His	0.19048	
	<i>ATRX</i>	missense	Val283Ile	0.18968	
83T	<i>PIK3R1</i>	Missense	Ser565Asn	0.36490	60%
	<i>TP53</i>	Missense	Gly245Ser	0.31579	
	<i>MTOR</i>	Missense	Thr1176Met	0.14531	
	<i>APC</i>	Stop gained	Gly871*	0.38258	
	<i>FLCN</i>	frameshift	Pro28fs	0.21607	
84T	<i>KRAS</i>	Missense	Gly12Asp	0.17377	40%
	<i>TP53</i>	Missense	Ile254Asn	0.19802	
	<i>GNAS</i>	Missense	Ala642Val	0.13514	
85T	<i>APC</i>	Stop gained	Ser1356*	0.80018	90%
	<i>KRAS</i>	Missense	Gly12Asp	0.42056	
	<i>TP53</i>	Missense	Arg175His	0.76392	
	<i>SMARCA4</i>	Missense	Arg1157Trp	0.45302	
86T	<i>PIK3CA</i>	Missense	Gly118Asp	0.31936	60%
	<i>KRAS</i>	Missense	Gly13Asp	0.41092	
	<i>TP53</i>	Missense	Arg175His	0.51923	
	<i>ERCC5</i>	Missense	Arg420His	0.44570	
	<i>SMARCA4</i>	Missense	Arg425Gln	0.12417	
87T	<i>APC</i>	Stop gained	Ser1346*	0.10211	40%
	<i>TP53</i>	Missense	Cys176Tyr	0.25865	
	<i>KDR</i>	Missense	Pro451Leu	0.12454	
106T	<i>APC</i>	Stop gained	Ser1392*	0.42353	80%
	<i>KRAS</i>	Missense	Gly13Asp	0.25444	
	<i>ERBB3</i>	Missense	Ala245Val	0.27287	
	<i>SMARCB1</i>	Missense	Arg377His	0.30261	
	<i>APC</i>	Missense	Asp989Gly	0.72727	
	<i>ATM</i>	Missense	Ala1024Val	0.27054	

108T	<i>FBXW7</i>	Missense	Arg465His	0.32619	80%
	<i>FBXW7</i>	Missense	Gly644Glu	0.23155	
	<i>APC</i>	Stop gained	Arg1450*	0.31782	
	<i>APC</i>	Frameshift	Ala257fs	0.37561	
	<i>KRAS</i>	Missense	Ala146Thr	0.46952	
	<i>ERBB3</i>	Missense	Val104Met	0.11715	
	<i>AKT1</i>	Missense	Glu17Lys	0.13965	
	<i>TP53</i>	Missense	Arg248Gln	0.22662	
	<i>MTOR</i>	Missense	Ile2017Thr	0.33933	
	<i>SLC7A8</i>	Stop gained	Trp411*	0.12947	
110T	<i>ARID1A</i>	Missense	Arg2143His	0.20661	80%
	<i>CTNNB1</i>	Missense	Lys335Ile	0.30420	
	<i>KRAS</i>	Missense	Leu19Phe	0.66580	
	<i>TP53</i>	Missense	Arg175His	0.49830	
	<i>SMAD4</i>	Missense	Asp493Asn	0.25887	
113T	<i>APC</i>	Stop gained	Glu1338*	0.19623	50%
	<i>TP53</i>	Missense	Arg248Gln	0.38158	
	<i>SMARCA4</i>	Missense	Asp1284Asn	0.50494	
	<i>DDR2</i>	Missense	Arg135His	0.51807	
120T	<i>APC</i>	Stop gained	Arg1114*	0.22159	90%
	<i>TP53</i>	Stop gained	Arg213*	0.68898	
	<i>KMT2D</i>	Missense	Thr680Ser	0.17857	
	<i>AMER1</i>	Stop gained	Arg531*	0.43207	
121T	<i>APC</i>	Stop gained	Arg876*	0.14226	80%
	<i>APC</i>	Frameshift	Ile1579fs	0.25078	
	<i>TP53</i>	Missense	Leu111Pro	0.63810	
129T	<i>TP53</i>	Missense	Cys135Phe	0.45492	80%
130T	<i>BRAF</i>	Missense	Val600Glu	0.20925	80%
	<i>PTEN</i>	Missense	Ala148Thr	0.18684	
	<i>CDH1</i>	Frameshift	Arg124fs	0.21677	
	<i>TP53</i>	Missense	Arg273Cys	0.22683	
	<i>SMARCB1</i>	Missense	Arg377Cys	0.26597	
	<i>EP300</i>	Missense	Ala450Va	0.27653	
131T	<i>APC</i>	Frameshift	Ile1307fs	0.40311	40%

	<i>TP53</i>	Missense	Ala161Thr	0.29513	
132T	<i>FBXW7</i>	Stop gained	Arg658*	0.22597	80%
	<i>APC</i>	Stop gained	Arg216*	0.08456	
	<i>APC</i>	Stop gained	Gln1367*	0.24267	
	<i>KRAS</i>	Missense	Gly13Asp	0.26158	
	<i>SMAD4</i>	Stop gained	Ser178*	0.17888	
133T	<i>TP53</i>	Missense	Arg248Gln	0.17000	50%
	<i>ARID1A</i>	Stop gained	Gln1148*	0.09880	
134T	<i>APC</i>	Stop gained	Lys1308*	0.08085	20%
	<i>APC</i>	Missense	Glu468*	0.08987	
	<i>TP53</i>	Stop gained	Gly245Ser	0.10145	
135T	<i>APC</i>	Frameshift	Thr1438fs	0.17878	80%
	<i>KRAS</i>	Missense	Gly12Asp	0.46082	
	<i>HSPH1</i>	Missense	Ala5Asp	0.58084	
	<i>TP53</i>	Frameshift	Asp324fs	0.43021	
	<i>BRIP1</i>	Missense	Ser241Pro	0.44032	
	<i>PRKAR1A</i>	Frameshift	Ile149fs	0.22871	
136T	<i>MTOR</i>	Missense	Met2327Ile	0.27143	70%
	<i>PIK3CA</i>	Missense	His1047Arg	0.28672	
	<i>BRAF</i>	Missense	Val600Glu	0.27347	
137T	<i>APC</i>	Frameshift	Val1472fs	0.22911	30%
	<i>TP53</i>	Stop gained	Gly199*	0.20333	
	<i>BRCA1</i>	missense	Gln1847Lys	0.08124	

3) Druggable mutation の検索

Druggable mutation を認めた症例は、30 例中 18 例（60%）であり、Illumina Truseq Cancer Panel での druggable mutation の約 2 倍の検出頻度であった（Fig 7）。Druggable mutation は、*EGFR* 1 例、*ERBB2* 1 例、*BRCA1* 3 例、*ATM* 1 例、*DDR2* 1 例、*PIK3CA* 4 例、*MTOR* 3 例、*FBXW7* 3 例、*AKT1* 1 例、*PTEN* 1 例、*ARID1A* 3 例を認めた。検出された druggable mutation をその遺伝子の機能から分類すると ①PI3K/AKT/mTOR 関連遺伝子；*PIK3CA*、*ATK1*、*MTOR*、*FBXW7*、*PTEN* ②受容体型チロシンキナーゼ；*EGFR*、*ERBB2*、*DDR2* ③遺伝子修復に関与する遺伝子；*BRCA1*、*ATM* ④クロマチンリモデリングに

関与する遺伝子；*ARID1A*に分類することができた (Fig 7)。それぞれに対する分子標的治療薬としては、①に対してはPIK3CA/AKT/mTOR経路に関する阻害剤、②に対しては各種チロシンキナーゼ阻害剤 (HER2阻害剤、ダサチニブ、その他チロシンキナーゼ阻害剤など)、③に対しては、PARP阻害剤が有効な可能性が考えられる。しかし①の症例に関しては、今回の検討において*KRAS*、*BRAF*との重複遺伝子変異例を9例認め*KRAS*と*BRAF*変異例15例のうちの60%を占めていた。これらの重複した症例は有効な分子標的薬が現状明らかにされていない*KRAS*、*BRAF*変異を含んでいるため、PIK3CA/AKT/mTOR阻害剤が有効である可能性が低いと考えられ、NGSを用いた遺伝子解析による個別化医療においても*KRAS*、*BRAF*変異症例は、治療法選択の障壁となると考えられた。

一方、検出された体細胞変異数において、58T症例は35個、82T症例は46個と他の症例と比較して突出して多くの体細胞変異数を認めた。これら2症例は、germ line変異と考えられる変異を58Tは*MLH1*に、82Tは*MSH2*に認めており、これら2症例はミスマッチ修復遺伝子が関与する遺伝性大腸癌と考えられた。(実際、58T症例は臨床的にリンチ症候群の亜型であるMuir-Torre症候群と診断されている。)このため、これら2症例に関しては抗PDL-1抗体が有効である可能性があると考えられる。

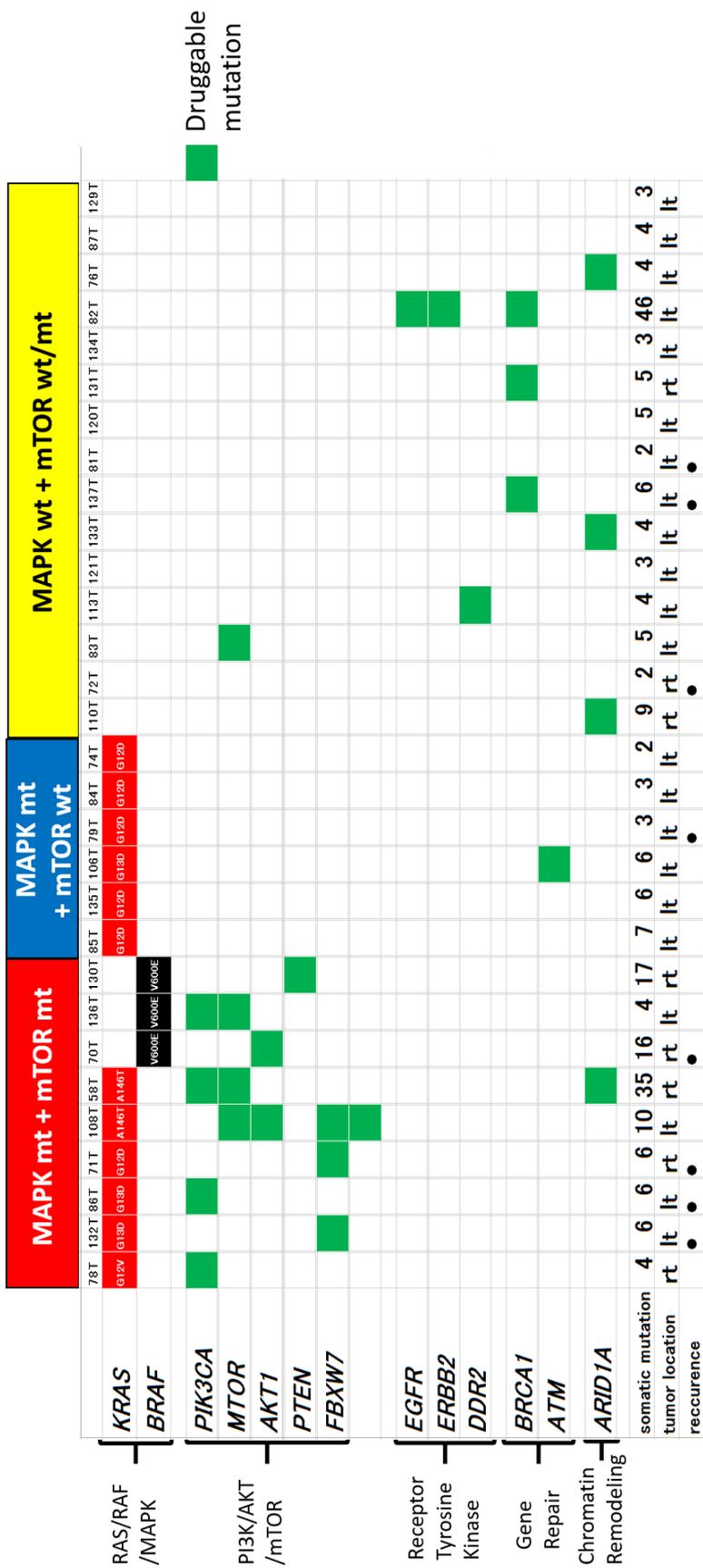


Fig7. GeneRead DNaseq Panel PCR Reagent V2 (Human Comprehensive Cancer Panel, Qiagen)により検出された druggable mutation : druggable mutation は、緑で示し、その機能から4つのグループに分けることができた。また、KRAS/BRAF 変異と mTOR 関連遺伝子変異が重複する genotype を認めた。Somatic mutation には、synonymous, non synonymous, frame shift, stop gained を含めた。Recurrence 症例は、●で示した。

4) *KRAS/BRAF* 遺伝子変異と PI3K/AKT/mTOR 経路関連遺伝子変異の重複変異症例の予後解析と臨床病理学的解析

① 予後解析

Druggable mutation の検索で認めた *KRAS* もしくは *BRAF* 変異と PI3K/AKT/mTOR 経路関連遺伝子変異の重複変異（以後、MAPK mt + mTOR mt と表記。）をひとつの genotype と考え、その予後との関係を検討した。原発大腸癌 30 例の内、StageIV の 5 例を除いて R0 切除された Stage I ~ III の 25 例で MAPK mt + mTOR mt の予後を検討するため Kaplan-Meier 法による全生存率 (OS) と無再発生存率 (RFS) の解析を行った (Fig 8, 9)。OS において、MAPK mt + mTOR mt 群とそれ以外での比較では、MAPK mt + mTOR mt 群で有意差をもって予後が不良であった。また、MAPK 経路関連遺伝子変異ありで PIK3CA/AKT/mTOR 関連遺伝子が wild type である群を MAPK mt + mTOR wt、MAPK 経路関連遺伝子が wild type である症例を MAPK wt + mTOR wt/mt (PIK3CA/AKT/mTOR 関連遺伝子は変異型もしくは野生型) と表記することとし、MAPK mt + mTOR mt 群、MAPK mt + mTOR wt 群、MAPK wt + mTOR mt/wt 群の 3 群で OS と RFS の予後解析を行った (Fig 10, 11)。その結果、OS では有意差こそ認めなかったものの、MAPK mt + mTOR wt 群の予後が良好で、MAPK mt + mTOR mt 群の予後が不良ある傾向があった。RFS の解析では、いずれも有意差は認められなかったが、OS と同様、MAPK mt + mTOR mt が予後不良で MAPK mt + mTOR wt が予後良好な傾向を示した。

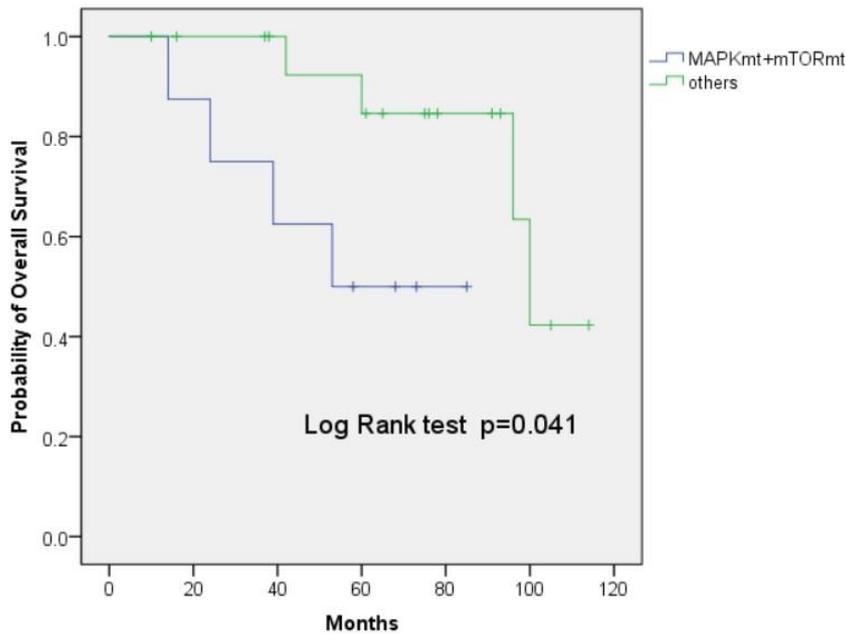


Fig 8. MAPKmt+mTORmt の Overall Survival : MAPKmt+mTORmt 群は、予後不良であった ($p=0.041$)。

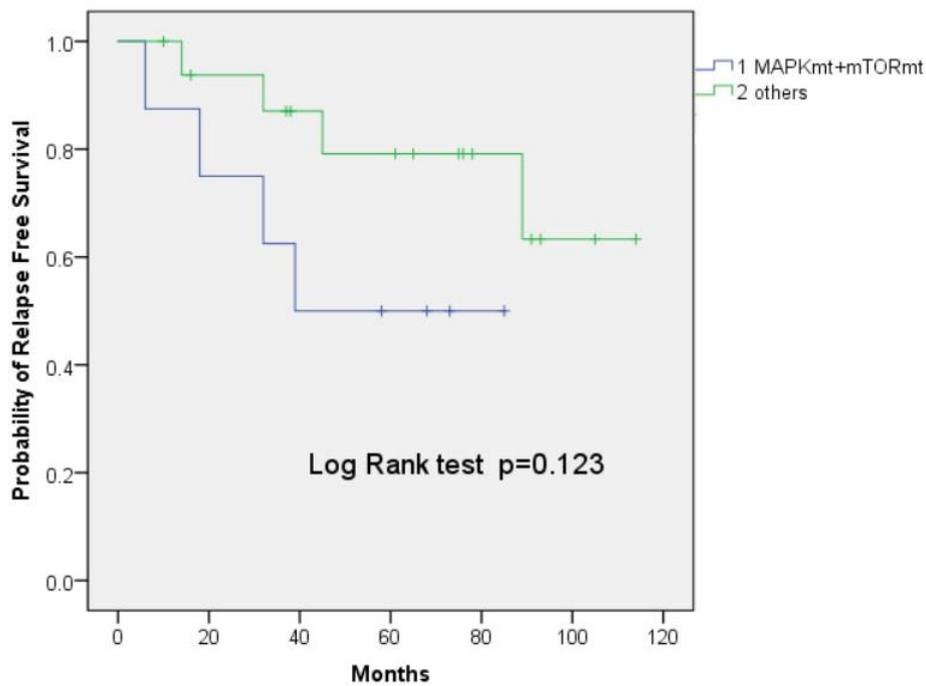


Fig 9. MAPKmt+mTORmt の Relapse Free Survival : MAPKmt+mTORmt 群は予後不良な傾向を認めたが、有意差は認められなかった ($p=0.123$)。

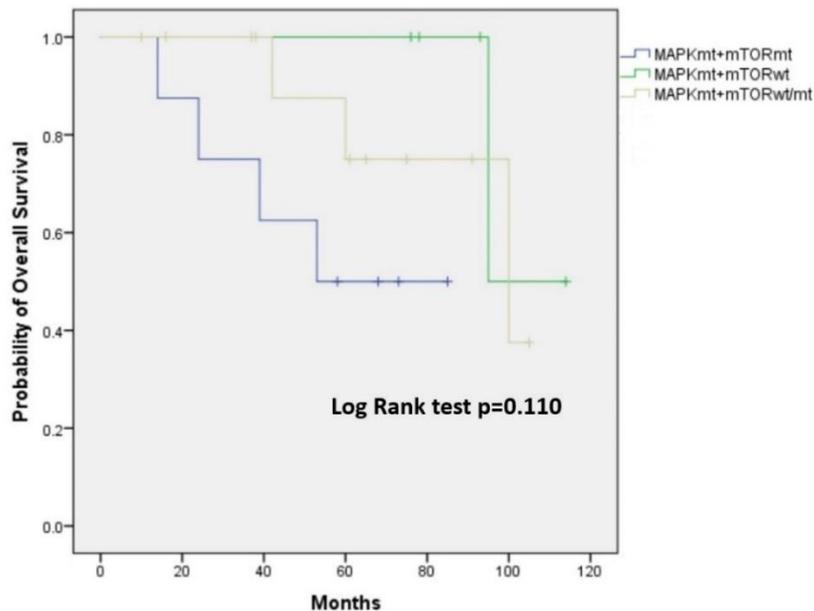


Fig 10. MAPKmt+mTORmt, MAPKmt+mTORwt, MAPKwt+mTORwt/mt の3群間での Overall Survival : MAPKmt+mTORmt 群が予後不良で、MAPKmt+mTORwt 群が予後良好な傾向がみられたが、有意差は認めなかった ($p=0.110$)。

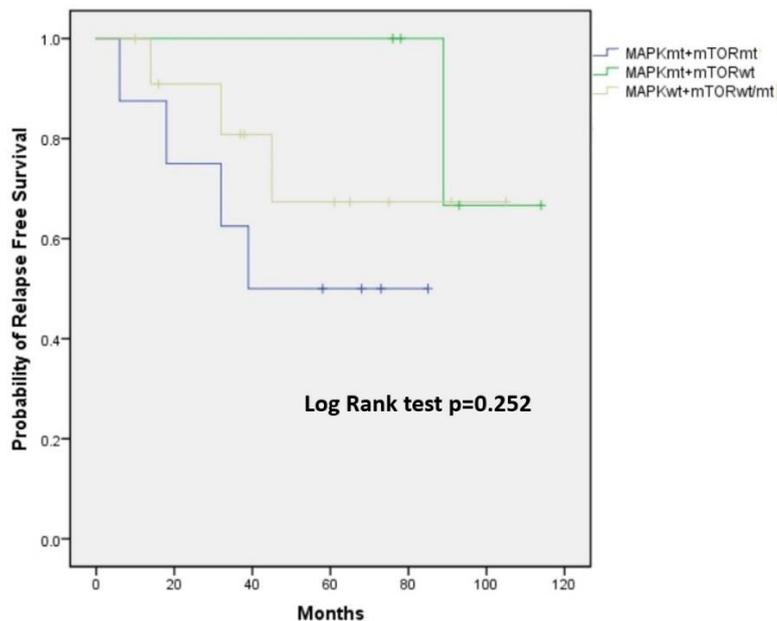


Fig 11. MAPKmt+mTORmt, MAPKmt+mTORwt, MAPKwt+mTORwt/mt の3群間での Relapse Free Survival : OS 同様、MAPKmt+mTORmt 群が予後不良、MAPKmt+mTORwt 群が予後良好な傾向を認めたが、有意差は認めなかった ($p=0.252$)。

③ MAPK mt + mTOR mt の変異遺伝子組み合わせタイプ

MAPKmt と mTORmt の変異遺伝子の組み合わせは、*KRAS/PIK3CA* 2例、*KRAS/FBXW7* 2例、*KRAS/PIK3CA/MTOR* 1例、*KRAS/FBXW7/MTOR/AKT1* 1例、*BRAF/PIK3CA/MTOR* 1例、*BRAF/AKT1* 1例、*BRAF/PTEN* 1例であった。*KRAS* 変異例では、*PIK3CA* もしくは、*FBXW7* が含まれていたが、それらが重複する症例は認められなかった (Table 8)。

Table 8. 重複遺伝子変異の組み合わせタイプ

重複遺伝子変異	患者 (n=9)
<i>KRAS/PIK3CA</i>	2
<i>KRAS/FBXW7</i>	2
<i>KRAS/PIK3CA/MTOR</i>	1
<i>KRAS/FBXW7/MTOR/AKT1</i>	1
<i>BRAF/PIK3CA /MTOR</i>	1
<i>BRAF/AKT1</i>	1
<i>BRAF/PTEN</i>	1

④ MAPK mt + mTOR mt 群と臨床病理学的因子

予後解析にて有意差を認めた MAPK mt + mTOR mt 群と others 群において年齢、性別、病理組織型、リンパ管・脈管侵襲、腫瘍占拠部位 (脾弯曲部を境として右側と左側)、臨床病期の臨床病理学的解析を行った (Table 9)。腫瘍占拠部位において、MAPK mt + mTOR mt 群は others 群と比較して有意差をもって右側に多い結果であった。

Table 9. “MAPK mt + mTOR mt” genotype の臨床病理学的特徴

	MAPK mt + mTOR mt	Others	Fisher's exact test <i>P</i>
Age			
<70	5	10	0.7135
≤70	4	11	
Sex			
M	6	11	0.6908
F	3	10	
Hist. type			
tub1-2	8	19	1.0000
muc or por	1	2	
ly			
(-)	3	11	0.4397
(+)	6	10	
v			
(-)	4	8	1.0000
(+)	5	13	
Tumor location			
rt	5	3	0.0318
lt	4	18	
Stage			
I, II	5	11	1.0000
III, IV	4	10	

【考察】

1. NGS を用いたアンプリコンターゲットシーケンスを行う上での、Miseq からコールされる変異数から見た凍結検体と FFPE 検体の DAN のクオリティの比較検討。

解析ソフトにかける前の凍結検体、FFPE 検体からの変異コール数には大きな乖離があり、FFPE 検体からの変異数が非常に多かった。Quality 値、Dead depth、Variant frequency などの数値に cut off 値を設けることで、それぞれの変異のコール数は同等となった。このことから、FFPE 検体から抽出される DNA は、ホルマリンによる損傷を多くうけていることが原因と考えられる。DNA はホルマリンによる障害により、切断による断片化や Cytosine から Thymine への置換がおこることがいわれている²⁵。実際、ホルマリン固定までの時間、ホルマリン固定時間、ホルマリン濃度等で核酸の品質に違いがでるとされている。検体摘出後は、速やかに固定液に浸漬、固定し、固定前に 30 分以上室温で保持することは避けなければならない。また、直ちに固定の行えない場合には、冷蔵庫（4℃）で保管し、3 時間以内に固定を行うことが望ましいとされている。ホルマリンの固定時間が短く、固定不良の場合は DNA、RNA、タンパク質の品質を極端に低下させる。逆に、固定時間が長く過固定の場合もこれらの品質をそこなうため、3 日以内の固定をすることで良好な保持が期待できる。固定期間が 1 週間を超えることは好ましくない。ホルマリン濃度に関しては、DNA の遺伝子変異解析を行う場合には、10%ホルマリンを使うことが望ましいとされているが、一方で、RNA の解析においては、より十分な固定を行うことで RNase が完全に失活するため、20%ホルマリンを使用することが望ましいとされている²⁶。このように、固定方法、時間、薬品等で DNA の品質に影響が出るため、施設間においても DNA の品質に格差がみられることがある。このため、バイオバンクのような施設で一貫して生体試料を管理することも遺伝子医療を進めるうえで重要になってくると考えられる。

一方、凍結検体の問題点としては、HE 標本などで腫瘍の存在を確認していないこと、ならびに腫瘍の含有比率を確認していないことがあげられる。このため、検体内に腫瘍が存在していない可能性もある。また、腫瘍含有率が非常に少ない場合にも変異が検出されない、もしくは Variant

Frequency の cut off 値を下げれば解析しなければ変異が検出できない可能性が考えられる。

これら、FFPE 検体、凍結検体の問題点の解決策として、今回検体固定液として PAXgene Tissue system を用いた。PAXgene Tissue system で検体を固定しパラフィン包埋（PFPE）を作成することにより、凍結検体と同等の DNA の品質が得られ、さらには、HE 染色のほか免疫染色も FFPE からの標本と同等の精度で行うことが可能となる²⁷。

2. アンプリコンターゲットシーケンス遺伝子解析による druggable mutation の検出

Illumina Truseq Cancer Panel での遺伝子解析において Druggable mutation を認めた症例は 18 例中 5 例（27.8%）であり、EGFR に対する各種チロシンキナーゼ阻害剤、タグリッソ（オシメルチニブ）、PIK3CA に対する PIK3CA、AKT、mTOR 阻害剤、VHL に対する HIF-1 阻害剤が有効である可能性があった。EGFR 変異の中でも FF 10 症例に認めた *EGFR T790M* は、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤で治療後の再発癌に出現している獲得耐性遺伝子として知られており、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の結合部位に生じるため、薬剤の結合が低下し、下流シグナルが阻害されなくなり耐性化を起こすとされている。近年、この *EGFR T790M* をターゲットとしたオシメルチニブ（タグリッソ）が開発され有効性が示されている²⁸。*PIK3CA* 変異は、その下流の AKT、mTOR も活性化されることとなり、それらの阻害剤が有効な可能性がある。*VHL* は、von Hippel Lindau 病の原因遺伝子であり、がん抑制遺伝子として知られている。この、*VHL* に変異をおこし活性が低下すると、HIF-1 が亢進し VEGF の転写を誘導し腫瘍血管の増殖を促すことで腫瘍進展に関与するといわれており²⁹、HIF-1 阻害剤の有効性が期待されるが、現在のところ腎性貧血治療薬として開発が行われている段階である。

一方、Illumina Truseq Cancer Panel での NGS による遺伝子解析では Druggable mutation 検出頻度が非常に低いうえに、ドライバーとなるような遺伝子変異を確認できない症例を 6 例、変異自体確認できなかった症例を 1 例認めた。これらの原因としては、アンプリコンターゲットシーケンスの遺伝子数、シーケンス範囲が少なく変異が検出できなかった可能性や、塩基変異ではなく CNV や癒合遺伝子などが癌化に関与していた可能性などが考えられる。また、前述したように凍結検体では HE 標本で腫瘍

の存在を確認していないため、腫瘍が含まれてなかった可能性も考えられる。このような問題を解決するために CNV なども解析可能で遺伝子数が多く、シーケンス範囲も広いターゲットパネルを用い、さらに凍結検体も HE 標本を作製し腫瘍の存在を確認する必要があると考えられ、今回その解決のためアンプリコンターゲットシーケンスパネルとして GeneRead DNaseq Panel PCR Reagent V2 (Human Comprehensive Cancer Panel, Qiagen) を、検体固定液として前述の PAXgene Tissue system を使用した。GeneRead DNaseq Panel PCR Reagent V2 (Human Comprehensive Cancer Panel, Qiagen) を用いた遺伝子解析において druggable mutation は、30 例中 18 例 (60%) に認め、Illumina Truseq Cancer Panel と比較すると 3 倍以上の検出頻度であった。Druggable mutation としては、① PI3K/AKT/mTOR 関連遺伝子 ; *PIK3CA*, *ATK1*, *MTOR*, *FBXW7*, *PTEN* ②受容体型チロシンキナーゼ ; *EGFR*, *ERBB2*, *DDR2* ③遺伝子修復に関与する遺伝子 ; *BRCA1*, *ATM* ④クロマチンリモデリング関連遺伝子 ; *ARID1A* を認めた。*ERBB2* に関しては、大腸癌の約 5% で認められる HER2 増幅癌に対してではあるが、抗 HER2 療法 (トラスツマブ+ラパチニブ) の有効性が報告されている³⁰。*DDR2* は、リガンドであるコラーゲンと結合し、細胞接着、細胞増殖、細胞外基質の再構築などの役割を担う受容体型チロシンキナーゼであり、近年、基礎実験において肺扁平上皮癌や胃癌の腹膜播種において *DDR2* の変異例や欠損例にダサチニブが有効であるとの報告もあり^{31,32}、大腸癌に対しても有効性が期待される。*BRCA1* は、遺伝性乳癌の原因遺伝子としてよく知られているがん抑制遺伝子であるが、その *BRCA1* 変異遺伝性乳癌においては PARP 阻害剤 (オラパリブ) の有効性が示されている。ヒトの細胞には、細胞増殖のためのバックアップ機能が備わっているが、*BRCA1* が変異した癌細胞においてそのバックアップ機能を担っている PARP を阻害することで癌細胞が致死となる合成致死により効果を発揮すると考えられている³³。*ARID1A* に対しては、基礎実験の段階ではあるが *EZH2* 阻害剤の有効性が示されている³⁴。③の PI3K/AKT/mTOR 関連遺伝子に関しては後述する。

GeneRead DNaseq Targeted Panels V2 (Human Comprehensive Cancer Panel) を用いた解析においても、driver 変異や druggable mutation を認めない症例が存在した。160 遺伝子以外にそのような変異を生じている可能性もあるが、CNV などが関与している可能性も考えられる。このため今回、CNV の解析もおこなった (Fig12, Fig13) 。Amplification においては、既知の報告通り *KRAS* wild type、*BRAF* wild

type の症例群で多く認めた。*KRAS*、*BRAF* 変異例では、CNV は少ないとされている⁸。しかし、LOH の解析においては Amplification と同様の傾向は認められず、ランダムに多数の LOH を認め、データの信頼性が不明であった。その原因としては、LOH の解析の難しさにあると考えられる。増幅は、数倍から数十倍まで差があるが、LOH はその幅が少ないため差が出にくいと考えられる。また、今回レファレンスとして 3 症例の正常部の DNA を使用したが、全症例の正常部と腫瘍部の DNA で対比させなければ CNV の解析においては十分な信頼性が得られない可能性もある。今回の CNV の解析に関しては、課題が残った。

3. MAPK 関連遺伝子変異と mTOR 関連遺伝子変異の重複遺伝子変異症例

今回、MAPK 経路関連遺伝子と mTOR 経路関連遺伝子の重複遺伝子変異群では、予後が不良であるという結果を得た。一方で、MAPK mt + mTOR wt 群においては、非常に予後が良好である傾向がみられた。このことから、MAPK 経路と mTOR 経路の遺伝子変異が組み合わせられることで、癌の悪性度が増し、予後不良となったと考えられる。それには、MAPK 経路と mTOR 経路の相互間作用による癌増殖の亢進が生じたのではないかと考えられるが、MAPK 経路と mTOR 経路との相互関係については、様々な相互間の関与が報告されており、複雑である³⁵。MAPK 経路から mTOR 経路に対しては、RAS が p85 サブユニットを介さず直接的に PI3K を活性化させることが言われている³⁶。また、ERK は、AKT によるリン酸化とは違う場所で TSC2 をリン酸化させる。そのことで、mTORC1 の活性化を引き起こす³⁷。これら 2 つの経路の遺伝子変異の重複による予後への影響に関しては、抗 EGFR の効果予測 biomarker 検索目的の retrospective な 2 つの論文において、*KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* の 3 つの遺伝子のコンビネーション症例で予後が不良であるとの報告がある^{19,38}。この 2 つの論文では、サンガーシーケンスによる特定の領域の *PIK3CA* の変異のみの検討であるが、今回我々の検討では、*PIK3CA* のみでなく mTOR の活性化を生じるであろう *AKT1*、*PTEN*、*FBXW7*、*MTOR*、*ARID1A* の変異も含んでいる。とくに、*FBXW7* に関しては、今回の検討で *PIK3CA* 変異と重複している症例はなく、上記 2 論文では含まれないであろう症例が今回の検討では含まれていることになる。*FBXW7* は、遺伝子変異などを起こすことにより活性低下を引き起こし、それにより mTOR が活性化すると考えられている³⁹。大腸癌においては、*FBXW7* の発現低

下症例では予後が不良であるとの報告もされている⁴⁰。*KRAS*と*FBXW7*の相互間作用に関する報告は認められないが、この2つの遺伝子変異がペアになっていることが多いとの報告もあり⁴¹、何らかの相互間作用があるものと予想される。

臨床病理学的解析からMAPKmt+mTORmtは、右側結腸に多い傾向がみられた。最近、右側結腸の予後が不良であることが多く報告されているが⁴²、今回の結果から、MAPK mt + mTOR mt例が右側に多いことも予後が不良となっていることに関係があるものと考えられる。既知の報告では、*BRAF*、*RAS*変異例は、右側に多いと報告されており⁴³、今回の検討においても、*BRAF*変異例は3例中2例（66.7%）が右側であった。しかし、*KRAS*変異例においてはMAPK mt + mTOR mt群の*KRAS*変異例6例中、右側が3例（50%）と多かったが、MAPK mt + mTOR wt群での*KRAS*変異例では、6例すべてが左側であった。このことから、同じ*KRAS*変異症例であっても、MAPK mt + mTOR mtとMAPK mt + mTOR wtでは、予後も発生部位もまったく異なっており、別のgenotypeであると考えられた。また、*PIK3CA*変異例でも右側に多いという報告もあるが⁴⁴、今回の検討では、*PIK3CA*変異例4例中1例（25%）のみが右側との結果であり、症例数が少ないので一概には言えないが右側に多い傾向は認められなかった。

現時点においては、*RAS*変異群を標的とした分子標的治療法が確立していない状況である。このため、*RAS*変異群に対して選択的に効果が期待できる治療法の開発がすすめられている。その1つに*RAS*のさらに下流のMEK阻害剤の使用が検討されているが、MEK阻害のみでは大腸癌への効果は期待されるほど認められなかった⁴⁵。その原因としては①*KRAS*遺伝子の増幅、②Wntシグナルの発現上昇、③*PIK3CA*変異の併存などがあると考えられている⁴⁶。また、MEK阻害によるフィードバックによるEGFRの亢進もいわれており、抗EGFR抗体薬+MEK阻害剤の併用療法が効果があるとの基礎研究の報告がある⁴⁷。ただ、上記③のように*RAS*変異のみでなく重複する遺伝子変異の存在の考慮も必要と考えられる。このため、*KRAS*、*PIK3CA*の重複変異癌に対するMEKとPI3K（or AKT or mTOR）のダブル阻害により効果があるとの基礎研究の報告があり⁴⁸、臨床試験においてもMAPK経路、mTOR経路両方が亢進している症例に、両経路のダブルで阻害剤を投与した症例で効果をみとめた（単剤では全例効果なし）との報告もある⁴⁹。今後、分子標的薬の併用療法の開発が期待され、今回の検討で明らかとなったgenotypeのMAPK mt + mTOR

mt が、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た。また、その多重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る。

4. 今回の研究から考えられる今後の大腸癌に対する precision medicine (個別化医療)

今回の解析結果から、今後の大腸癌に対する NGS を用いた分子標的治療の可能性をフローチャート Fig 14 に示した。*KRAS/BRAF* 遺伝子変異症例に対しては、重複する druggable mutation が認められた場合には、その分子の標的薬と MEK 阻害剤の併用療法の開発が今後期待される。mTOR 関連遺伝子変異のみでなく、その他の druggable mutation に対しても併用療法の可能性を期待したい。重複がない症例に関しては現状の抗 VEGFR 抗体薬の使用が妥当と考えられる。また、変異数がおおく MSI-high と考えられる症例に関しては、抗 PD-1,PD-L1 抗体の有効性が期待される。実際の大腸癌の個別化医療においては、現状の分子標的薬と NGS の結果から導かれた分子標的薬の既知の報告からその薬剤の効果、副作用を評価し、最適なものを選択し治療法として提示することが必要と考えられる。

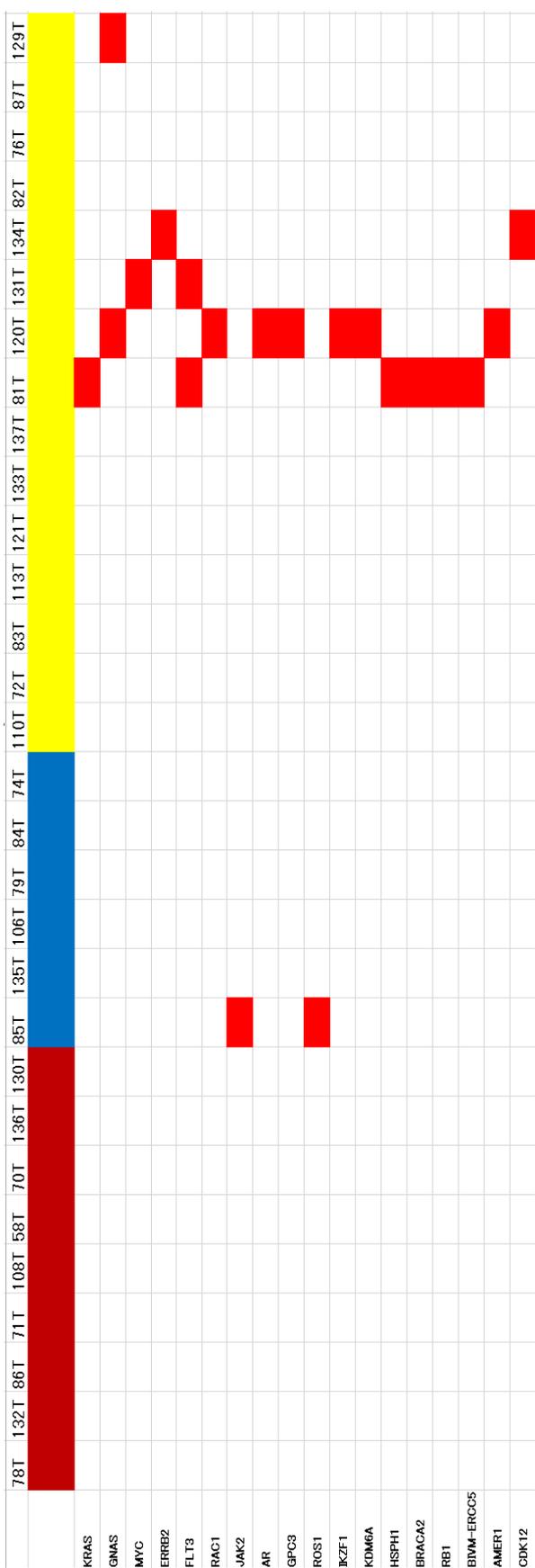


Fig 12. CNV 解析結果 (Amplification) : KRAS、BRAF 野生型症例に多く CNV の Amplification を認めた。

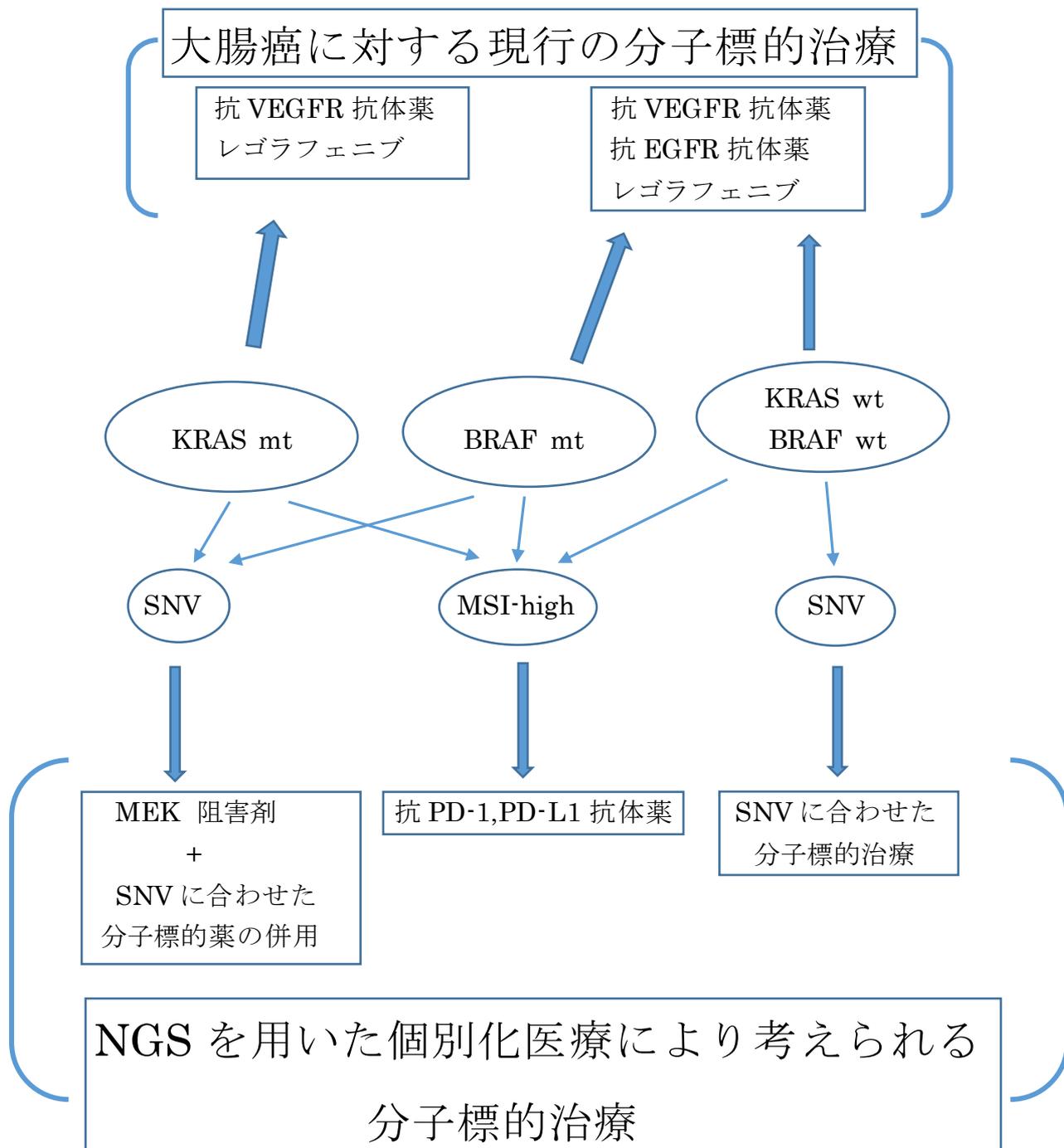


Fig 14. 大腸癌に対する分子標的治療のフローチャート：NGS を用いることにより、現行の治療に加えて、KRAS、BRAF 変異型大腸癌に対しては、MEK 阻害剤+SNV に合わせた分子標的薬の併用療法が有効である可能性があると考えられる。

総括および結論

今回の研究において得られた新知見は以下の通りである。

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、大腸癌に対して良好な druggable mutation の検出率を得ることができた。
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。

以上の新知見より、Amplicon Targeted Sequence Panel を用いた NGS による遺伝子変異解析が、大腸癌に対して臨床応用する上で、十分な druggable mutation の検出率が得られると考えられた。今後、さらに遺伝子解析が進むことにより疾患ごとのパネルが作成できるようになれば、さらに効率的に druggable mutation の検出が行えると考えられる。検出された遺伝子変異から考えられる治療薬の癌に対する実際の有効性に関しては、basket 試験や umbrella 試験などの臨床試験の結果を待つ必要があると考えられる。また、*KRAS* もしくは *BRAF* 変異と *PIK3CA/AKT/mTOR* 関連遺伝子の重複変異の genotype が、今後の大腸癌に対する precision medicine の 1 つの指標になる可能性があると考えられ、このような genotype に対する分子標的薬の併用療法の開発も期待される。ただ、今回の研究においては CNV の解析に課題があり、解析方法を確立する必要があると考えられた。今後は、免疫染色や遺伝子発現解析等に NGS による遺伝子変異解析を組み合わせ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。

謝辞

稿を終えるにあたり本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究科病理学講座腫瘍病理学分野 田中伸哉教授に深く感謝いたします。

研究において直接ご指導いただいた、国立病院機構北海道がんセンターゲノム医療センター 西原広史先生に心から感謝いたします。

最後に、本研究を支えてくださった腫瘍病理学分野の皆様にご心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1 Cancer Registry and Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan. Accessed 22 August 2016. Available from: http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html [in Japanese].
- 2 Saltz, L. B. *et al.* Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2013-2019, (2008).
- 3 Van Cutsem, E. *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1408-1417, (2009).
- 4 Folprecht, G. *et al.* Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology* **11**, 38-47, (2010).
- 5 Budinska, E. *et al.* Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J. Pathol.* **231**, 63-76, (2013).
- 6 Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330-337, (2012).
- 7 De Sousa, E. M. F. *et al.* Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat. Med.* **19**, 614-618, (2013).
- 8 Guinney, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* **21**, 1350-1356, (2015).
- 9 Roepman, P. *et al.* Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int. J. Cancer* **134**, 552-562, (2014).
- 10 Sadanandam, A. *et al.* A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat. Med.* **19**, 619-625, (2013).

- 11 Schlicker, A. *et al.* Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med. Genomics* **5**, 66, (2012).
- 12 Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509-2520, (2015).
- 13 Araki, K. *et al.* Pharmacogenetic impact of polymorphisms in the coding region of the UGT1A1 gene on SN-38 glucuronidation in Japanese patients with cancer. *Cancer Sci.* **97**, 1255-1259, (2006).
- 14 Han, J. Y. *et al.* Comprehensive analysis of UGT1A polymorphisms predictive for pharmacokinetics and treatment outcome in patients with non-small-cell lung cancer treated with irinotecan and cisplatin. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2237-2244, (2006).
- 15 Innocenti, F. *et al.* Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J. Clin. Oncol.* **22**, 1382-1388, (2004).
- 16 Iyer, L. *et al.* UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* **2**, 43-47 (2002).
- 17 Bokemeyer, C. *et al.* Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann. Oncol.* **22**, 1535-1546, (2011).
- 18 De Roock, W. *et al.* Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* **11**, 753-762, (2010).
- 19 Tol, J. *et al.* Markers for EGFR pathway activation as predictor of outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with or without cetuximab. *Eur. J. Cancer* **46**, 1997-2009, (2010).
- 20 Andreyev, H. J. *et al.* Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br. J. Cancer* **85**, 692-696, (2001).

- 21 Blons, H. *et al.* Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Ann. Oncol.* **25**, 2378-2385, (2014).
- 22 Ledford, H. Cancer: The Ras renaissance. *Nature* **520**, 278-280, (2015).
- 23 Kopetz, S. *et al.* PLX4032 in metastatic colorectal cancer patients with mutant BRAF tumors. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 3534-3534, (2010).
- 24 Smith, G. *et al.* Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine. *Br. J. Cancer* **102**, 693-703, (2010).
- 25 Do, H. & Dobrovic, A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin. Chem.* **61**, 64-71, (2015).
- 26 ゲノム研究用病理組織検体取り扱い規定
<http://pathology.or.jp/genome/index.html>.
- 27 Viertler, C. *et al.* A new technology for stabilization of biomolecules in tissues for combined histological and molecular analyses. *J. Mol. Diagn.* **14**, 458-466, (2012).
- 28 Goss, G. *et al.* Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **17**, 1643-1652, (2016).
- 29 Thelen, P. *et al.* Quantification by competitive quantitative RT-PCR of VEGF121 and VEGF165 in renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* **19**, 1563-1565 (1999).
- 30 Sartore-Bianchi, A. *et al.* Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 738-746, (2016).
- 31 Hammerman, P. S. *et al.* Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* **1**, 78-89, (2011).

- 32 Kurashige, J. *et al.* Integrated Molecular Profiling of Human Gastric Cancer Identifies DDR2 as a Potential Regulator of Peritoneal Dissemination. *Sci. Rep.* **6**, 22371, (2016).
- 33 Kaufman, B. *et al.* Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J. Clin. Oncol.* **33**, 244-250, (2015).
- 34 Bitler, B. G. *et al.* Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat. Med.* **21**, 231-238, (2015).
- 35 Britten, C. D. PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. *Cancer Chemother Pharmacol* **71**, 1395-1409, (2013).
- 36 Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature* **370**, 527-532 (1994).
- 37 Ma, L. *et al.* Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. *Cancer Res.* **67**, 7106-7112, (2007).
- 38 Ulivi, P. *et al.* Predictive role of multiple gene alterations in response to cetuximab in metastatic colorectal cancer: A single center study. *Journal of Translational Medicine* **10**, 87-87, (2012).
- 39 Cao, J., Ge, M. H. & Ling, Z. Q. Fbxw7 Tumor Suppressor: A Vital Regulator Contributes to Human Tumorigenesis. *Medicine (Baltimore)* **95**, e2496, (2016).
- 40 Iwatsuki, M. *et al.* Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance. *Int. J. Cancer* **126**, 1828-1837, (2010).
- 41 Jardim, D. L. *et al.* FBXW7 mutations in patients with advanced cancers: clinical and molecular characteristics and outcomes with mTOR inhibitors. *PLoS One* **9**, e89388, (2014).
- 42 Shen, H. *et al.* Different treatment strategies and molecular features between right-sided and left-sided colon cancers. *World J. Gastroenterol* **21**, 6470-6478, (2015).

- 43 Tong, J. H. *et al.* Characterization of rare transforming KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* **15**, 768-776, (2014).
- 44 Shen, Y. *et al.* Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: the genetic profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine. *PLoS One* **8**, e81628, (2013).
- 45 Bennouna, J. *et al.* A Phase II, open-label, randomised study to assess the efficacy and safety of the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) versus capecitabine monotherapy in patients with colorectal cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens. *Invest. New Drugs* **29**, 1021-1028, (2011).
- 46 Temraz, S., Mukherji, D. & Shamseddine, A. Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 22976-22988, (2015).
- 47 Misale, S. *et al.* Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra226, (2014).
- 48 E, J., Xing, J., Gong, H., He, J. & Zhang, W. Combine MEK inhibition with PI3K/mTOR inhibition exert inhibitory tumor growth effect on KRAS and PIK3CA mutation CRC xenografts due to reduced expression of VEGF and matrix metalloproteinase-9. *Tumour Biol.* **36**, 1091-1097, (2015).
- 49 Shimizu, T. *et al.* The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2316-2325, (2012).