

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18713

研究課題名（和文）がんゲノムに基づく新たな卵巣がん薬剤感受性バイオマーカー探索

研究課題名（英文）The exploration of new biomarker for chemo-sensitivity of ovarian cancer based on cancer genome

研究代表者

高矢 寿光 (Takaya, Hisamitsu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60734689

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣高異型度漿液性癌(HGSOC)は、約半数で相同組換え修復(HRR)の異常(HRD)が認められる。HGSOCのゲノムデータを解析し、HGSOCでのHRDを定量化したHRDスコアのカットオフ値を63が妥当であること、HRDを引き起こすHRR関連遺伝子の変異・エピジェネティック変異、それぞれの変異の有無で予後が異なること、化学療法前後でHRDスコアが変化すること、HRDスコアとBRCA1/2遺伝子変異、LOHの有無との関連性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法前後でHRDスコアが減少するということは、化学療法によってHRDの形質を有する腫瘍細胞が減少したということであり、残存した腫瘍には化学療法耐性が存在し、その腫瘍はHR-proficient(HRP)であることを示唆する。また再発時にHRDスコアが上昇しており、HRPの腫瘍が再増殖するためにはHRDの形質を獲得する必要がある可能性がある。化学療法前後でBRCA1遺伝子のLOHの有無が変化していることより、HRPの腫瘍にBRCA1遺伝子のLOHが加わることで増殖能を獲得する可能性があり、今後のHGSOCの治療において新たなターゲットとなる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the genomic data of HGSOC and found that the cutoff value of HRD score, which quantifies HRD in HGSOC, is 63, and that mutations in HRR-related genes and epigenetic mutations, which cause HRD, have different prognoses. We also identified HRR-related gene mutations and epigenetic mutations that cause HRD, and found that the presence or absence of each mutation resulted in different prognoses. We also found that the HRD score changed before and after chemotherapy, and that the HRD score was associated with BRCA1/2 mutations and the presence of LOH.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 がんゲノム 相同組換え修復 化学療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣高異型度漿液性癌 (HGSOC) の大規模ゲノム解析により、様々な腫瘍ゲノムの特徴が明らかにされた。主な特徴として、遺伝子の相同組換修復の異常 (HRD)、*TP53* 遺伝子変異による染色体不安定性の促進が挙げられる。

HGSOC では約半数に *BRCA1*, *BRCA2* などの相同組換修復に関連する遺伝子の変異やエピジェネティック変異が認められている。HRD はプラチナ製剤による化学療法の感受性に関与すると報告されており、またポリ (ADP リボース) ポリメラーゼ (PARP) 阻害剤に対するバイオマーカーとしても報告されている。

腫瘍組織のゲノム解析により HRD をスコア化し、治療のバイオマーカーとする様々な手法が報告されているが、必ずしも薬剤感受性の良好な予測因子とはなり得ていない。

2. 研究の目的

(1) オープンソースのデータベースよりゲノムデータを収集し、HRD の癌種による違いと遺伝子変異、エピジェネティック変異との関連性を明らかにする。

(2) HGSOC の化学療法前後の腫瘍検体を用い、HRD の変化と HRD 関連遺伝子としての *BRCA1*, *BRCA2* 遺伝子変異の変化について検討する。

3. 研究の方法

(1) HGSOC および浸潤生乳がんについて、GDC Data Portal より、Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 のデータ、HT Human Genome U133 Array (Affymetrix) のデータ、臨床データを手に入れた。また、GDAC Firehose から Inginium HumanMethylation27 BeadChip (illumine) の processed data を入手した。正常サンプルと腫瘍サンプルがマッチング可能な症例を抽出し、SNP アレイデータを Affymetrix Power Tools, PennCNV を用いてプローブ毎の LogR ratio (LRR) と B-allele frequency (BAF) を解析し、R の ASCAT パッケージを用いてセグメント毎のコピー数データ、腫瘍含有率について解析した。HRD のスコア化は既報にある解析プログラムを用い、HRD スコアを計算した。相同組換え修復 (HRR) 関連遺伝子として、既報に基づき *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *ATR*, *BARD1*, *BLM*, *BRIP1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCI*, *FANCL*, *FANCM*, *MRE11*, *NBN*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RAD52*, *RAD54L*, *RPA1* を抽出し、cBioPortal を用いて *BRCA1/2* の生殖細胞変異、HRR 遺伝子の体細胞変異および HRD をもたらす可能性のある遺伝子変異として *EMSY* の増幅、*PTEN* の欠失、HR-proficient をもたらす遺伝子変異として *CCNE1* の増幅を同定した。また、*BRCA1*, *RAD51C*, *PTEN* についてはプロモーター領域のメチル化アレイデータと遺伝子発現データを用いて相関解析を行った。

(2) 当院で治療をした HGSOC 症例で、術前化学療法を行った症例で化学療法前の腫瘍検体が存在する 9 例を抽出し、化学療法前後の各 9 サンプル、再発時手術を行った 3 例の 3 サンプル、計 21 サンプルを抽出した。腫瘍の FFPE 標本を HE 染色し、標本中の腫瘍細胞が十分に存在する領域を確認し、腫瘍細胞部分を手動で抽出した。ゲノム DNA を抽出し、OncoScan FFPE Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて LRR, BAF データを解析し、R の ASCAT パッケージを用いてセグメントデータに変換し、HRD スコアを計算した。また、Chromosome Analysis Suite (Thermo Fisher Scientific) を用いて *BRCA1/2* 遺伝子領域の LOH について解析した。また、Oncomine BRCA Research Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いてライブラリーを作成し、Ion PGM system (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンスを実施し、*BRCA1/2* 遺伝子変異を解析した。

4. 研究成果

(1) HGSOC のデータセットを用い、生殖細胞系 *BRCA1/2* 変異 (gBRCAm) と体細胞系 *BRCA1/2* 変異 (sBRCAm) を有する症例について HRD スコアの分布を調べたところ、gBRCAm、sBRCAm を有する症例は有さない症例に比して、それぞれ $p < 0.0001$, $p = 0.0084$ で有意に HRD スコアが高かった。また、gBRCAm と sBRCAm を合わせて BRCAm としたところ、HRD スコア高値に BRCAm を有する症例が濃縮していた ($p < 0.0001$)。これまで、HRD スコアのカットオフ値として 42 以上が提唱されたが、カットオフ値を設定した研究では乳癌データセットと卵巣癌データセットを合わせて解析していた。そこで、乳癌の TCGA データセットを解析したところ、乳癌は全体的に HGSOC よりも HRD スコアが低い ($p < 0.0001$) もの、乳癌のみの解析で HRD スコア高値に BRCAm 症例が濃縮していた ($p < 0.0001$)。そして、卵巣癌データセットと乳癌データセットを合わせると、BRCAm 症例は 2 峰性の分布を示し、確かに HRD スコア 42 以

上にもカットオフがあるように見えたが、卵巣癌のみの解析では、HRD スコア 63 以上で *BRCAm* 症例が明瞭に濃縮しており、*BRCAm* の症例の比率は 38%(49/128)、42-62 では 10%(12/118)、41 以下では 10%(5/50)であり、42-62 では 41 以下に比して *BRCAm* 症例の濃縮がみられなかった。そして予後を解析すると、42-62 の群(n=211)と 41 以下の群(n=84) の生存曲線は重なっており、HRD score 63 以上の群(n=242)はそれらに比して明らかに生存率が良好であった(p<0.0001)。よって、以降の解析では HRD スコア 63 以上を HRD スコアのカットオフとした。*BRCAm* 以外の HRR 関連遺伝子の変異全体 (HRRm)と HRD スコアの関係について調べたところ、HRD スコアとの関連を認めず(p=0.58)、HRRm の有無で分けた場合、生存率の違いもなかった(p=0.78)。HRR 関連遺伝子変異を個別に調べると、*CHEK1* 欠失だけは有意に HRD スコア高値に濃縮していた(p=0.0038)。また、*PTEN* 欠失は統計的に有意に HRD スコア高値に濃縮していた(p=0.035)が、*EMSY* 増幅は HRD スコアとの相関を認めなかった。また、HR proficient な HGSOC を特徴づける遺伝子異常である *CCNE1* 増幅は、HRD スコア低値に著明に濃縮していた(p<0.0001)。

HRR 関連遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化について解析を行ったところ、*BRCA1* メチル化症例では、著明に HRD スコア高値に濃縮していた (p<0.0001)。同様に HRD に関与すると報告されている *RAD51C* のメチル化についても調べたところ、メチル化症例は、HRD スコア高値に濃縮していた(p=0.029)。また、他の HRR 関連遺伝子の中で、メチル化と遺伝子発現に逆相関が認められた *PTEN* メチル化症例は、HRD スコアが高かった(p=0.0022)。これらの情報を合わせて HRD 症例を、ジェネティックに HRD を来たしうる 6 因子; g*BRCA1m*, s*BRCA1m*, g*BRCA2m*, s*BRCA2m*, *CHEK1* 欠失, *PTEN* 欠失のいずれかを有する症例を HRD-genetic (HRD-G), それら以外で *BRCA1* メチル化, *RAD51C* メチル化, *PTEN* メチル化のいずれかを有する症例を HRD-epigenetic (HRD-E), それら以外を HRD-undetermined (HRD-U)とした。生存期間の情報が得られた 127 例でそれら 3 群の生存率をみると、HRD-G は予後良好、HRD-E は予後不良となり、有意な違いを認めた(p=0.0002)。非 HRD 症例を同様に分類したところ、生存率に有意差を認めなかった(p=0.39)。

(2) 自施設における HGSOC の 9 症例 21 検体を解析した。HRD スコアの化学療法前後、および再発時の変化について解析したところ、9 症例全例で化学療法後に HRD スコアが低下しており、HRD の形質をもつ腫瘍クローンが化学療法によって減少したことが示唆された。また、再発時に腫瘍摘出を行った 3 サンプルでは、化学療法後と比べて HRD スコアが再上昇しており、腫瘍の再増殖には染色体不安定性が必要な可能性が示唆された。次に、化学療法前後の 9 症例 18 検体について *BRCA1/2* 変異、*BRCA1/2* の LOH と HRD スコアとの関連について解析を行った。化学療法前の全 9 症例において *BRCA1* の LOH が認められ、4 症例で *BRCA1* の病的変異が認められた。*BRCA1* の病的変異が認められた症例は HRD スコアが 63 以上であった。化学療法後の検体では、4 症例で *BRCA1* の LOH が消失しており、これらの症例は HRD スコアが低値であった。*BRCA2* の LOH は化学療法前で 3 症例、化学療法後で 2 症例で認められたが、LOH が認められている症例でも HRD スコアが低値の症例があり、HRD スコアとの関連性は低いと考えられた。

本研究の結果は、HRD の腫瘍内不均一性を示唆しており、非 HRD 腫瘍クローンの解析を進めることで、HGSOC の新たな治療戦略が開発可能であり、さらに研究を進める必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaya Hisamitsu, Nakai Hidekatsu, Takamatsu Shiro, Mandai Masaki, Matsumura Noriomi	4. 巻 10
2. 論文標題 Homologous recombination deficiency status-based classification of high-grade serous ovarian carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59671-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takaya Hisamitsu, Nakai Hidekatsu, Sakai Kazuko, Nishio Kazuto, Murakami Kosuke, Mandai Masaki, Matsumura Noriomi	4. 巻 156
2. 論文標題 Intratumor heterogeneity and homologous recombination deficiency of high-grade serous ovarian cancer are associated with prognosis and molecular subtype and change in treatment course	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 415 ~ 422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygyno.2019.11.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hisamitsu Takaya, Hidekatsu Nakai, Kosuke Murakami, Noriomi Matsumura
2. 発表標題 Intratumor heterogeneity and homologous recombination deficiency of high grade serous ovarian cancer are associated with prognosis and molecular subtypes and change in treatment course
3. 学会等名 Advances in Ovarian Cancer Research（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高矢寿光, 中井英勝, 坂井和子, 西尾和人, 松村謙臣
2. 発表標題 卵巣高異型度漿液性癌のゲノム解析によるDNA修復機構の破綻および腫瘍内不均一性の解明
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高矢寿光, 中井英勝, 坂井和子, 西尾和人, 松村謙臣
2. 発表標題 DNA repair status and copy number alteration of high-grade serous ovarian cancer change in a treatment course
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hisamitsu Takaya, Hidekatsu Nakai, Ayako Suzuki, Yasushi Kotani, Kosuke Murakami, Tamaki Yahata, Masato Aoki, Chiho Miyagawa, Reona Shiro, Mamiko Ohta, Sayaka Kai, Noriomi Matsumura
2. 発表標題 Homologous recombination deficiency and copy number alteration varies in a course of treatment in high grade serous ovarian cancer
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------