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 原田 一顕

学位論文題名

大腸癌の原発巣、転移巣及び FOLFOX 療法後の再発巣における
体細胞遺伝子変異の比較検討

(Comparative sequence analysis of patient-matched primary colorectal cancer,
metastatic, and recurrent metastatic tumors after adjuvant FOLFOX chemotherapy)

【背景と目的】近年、がんゲノム情報に基づいた大腸がん治療戦略の構築が加速しており、がん組織を用いた遺伝子変異解析は必須の検討項目となっている。しかし、治療経過中に全ての遺伝子変異が同一の状態では保持されているかは十分に検討されていない。大腸がんの術後補助化学療法に用いられる FOLFOX 療法は、5-FU、leucovorin、oxaliplatin からなる併用化学療法である。oxaliplatin は培養細胞実験系において、G>T/C>A、T>A/A>T を特徴としたトランスバージョン変異を誘導する変異原性が示されており、生体内でも大腸がんゲノムに修飾を加える可能性が考えられる。しかし、FOLFOX 療法による術後補助化学療法が大腸がん再発巣の遺伝子変異に与える影響について網羅的な解析を行った報告はなく、oxaliplatin が再発巣に新たな遺伝子変異を導入しているかは未だ不明である。新たな遺伝子変異が導入されているとすれば、再発巣のがんゲノム情報検索に、FOLFOX 療法前に採取されたがん組織は用いることができない可能性がある。患者への侵襲性から頻回ながん組織採取が困難である実地臨床現場において、いずれの時点のがん組織が適切であるかは、重要な検討課題である。さらに、がんゲノムの変化は治療反応性と関連している可能性があり、その詳細な検討は FOLFOX 療法の薬剤耐性機序の解明に有益な情報をもたらすと考えられる。今回我々は、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスにより、同一大腸がん症例の原発巣、転移巣、FOLFOX 療法後の再発巣が有する体細胞変異を検出・比較し、FOLFOX 療法が再発大腸がんゲノムに与える影響を検討した。

【対象と方法】国立がん研究センター東病院の診療録を用い、原発巣、転移巣及び FOLFOX 療法後に出現した再発巣、全ての組織検体が利用可能な症例を検索した。さらにホルマリン固定パラフィン包埋から抽出された DNA が 300 μ g 以上利用可能であった 4 症例を適格とした。4 症例の原発巣、転移巣及び再発巣に加え、がん部由来の体細胞変異を絞り込むためのコントロールとして正常大腸組織からも DNA を抽出し、Agilent technology 社のキットを用いてエクソン領域を濃縮した。Illumina 社の HiSeq2000 システムを用いて paired-end、マルチプレックスシーケンスを行った。がん組織より検出された遺伝子変異から、大規模データベースに報告された生殖細胞系列変異、同一症例の正常大腸組織から検出された遺伝子変異を除外し、がん部特異的な体細胞変異を特定した。原発巣、転移巣及び FOLFOX 療法による術後補助化学療法施行後の再発巣から検出された、体細胞変異数、

変異遺伝子、塩基置換パターン、コピー数変化を比較検討した。

【結果】原発巣よりも転移巣、転移巣よりも再発巣でより多くの体細胞変異が検出される傾向がみられたが、体細胞変異数に統計学的な有意差は見られなかった (Wilcoxon signed rank test $P > 0.05$)。原発巣、転移巣、再発巣から検出される体細胞変異の一塩基置換パターンを比較したところ、FOLFOX 療法後の再発巣の一塩基置換パターンは同一症例の原発巣及び転移巣と同一であり、oxaliplatin が導入すると考えられる C>A/G>T、T>A/A>T のトランスバージョン変異の増加は認められなかった。再発巣でのみ検出される遺伝子変異 (再発巣の unique 変異) に限定し、同一症例における原発巣、転移巣それぞれの unique 変異と比較し、白金製剤による遺伝子変異に特徴的な CpC/GpG 配列における C>A /G>T 変異が増加しているかを検討したが、有意差はみられなかった (Wilcoxon signed rank test、原発巣 vs 再発巣 $P=0.72$ 、転移巣 vs 再発巣 $P=0.42$)。原発巣、転移巣、再発巣のコピー数変化は FOLFOX 療法に関わらず同一症例で変化がみられなかった。大腸がん原発巣、転移巣及び再発巣から検出される体細胞変異遺伝子には相違がみられ、特に 4 症例中 1 症例では再発巣で検出される遺伝子変異の半数以上が原発巣および転移巣から検出されなかった。この症例では FOLFOX 前後で発がんドライバー遺伝子変異にも相違がみられ、原発巣、転移巣では *PIK3CA* E542K および E88Q 変異が検出された一方、再発巣では *AKT1* E17K 変異が検出された。FOLFOX 療法後に出現した再発巣に特有な遺伝子変異について Gene Ontology 解析を施行したところ、“calcium ion transport” をアノテーションに持つ遺伝子が有意に多く抽出された。

【考察】体細胞変異数、塩基置換パターン、コピー数変化の比較結果から、術後補助化学療法としての FOLFOX 療法は、再発大腸がんゲノムに新たな体細胞変異を誘導していないと考えられた。FOLFOX 療法による oxaliplatin の最高血中濃度(maximum drug concentration : Cmax)は $3.6 \mu\text{M}$ と報告されているが、これは培養細胞実験系で用いられた濃度(10-40 μM)に比して低値であり、oxaliplatin による遺伝子変異誘導がみられない一因と推察された。変異遺伝子の相違については、特に遺伝子変異の違いが顕著であった 1 症例でドライバー遺伝子変異が異なっていたことから、腫瘍を形成しているサブクローン自体が異なる可能性が示唆される。大腸がんでは腫瘍内不均一性が知られており、*PIK3CA* および *AKT1* の体細胞変異はともに PI3K/AKT/mTOR 経路を活性化する Mut-driver 遺伝子変異であることから収斂進化を反映している可能性がある。変異遺伝子の相違は腫瘍内不均一性と、化学療法によるクローン選択の結果であることが示唆された。また、Gene Ontology 解析の結果、FOLFOX 療法後に出現した再発巣に特有な遺伝子変異に “calcium ion transport” をアノテーションに持つ遺伝子が有意に多く抽出された。oxaliplatin の耐性機序の一つと考えられる P 糖蛋白質による多剤耐性 (P-glycoprotein mediated multi drug resistance : P-gp mediated MDR) は細胞内 Ca イオン濃度変化と関連が指摘されており、これらの遺伝子変異が FOLFOX 療法の耐性に関与している可能性が示唆された。

【結論】FOLFOX 療法による術後補助化学療法は、大腸がん再発巣に新たな体細胞遺伝子変異を導入しないことが明らかとなった。変異遺伝子の相違は FOLFOX 療法の耐性との関連が示唆され、今後更なる検討が期待される。