

助成番号 27-2-22

日本人メラノーマに特化した分子標的治療開発と予後改善を目指した 腫瘍ゲノム解析

札幌医科大学医学部 皮膚科学講座
澤田 匡秀

1. 諸言

メラノーマは皮膚がんによる死亡の約 40%を占める難病であり、その治療法の開発は喫緊の課題となっている。2018 年の世界保健機関 (WHO) 皮膚腫瘍分類では遺伝子異常に基づくメラノーマ分類が提案され、*BRAF*、*NRAS*、*NFI* やその他多数の遺伝子変異・融合遺伝子がドライバーとなることが示された。日本人のメラノーマは四肢末端や粘膜に生じることが多く、露光部や体幹部に好発する欧米人のメラノーマとは臨床像が異なる。そのため、日本人のメラノーマに特有の遺伝子異常を明らかにする必要があるが、日本ではこれまでに *BRAF*、*NRAS*、*KIT* の主要 3 遺伝子の変異率しか報告されておらず、半数近くの症例のドライバー変異が不明である¹⁾。

そこで、本研究は日本人のメラノーマにおけるゲノム異常の全貌を明らかにし、治療可能な変異 (actionable mutation) を検出して新規治療に結び付け、さらに分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の効果予測・予後予測に活用することを目的とした。メラノーマ診療の早期からがんゲノムプロファイリングを行うことにより、高度な個別化医療を実現し、皮膚がん死亡率の低下に貢献したい。

2. 方法

1) 検体の収集

本研究は、札幌医科大学医学部附属病院自主臨床研究審査委員会の承認を得た。メラノーマを有する患者からインフォームドコンセントを取得した後、腫瘍組織、正常組織 (末梢血または唾液) を収集し、核酸の抽出を行った。

2) パネルシーケンス解析

Ion Ampliseq Designer (Thermo Fisher scientific 社) を用いて、2020 年 4 月までにメラノーマに関して報告された重要な 95 種類の遺伝子 (世界保健機関皮膚腫瘍分類に記載された遺伝子のすべてを含む) を同時に解析できるパネルを開発した。Ion GeneStudio S5 を用

いてシーケンス解析を行った。VarScan2 ソフトウェアを用いて、腫瘍 DNA 中の体細胞変異（一塩基多型 [single nucleotide variant : SNV]、挿入・欠失 [indel]）を検出した。また、OncoCNV ソフトウェアを用いて、コピー数多型（copy number variant : CNV）を検出した。

3) RNA シーケンス解析

腫瘍組織から RNA を抽出し、TruSeq RNA Exome (Illumina 社) でエクソームキャプチャーを行ってライブラリーを作成し、NovaSeq6000 シーケンサーシステム (Illumina 社) でシーケンスを行った。融合遺伝子の検出には FuSeq ソフトウェアを用いた。

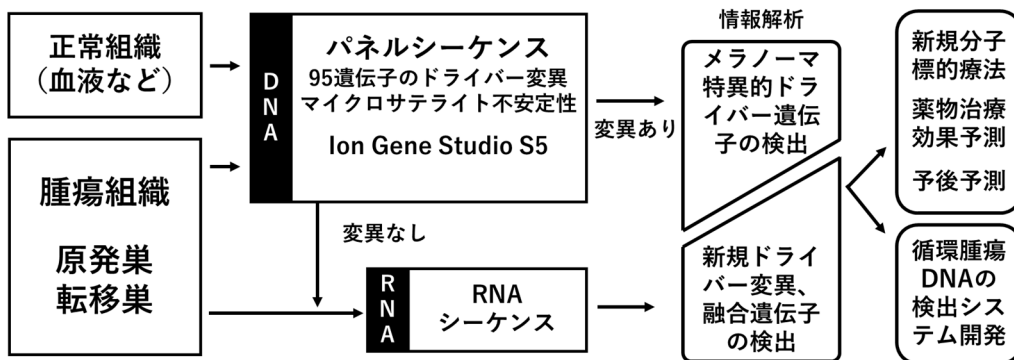


図1 解析のフロー

3.結果

69 人の日本人のメラノーマ患者が研究に登録し、そのうち 31 例のパネルシーケンス解析が終了した。31 例中、皮膚型は 10 例、末端型は 18 例、粘膜型は 3 例であった (図 2)。

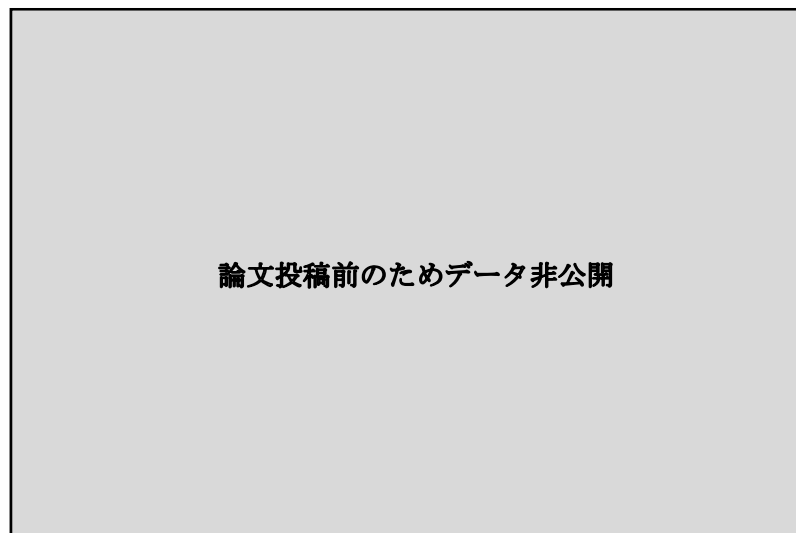


図2 パネルシーケンスで検出されたドライバー変異とコピー数多型

論文投稿前のためデータ非公開

4. 考察

今回、日本人の皮膚型メラノーマの70%に *BRAF* V600E 変異が検出された。この数値は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) が報告した皮膚型メラノーマの *BRAF* 変異率 (52%) より多い²⁾。症例数が少ないことによる可能性が高いが、人種差の影響による可能性もある。末端型と粘膜型のドライバー変異は皮膚型とまったくことなり、*KIT*、*NRAS*、*NF1* の変異頻度が高く、*BRAF* 変異率は低かった。また、皮膚型ではみられない *KRAS*、*TERT*、*RB1*、*RALY* などが検出され、多彩であった。

CNV に着目すると、末端型と粘膜型ではがん遺伝子 (*TERT*、*CDK4*、*MDM2*、*KIT* など) の増幅が多くみられたが、皮膚型ではまったくみられなかった。がん抑制遺伝子の CNV は型による偏りはなかったが、全型の傾向として、*CDKN2A*、*TP53* の欠失の頻度が高かった。

SNV、indel のドライバー変異が検出されなかった例は、全型のち7例 (23%) であった。CNV もドライバー変異に含めると、ドライバー変異非検出症例は3例 (10%) になる。これらの結果は、これまでの主要3遺伝子 (*BRAF*、*NRAS*、*KIT*) の変異頻度の報告¹⁾に比べて、多くのドライバー変異を検出したことを示している。特に日本人に多い末端型、粘膜型のゲノムプロファイリングには、われわれのカスタムパネルシーケンスが有用であることが示された。

Actionable mutation としては、現在本邦で使用可能な薬剤を考慮した場合、*BRAF* 10例 (32%)、*KIT* 5例 (16%) が検出された。研究段階・前臨床段階の薬剤も含めると、*NF1*、*KRAS*、*CDK4*、*CCND1* 変異なども治療標的になる可能性がある。

RNA 解析の結果、5例中1例に *SPRED1-DYNC1* 融合遺伝子が検出された。これは、がん抑制遺伝子である *SPRED1* が機能喪失している可能性を示唆する。通常メラノーマでドライバー変異となる融合遺伝子はキナーゼ活性を持つ遺伝子の機能獲得であるが、今回はそのような融合遺伝子は検出されなかった。RNA シーケンスについては、症例数を増やして検討する必要がある。

5. 結語

われわれが開発したカスタムパネルは特に日本人に多い末端型メラノーマ、粘膜型メラノーマのドライバー変異の検出に有用であった。このパネル解析をメラノーマ診療の早期に使用してゲノムプロファイリングを得ることで、より個別的な治療戦略を立てることができ、さらにリキッドバイオプシーなどに利用することで、治療効果判定や再発検出などに役立てることができる可能性がある。

6.文献

- 1) Sakaizawa K, Ashida A, Uchiyama A, et al. Clinical characteristics associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci.* 2015;80:33-37.
- 2) Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell.* 2015;161:1681-1696.