

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 林 秀幸

学位論文題名

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)

【背景と目的】

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おらず、膵がんにおける遺伝子異常の検索は将来の個別化治療の実現に向けて極めて重要な課題となっている。膵臓がんにおいては *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。本研究では膵がん症例を対象に、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し、また治療戦略を検討する際の予後予測バイオマーカーを同定することを目的とし、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作成した。

【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。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 ヲ所の変異 hot spot を対象とした Cancer panel を用いて、次世代シーケンサーでターゲットシーケンスを行った。検出された変異に対し、サンガー法を用いたダイレクトシーケンスで validation し、統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。

【結果】

本シーケンスの 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。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。*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。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。次に主要 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 ヶ月 vs. 12.6 ヶ月, 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】

本研究における主要 4 ドライバー遺伝子の頻度は欧米から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。また膵がんの治療開発において、*KRAS* を標的とした治療戦略の重要性および予後予測バイオマーカーとしてのドライバー遺伝子異常検出の有用性が確認された。本研究の結果を実臨床で応用するにあたっては前向き試験での検証が望ましく、また、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事が考えられた。

【結語】

本研究によりターゲットシーケンス法を用いて検出した主要 4 ドライバー遺伝子 (*KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4*) 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が示された。膵がん治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期待される。