

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19685

研究課題名(和文)メラノーマの腫瘍内および腫瘍間におけるBRAF変異の多様性の解析

研究課題名(英文)Analysis of intra- and intertumoral variety of BRAF mutation in Melanoma tumor.

研究代表者

境澤 香里 (SAKAIZAWA, Kaori)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20419352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：BRAFV600E変異を有する11例のメラノーマ原発巣について、腫瘍内部のBRAF変異細胞の分布についてdroplet digital PCR (ddPCR)を用いて解析した。さらに、そのうち9例について転移巣のBRAF変異を解析した。原発巣の変異率は18.5%～83.3%で、腫瘍内部の変異率の差は少なかった。転移巣のうち3例で変異率が0.02%～1.03%の低値であり、変異細胞がごく少数であることが示された。以上より、メラノーマの腫瘍は、BRAF変異型と野生型の細胞が比較的均一に様々な割合で混ざり合っている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：11 patients who had BRAFV600E-mutated primary lesions detected by Sanger sequencing were enrolled in this study. Further, resected metastatic lesions from 9 patients were also examined. BRAFV600E-mutated rate of primary lesions analyzed by droplet digital PCR (ddPCR) was from 18.5% to 83.3%, and the mutation rate was not varied in each lesion. 3 metastases had low mutation rate as 0.02 to 1.03%, that is, mutation cells were very rare in those metastatic tumors. These results suggest the possibility that BRAFV600E and BRAFwild melanoma cells do not exist ununiformly, but intermingle in a single melanoma tumor in various ratios.

研究分野：メラノーマ

キーワード：メラノーマ ddPCR法 BRAF変異率 部位別定量解析

## 1. 研究開始当初の背景

近年、進行期メラノーマに対する治療は劇的に進歩し、免疫チェックポイント阻害薬や BRAF 阻害薬が本邦で使用可能となった。BRAF 阻害薬は BRAF 遺伝子変異を有する癌細胞に効果が限定される。そのため、治療開始前には個々の症例の BRAF 変異の有無の確認が不可欠である。さらに BRAF 阻害薬は使用数か月後に耐性が出現することが明らかとなり、その機序として新たな RAS、MEK 変異の出現や腫瘍細胞の heterogeneity が挙げられている。

メラノーマの BRAF 変異は以前より heterogeneity が指摘されており、我々も 100 例以上のメラノーマを解析し原発巣と転移巣で BRAF 変異の有無が異なる症例を認めている。さらに Circulating tumor cells (CTC) の解析においても切除組織と CTC で BRAF 変異の有無が異なる症例を認めており、メラノーマの腫瘍はいくつかの遺伝子変異のパターンを併せ持つ heterogenous な集団であることが強く示唆されている。従来の Sanger 法によるシーケンスでは、変異を同定する感度は 10~20%といわれている。このことは腫瘍細胞のうち変異を持つ細胞が 20%で、残りの 80%は変異がなかった場合であっても解析結果は変異を示すことを意味する。このような症例に BRAF 阻害剤を使用した場合、すぐに耐性を生じることが予想される。腫瘍が heterogenous な集団であると考えた場合に、画一的に解析する従来の方法は不適と言わざるを得ない。原発巣や転移巣といった腫瘍の集団の変異の割合を調べることで、個々の症例の特徴を見出すことができないかと考え、本研究の発想に至った。

## 2. 研究の目的

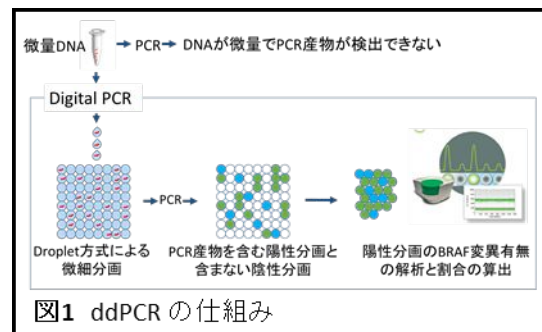
Sanger 法にて BRAF<sup>V600E</sup> 変異を検出したメラノーマ原発巣の BRAF<sup>V600E</sup> 変異の割合を、droplet digital PCR (ddPCR) を用いて測定する。その際に腫瘍内部に変異の割合の偏り

があるのかを明らかにするために、ごく小さな部位別に同一腫瘍内から組織を数か所ずつ取り出して解析する。更に、同一症例の転移巣について、BRAF<sup>V600E</sup> 変異の有無を解析し、病勢の進展と変異の割合の変化について検討する。

## 3. 研究の方法

Sanger 法にて BRAF<sup>V600E</sup> 変異を検出したメラノーマ原発巣のうち、原発病変内で部位別に DNA を抽出可能な比較的大型の病変である症例を選別する。

原発巣の腫瘍内部を 2~3 か所 laser microdissection 法で切り出す。この際、切り出す病変部は腫瘍細胞で占められ、炎症細胞や間質組織の少ない部分を厳選する。切り出した組織から DNA を抽出し、ddPCR を用いて BRAF 変異の割合を解析する。ddPCR は DNA を数万の液滴にする droplet 方式を取り、その微細分画内で PCR 反応を行うため、きわめて微量の DNA の定量解析が可能である(図1)。



さらに、同一症例の転移巣について、BRAF 変異の有無を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 条件に当てはまる症例を期間中 11 例解析した。原発巣の大型な 9 症例は 3 か所、比較的小型な 2 例は 2 か所を部位別に切り出した(図2)。

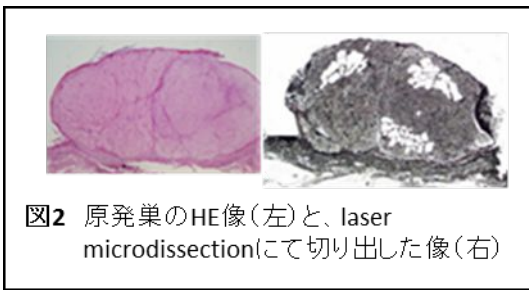


図2 原発巣のHE像(左)と、laser microdissection(にて切り出した像(右))

(2) それぞれの切り出し部は3枚の連続切片より切除し、平均値を算出した。Sanger法で  $BRAF^{V600E}$  変異を有した11例の  $BRAF$  変異率は18.5~83.3%の幅を認めたと、各々の同一病変内の変異率は有意差に乏しかった(図3)。

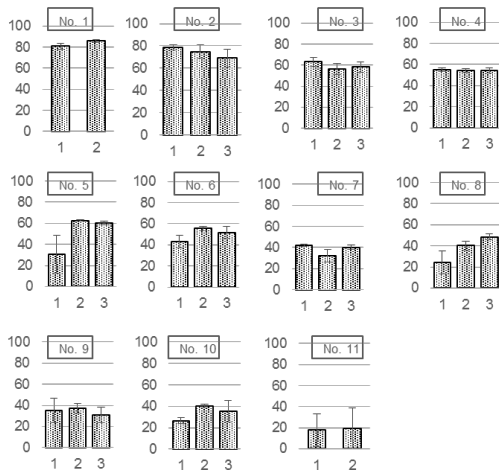


図3 11例の部位別  $BRAF^{V600E}$  変異率(%)

(3)  $BRAF$  変異率の割合の差がメラノーマ細胞の含有率の差によるものではないことを MART-1 免疫染色にて確認した。切除部位の全細胞中、MART-1 陽性細胞の割合について ImageJ を用いて算出し、11例の平均値は92.9%だった。すべての症例で切除部位に炎症細胞や間質組織の混入が乏しいことが示された。

(4) 11例のうち、切除された転移巣をもつ症例は9例あり、そのすべての  $BRAF$  変異の有無を Sanger 法で解析した。3例は  $BRAF$  変異を検出できなかったため、ddPCR で定量解析をおこなった。3例の原発巣の変異割合の平均値は74.1%、34.4%、18.5%で、転移巣の変異割合は1.28%、0.19%、0.02%だった。原発巣の変異割合が高値であっても転移巣では割合が微量になる症例があることが示された。

これらの結果から以下のことが示された。

- ・メラノーマの原発巣では、 $BRAF$  変異細胞と変異のない細胞が様々な割合で、比較的均一に混ざり合っている(図4)。

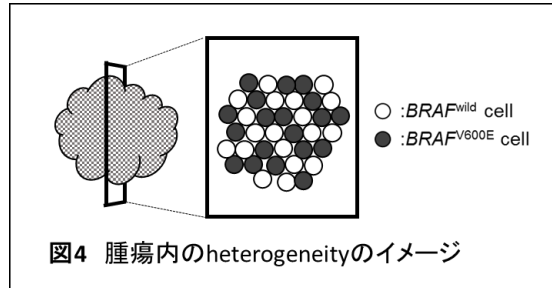


図4 腫瘍内のheterogeneityのイメージ

- ・同一個体の腫瘍病変ごとの変異割合が様々であるため、変異細胞が微量しか含まれない場合は解析機器の感度によっては  $BRAF$  変異が検出できない。メラノーマの原発巣と転移巣で  $BRAF$  変異の有無 ( $BRAF$  status) が異なるのは検査方法の感度に依存する。

以上より、メラノーマの薬物治療の際は、腫瘍の  $BRAF$  status に着目するのみならず、個々の症例の  $BRAF$  変異の定量も治療効果の予測に重要であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Sakaizawa K, Ashida A, Uhara H and Okuyama R. Detection of  $BRAF^{V600K}$  mutant tumor-derived DNA in the pleural effusion from a patient with metastatic melanoma. Clin Chem Lab Med. 55: e92-e95, 2017 (査読有)

2. Ashida A, Sakaizawa K, Mikoshiba A, Uhara H and Okuyama R. Quantitative analysis of the  $BRAF^{V600E}$  mutation in circulating tumor-derived DNA in melanoma patients using competitive allele-specific TaqMan PCR. Int J Clin Oncol. 21: 981-988, 2016 (査読有)

3. Ashida A, Uhara H, Mikoshiba A, Sakaizawa K, Kumagai N, Koga H and Okuyama R. Melanoma with  $BRAF$  mutation in circulating cell-free DNA despite no mutation in the primary lesion: A case report. Acta Derm Venereol. 96: 128-129, 2016 (査読有)

4. Sakaizawa K, Ashida A, Uchiyama A, Ito T, Fujisawa Y, Ogata D, Matsushita S, Fujii K, Fukushima S, Shibayama Y, Hatta N, Takenouchi T, Uehara J, Okuyama R, Yamazaki N and Uhara H. Clinical

characteristics associated with BRAF, NRAS, KIT mutations in Japanese melanoma patients. J Dermatol Sci. 80: 33-37, 2015  
(査読有)

〔学会発表〕(計2件)

1. 境澤香里、芦田敦子、二瓶達也、佐藤美聡、御子柴育朋、小林 彩、三宅知美、宇原 久、奥山隆平．胸水中の cell-free DNA より *BRAF*<sup>V600K</sup> を検出できた進行期悪性黒色腫の一例 日本皮膚科学会東部支部学術大会 浜松 10.29-30, 2016

2. 境澤香里、芦田敦子、伊藤孝通、藤澤康弘、緒方 大、松下茂人、藤井一恭、福島 聡、柴山慶継、八田尚人、竹之内辰也、上原治朗、奥山隆平、山崎直也、宇原 久．日本人の悪性黒色腫の BRAF、NRAS、KIT 変異率と臨床所見 日本皮膚科学会総会 横浜 5.29-31, 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

境澤 香里 (SAKAIZAWA Kaori)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20419352