



Nagoya City University Academic Repository

| | |
|---------|--|
| 学位の種類 | 博士 (医学) |
| 報告番号 | 甲第1458号 |
| 学位記番号 | 第1044号 |
| 氏名 | 設樂 将之 |
| 授与年月日 | 平成 27年 3月 25日 |
| 学位論文の題名 | Genetic profiling of thymic carcinoma using targeted next-generation sequencing (次世代シーケンスによる胸腺癌の遺伝子プロファイリング) Lung Cancer, 86(2):174-179, November 2014 |
| 論文審査担当者 | 主査： 稲垣 宏 副査： 高橋 智, 竹山 廣光 |

【背景および目的】

胸腺癌は胸腺上皮より発生する稀な前縦隔悪性腫瘍である。その希少性のため大規模な研究・臨床試験が難しく、これまでは、*KIT*, *EGFR*, *Kras* 等の遺伝子についての報告が散見される程度で、分子生物学的な発癌機構がほとんど解明されていない。また手術による完全切除以外に有効な治療法がなく、進行症例や術後再発症例に対する効果的な治療法はなく予後は不良である。近年、次世代シーケンサーによる遺伝子解析法が開発され、これまでよりも容易に全エクソームシーケンスやターゲットシーケンスを行えるようになり、種々の悪性腫瘍で病態に関与する遺伝子の同定が進んでいる。今回我々は次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによって、胸腺癌の遺伝子変異を網羅的に解析し、病態に関与する遺伝子群の同定を試みた。

【材料と方法】

1992 年から 2013 年までに名古屋市立大学病院で手術を施行された胸腺扁平上皮癌 12 例を対象とした。DNA は凍結組織より抽出した。Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel を用いてライブラリーを作成した後、LifeTechnology 社の次世代シーケンサー(Ion PGM system)によって癌関連 409 遺伝子に対してターゲットシーケンスを行い、遺伝子変異の網羅的解析をおこなった。また、癌組織に特異的な変異を同定するために、対応する正常組織 10 例に対してもシーケンスを施行した。検出された変異については、QIAGEN 社の Ingenuity Variant Analysis を用いて重要な遺伝子変異のフィルタリングした後、正常組織のシーケンス結果と比較した。さらに SHIFT において Tolerated であるもの、PolyPhen-2 において Benign であるもの、PROVEAN において Neutral であるものは除外した。これらによって候補となる遺伝子変異を同定した。

【結果】

症例あたり平均 4,881,951 塩基のシーケンスを行い、average base coverage depth は 311、20× coverage は 96.6%、100× coverage は 86.3%であった。1 例あたり平均で 294 遺伝子から 1039 の variants が検出された。Ingenuity Variant Analysis、正常組織のシーケンス結果、SHIFT、PolyPhen-2、PROVEAN によってフィルタリングを行い、胸腺癌 10 例から 24 遺伝子中、25 の遺伝子変異が候補遺伝子変異として挙がってきた。これらは COSMIC と SNP Pubmed において Polymorphism ではないことを確認した。解析を行った 12 例に共通した遺伝子変異はなかったが、個々の症例において *KIT*, *DDR2*, *PDGFRA*, *ROS1*, *IGF1R* などのチロシンキナーゼ遺伝子に変異を認めた。*KIT* については exon 11 の 3 塩基欠失変異(c.1667_1669delTTG)を認め、サンガーシーケンスでも同変異を確認した。*HRAS* については D119H の変異を認めた。*NF1* に関しては、1 例は L1068W、1 例は E2612*の変異を認めた。

【考察】

KIT の exon 11 欠失変異は、GIST と胸腺癌において発癌原因遺伝子であることが報告されており、分子標的薬である Imatinib の感受性との関連も報告されている。腫瘍切除後の病理検査で胸腺扁平上皮癌、正岡Ⅱ期と診断された。術後の補助化学放射線療法を施行されたが、

肝転移再発を生じ、化学療法を受けたが亡くなられた。この症例に対して、*KIT* の *activating mutation* の存在が分かっているならば、*Imatinib* 等の分子標的薬の恩恵を受けられた可能性がある。また、肺扁平上皮癌において分子標的薬のターゲットの1つとされている *DDR2* の *splice site loss*、頭頸部の扁平上皮癌で報告されている *HRAS* といった遺伝子変異も同定した。複数の症例に共通する発癌候補遺伝子の変異は認めなかったことから、胸腺扁平上皮癌は *heterogeneous* な腫瘍であることが示唆された。今回の検討では、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによって、癌関連 409 遺伝子を調べている。他の遺伝子解析方法としては、全ての遺伝子変異解析が可能な全ゲノムシーケンスがあるが、*base coverage depth* の点ではターゲットシーケンスの方が優れていると思われる。今回胸腺扁平上皮癌において、複数症例に共通した発癌候補遺伝子変異の同定を期待し、ターゲットシーケンス解析を行ったが、発癌候補遺伝子が同定できなかった症例については、全ゲノムシーケンスによる解析を検討してもよいかもしれない。また検討した症例数が 12 例と限られているため、今後はさらなる症例の集積と、検出された遺伝子変異についての機能解析を行っていく予定である。

論文審査の結果の要旨

【論文の内容】胸腺癌は胸腺上皮より発生する稀な前縦隔悪性腫瘍である。その希少性のため大規模な研究・臨床試験が難しく、分子生物学的な発癌機構がほとんど解明されていない。また手術による完全切除以外に有効な治療法がなく、進行症例や術後再発症例に対する効果的な治療法はなく予後は不良である。本研究では次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによって、胸腺癌の遺伝子変異を網羅的に解析し、病態に関与する遺伝子群の同定を行った。

1992年から2013年までに名古屋市立大学病院で手術を施行された胸腺扁平上皮癌12例を対象とした。LifeTechnology社の次世代シーケンサー(Ion PGM system) Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panelによって癌関連409遺伝子に対してターゲットシーケンスを行い、遺伝子変異の網羅的解析をおこなった。また、癌組織に特異的な変異を同定するために、対応する正常組織10例に対してもシーケンスを施行した。検出された変異については、QIAGEN社のIngenuity Variant Analysisを用いて重要な遺伝子変異のフィルタリングした後、正常組織のシーケンス結果と比較した。さらにSHIFTにおいてToleratedであるもの、PolyPhen-2においてBenignであるもの、PROVEANにおいてNeutralであるものは除外した。これらによって病態に関与する可能性のある候補遺伝子変異を同定した。

症例あたり平均4,881,951塩基のシーケンスを行い、average base coverage depthは311、20× coverageは96.6%、100× coverageは86.3%であった。1例あたり平均で294遺伝子から1039のvariantsが検出された。Ingenuity Variant Analysis、正常組織のシーケンス結果、SHIFT、PolyPhen-2、PROVEANによってフィルタリングを行い、胸腺癌10例から24遺伝子中、25の遺伝子変異が候補遺伝子変異として挙がってきた。これらはCOSMICとSNP PubmedにおいてPolymorphismではないことを確認した。解析を行った12例に共通した遺伝子変異はなかったが、個々の症例において*KIT*、*DDR2*、*PDGFRA*、*ROS1*、*IGF1R*などのチロシンキナーゼ遺伝子に変異を認めた。*KIT*についてはexon 11の3塩基欠失変異(c.1667_1669delTTG)を認め、サンガーシーケンスでも同変異を確認した。*HRAS*についてはD119Hの変異を認めた。NF1に関しては、1例はL1068W、1例はE2612*の変異を認めた。

*KIT*のexon 11欠失変異は、GISTと胸腺癌において発癌原因遺伝子であることが報告されており、分子標的薬であるImatinibの感受性との関連も報告されている。また、肺扁平上皮癌において分子標的薬のターゲットの1つとされている*DDR2*のsplice site loss、頭頸部の扁平上皮癌で報告されている*HRAS*といった遺伝子変異も同定した。複数の症例に共通する発癌候補遺伝子の変異は認めなかったことから、胸腺扁平上皮癌はheterogeneousな腫瘍であることが示唆された。

【審査の内容】第1副査の高橋教授からは得られた結果のフィルターの方法について、c-KITの発現と遺伝子異常などについて10項目の質問、主査の稲垣からは、対立遺伝子における遺伝子異常の評価、正常コントロールとして使用した退縮胸腺における遺伝子異常についてなど8項目の質問があった。第2副査の竹山教授からは、肺癌や肺中皮腫の手術手技についてなど専門領域の質問があった。学位申請者はこれらの質問にほぼ満足できる回答をし、学位論文の主旨を十分理解していると判断された。

本研究では、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによって、胸腺扁平上皮癌について癌関連409遺伝子を調べ、*KIT*、*DDR2*、*HRAS*などの発癌に重要な役割を果たす遺伝子変異の同定に成功した。今後胸腺癌に対して分子標的治療の効果が期待できる可能性があることを示唆した。よって、本論文の著者には博士(医学)の学位を授与するに値すると判定した。

論文審査担当者 主査 稲垣 宏 副査 高橋 智 竹山 廣光