

令和元年6月10日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16873

研究課題名(和文) 卵巣癌のliquid biopsyによる新たなスクリーニング法の確立

研究課題名(英文) The establishment of new method of screening with liquid biopsy for ovarian cancer

研究代表者

高矢 寿光 (TAKAYA, Hisamitsu)

近畿大学・医学部・助教

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)：悪性腫瘍は様々なゲノム形質を有する細胞で構成されており、これを腫瘍内不均一性という。卵巣高異型度漿液性癌(HGSOC)は、約半数で相同組換え修復(HRR)という遺伝子修復機構に異常が認められる。HGSOCのゲノムデータを解析し、腫瘍内不均一性とHRRの異常を数値化して検討を行い、腫瘍内不均一性とHRR異常が予後と関連性があること、化学療法前後で腫瘍内不均一性が減少すること、そして治療の時系列でHRR異常のスコアが変化する場合があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内不均一性が化学療法前後で減少するという事は、減少したクローンに化学療法抵抗性の原因が存在することが示唆される。化学療法後のクローンの解析を進めることでHGSOCにおける化学療法抵抗性の原因を明らかにできる可能性がある。また、HRR異常は分子標的治療のバイオマーカーとなり得ることが報告されているが、必ずしも化学療法抵抗性とは関連しないことが示唆される結果であった。初回手術時の腫瘍検体の解析により、分子標的薬が有効と考えられる症例については術後の補助療法としての効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：The malignant tumor consists of cancer cells which have various genomic phenotype, that is called intratumor heterogeneity. Almost half of high grade serous ovarian cancer (HGSOC) have disfunction of homologous recombination repair which is one of DNA repair pathway. We have analyzed genomic data of HGSOC to quantify the degree of intratumor heterogeneity and homologous recombination repair deficiency (HRD). We have revealed that intratumor heterogeneity and HRD were associated with prognosis and intratumor heterogeneity was reduced after chemotherapy and HRD score changed throughout time course of treatment in some cases.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 ゲノム 腫瘍内不均一性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

卵巣高異型度漿液性癌 (HGSO) 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。

HGSO 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。HRD を予測する方法として腫瘍染色体のヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity; LOH) を数値化した方法が報告されており、PARP 阻害剤を用いた臨床試験にも用いられている。

HGSO は極めて高頻度に *TP53* 遺伝子変異を有することが明らかにされた。*TP53* 遺伝子は細胞周期の制御やアポトーシスに関与し、遺伝子変異により染色体不安定性が引き起こされる。染色体不安定性は腫瘍の発生および進化過程において性質の異なるサブクローン形成に強く関与し、腫瘍内不均一性を高めると考えられている。腫瘍内不均一性は治療抵抗性や腫瘍の再発、転移などに関与すると考えられている。

#### 2. 研究の目的

(1) オープンソースのデータベースより HRD および腫瘍内不均一性のスコア化手法を開発し、それぞれの性質における予後との関連性を検討する。

(2) HGSO の治療経過における HRD および腫瘍内不均一性について評価し、その変化について明らかにする。

#### 3. 研究の方法

(1) The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータベースより、HGSO の Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 のデータおよび GeneChip HT Human Genome U133A のデータを入手した。SNP アレイデータは R の rawcopy パッケージを用いて LogR ratio (LRR) と B-allele frequency (BAF) の segmentation データを出力した。LRR と BAF のデータを用いて、それぞれの segment におけるコピー数異常を有する細胞の割合を計算し、それを R の Mclust パッケージを用いてベイズ情報量基準が最小となるクラスター数を clonality index (CI) とした。LOH の数値化は、SNP アレイデータを Affymetrix power tools, PennCNV を用いてプローブ毎の LRR データと BAF データを解析し、R の ASCAT パッケージを用いて LOH 領域を計算した。その中で、15MB 以上の長さを持つ LOH 領域を抽出し、その和の全ゲノム長に対する割合を LOH スコアとして算出した。遺伝子発現データは RMA normalization を行い、single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) を用いてサブタイプ分類を行った。また、パスウェイ解析を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて行った。

(2) 当院で治療をした HGSO 20 症例で、初回手術時の 20 サンプル、neo-adjuvant chemotherapy (NAC) 後の interval debulking surgery (IDS) 時の 4 サンプル、再発手術時の 9 サンプルの計 33 サンプルを解析した。腫瘍の FFPE 標本を HE 染色して標本中の腫瘍細胞が十分に存在する範囲を確認し、腫瘍部分を手動で FFPE 標本から抽出した。抽出した DNA は OncoScan FFPE Assay Kit を用いて LRR、BAF データを出力し、OncoClone Composition program を用いてクローン数の推定を行った。また、プローブ毎の LRR、BAF データを ASCAT パッケージで解析し、LOH スコアを計算した。

#### 4. 研究成果

(1) TCGA データベースより 573 サンプルの SNP アレイデータを入手し解析を行った。536 サンプルで CI の推定が可能であり、542 サンプルで LOH スコアが計算可能であった。2 つを合わせると 502 サンプルで CI、LOH スコアの双方が計算可能であり、以下、それらの 502 サンプルで解析を行った。CI の平均および標準偏差は  $3.53 \pm 1.95$ 、中央値は 3 であった。LOH スコアの平均、標準偏差は  $17.90 \pm 9.41$  だった。CI と LOH スコアの相関係数は -0.176 であり、軽度の負の相関が認められた。CI の中央値が 3 であることから、CI 2 以下を low CI 群、3 以上を high CI 群とした。CI での層別化による生存解析では、無病生存期間 (DFS) の中央値が low CI、high CI 群でそれぞれ 19.3 月、11.6 月 ( $p < 0.001$ )、無増悪生存期間 (PFS) の中央値がそれぞれ 20.6 月、16.6 月 ( $p = 0.0097$ ) と low CI 群で有意に延長していたが、全生存期間 (OS) は low CI 群で 48.2 月、high CI 群で 44.5 月 ( $p = 0.419$ ) と有意差は認められなかった。LOH スコアのカットオフ値はガウス混合モデルにより 16 に設定し、LOH スコア 16 未満を low LOH 群、16 以上を high LOH 群とした。LOH での層別化による生存解析では、DFS、PFS、OS の中央値は high LOH 群と low LOH 群でそれぞれ、16.5 月 vs 11.0 月 ( $p < 0.001$ )、19.3 月 vs 16.3 月 ( $p = 0.0056$ )、50.0 月 vs 38.6 月 ( $p < 0.001$ ) と、high LOH 群が有意に予後良好であった。また、CI と LOH スコアの組み合わせでサンプルを 4 群 (high LOH/high-CI 群、high LOH/low CI 群、low LOH/high CI 群、low LOH/low CI 群) に層別化して生存解析を行った。High LOH/low CI

群は他の3群と比較して、DFSの中央値が23.7月 vs 13.2月, 11.2月, 10.2月 ( $p < 0.001$ ), PFSが22.6月 vs 16.8月, 16.6月, 15.0月 ( $p < 0.001$ ), OSが55.1月 vs 49.5月, 38.6月, 38.6月 ( $p < 0.001$ )と有意に延長していた。TCGAデータベースよりHGSO522サンプルの遺伝子発現データを入力し、CLOVAR gene setを用いたssGSEAによりmolecular subtypeを決定した。そして、CI, LOHスコア, molecular subtypeのデータを持つ454サンプルについて解析を行った。Molecular subtype毎のCIの平均値はDifferentiated, Immunoreactive, Mesenchymal, Proliferativeそれぞれ3.26, 3.69, 3.85, 3.52であり、最も予後不良のMesenchymal subtypeでCIが有意に高値であった( $p = 0.0403$ )。また、Molecular subtype毎のLOHスコアの平均値は17.5, 19.2, 17.3, 16.2であり、4群間の比較では統計学的な有意差は認められないものの、最も予後良好のImmunoreactive subtypeで高値の傾向を認めた( $p = 0.0762$ )。また、High CIとlow CI, high LOHとlow LOH, high LOH/low CIとその他の3種類の遺伝子発現量の比較を行い、IPAでのdownstream effect analysisを行った。その結果、high LOHおよびhigh LOH/low CI群では免疫細胞の活性化や遊走、接着といった機能の活性化が予測された。これまで様々な癌腫で腫瘍内不均一性が高くなると治療抵抗性となり予後不良となると報告されているが、卵巣癌単独で評価した報告は少ない。今回の研究では卵巣癌においても腫瘍内不均一性と予後が相関する可能性が示唆された。また、molecular subtypeの違いに腫瘍内不均一性、HRDがそれぞれ別に関与する可能性が示唆された。

(2) 自施設におけるHGSO522の20症例、33検体を解析した。いずれの検体も、腫瘍DNA含量は30%以上であった。化学療法前のサンプルにおいて、high CI (CI 3以上,  $n=7$ )群とlow CI (CI 2以下,  $n=13$ )群に分けると、OS, PFS, DFSとも、high CIの方が予後良好であった( $p$ 値はそれぞれ0.0385, 0.0351, 0.0423)。それら20例のうち4例で化学療法後のIDS時の腫瘍サンプルでの解析が可能であり、さらに3例は再発後の腫瘍サンプルでの解析が可能であった。この4例でCIの変化について検討すると、初回手術時のCIは3例で3, 1例で2であったが、IDS時のCIは4例全てで1に減少しており、さらに、再発時のCIは解析可能であった3例全てで上昇していた。すなわち化学療法前は腫瘍に複数のクローンが混在していたが、化学療法後には化学療法感受性クローンが減少するためクローン数が減少し、再発時には再度増加していることが示唆された。同様にLOHスコアの変化について検討すると、2例では初回手術時に比してIDS時にはLOHスコアの減少がわずかに認められ、2例では、IDS時にLOHスコアが大きく減少し、再発時に増加していた。IDSを行わず、初発時と再発時の腫瘍を比較した6例では、CIは4例で変化がなく、増加・減少が1例ずつ認められた。また、LOHスコアは5例で大きな変化がなく、1例のみ減少していた。GISTIC解析の結果、初発と再発ではcopy number variation (CNV)のパターンに大きな違いはないが、IDS時の腫瘍では8q24領域での増幅が認められた。これまで、NAC前後で腫瘍内不均一性の変化を調べた研究は、我々の知る限り、今回のものが初めてである。我々は、IDS施行時に残存している腫瘍ではCIが減少していることを見出した。これは、化学療法後には薬剤感受性の腫瘍クローンが消失し、抵抗性のクローンのみが残存していることをあらわしていると考えられる。また、2例において、化学療法後残存していた腫瘍でLOHスコアが著明に低下していた。これは、HRD statusの観点からのintratumor heterogeneityを示唆しており、non-HRD cloneが選択されて残存した可能性が考えられる。今回の検討ではNAC後の解析症例が4例と少ないため、今後症例数を増やして検討する必要がある。

本研究の結果は、化学療法後残存している腫瘍を調べることが、化学療法抵抗性のメカニズムを調べるために重要であることを示唆しており、今後、この観点からさらに大規模な研究が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Takaya H, Nakai H, Murakami K, Tobiume T, Suzuki A, Mandai M, Matsumura N, Efficacy of weekly administration of paclitaxel and carboplatin for advanced ovarian cancer patients with poor performance status, *Int J Clin Oncol*, 査読有, vol 23, 2018, 698-706

Takamatsu S, Murakami K, Takaya H, Tobiume T, Nakai H, Suzuki A, Mandai M, Matsumura N, Malignant psoas syndrome associated with gynecological malignancy: Three case reports and a review of the literature, *Mol Clin Oncol*, 査読有, vol 9, 2018, 82-86

高矢寿光, 松村謙臣, がんのクローン進化と腫瘍内不均一性, *日本臨床*, 査読無, 76巻増刊2, 2018, 305-310

〔学会発表〕(計7件)

Hisamitsu Takaya, Hidekatsu Nakai, Hanako Satou, Reona Shiro, Takuma Ohsuga, Sayaka Kai, Masato Aoki, Yoshie Yo, Kosuke Murakami, Yasushi Kotani, Ayako Suzuki, Noriomi Matsumura

Clonality and loss of heterozygosity are associated with prognosis and subtypes in high grade serous ovarian cancer

第71回日本産科婦人科学会学術講演会, 2019

Hisamitsu Takaya, Hidekatsu Nakai, Noriomi Matsumura

Oligoclonality following chemotherapy in high grade serous ovarian cancer

American College of Obstetricians and Gynecologists Annual Meeting, 2018

Hisamitsu Takaya, Hidekatsu Nakai, Kosuke Murakami, Yasushi Kotani, Ayako Suzuki, Masaki Mandai, Noriomi Matsumura

Chemotherapy induced oligoclonality and high clonality related with recurrence in high grade serous ovarian cancer

17<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 2018

高矢寿光, 中井英勝, 坂井和子, 西尾和人, 松村謙臣

Clonality and loss of heterozygosity are associated with prognosis and subtypes in high grade serous ovarian cancer

第77回日本癌学会学術総会, 2018年

高矢寿光, 坂井和子, 西尾和人, 松村謙臣

卵巣高悪性度漿液性腺癌では化学療法後にクローン数が減少する

第22回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2018年

高矢寿光, 中井英勝, 飛梅孝子, 鈴木彩子, 村上幸祐, 高松士朗, 島岡昌生, 葉宜慧, 青木稚人, 藤島理沙, 佐藤華子, 松村謙臣

Oligoclonality following chemotherapy in high grade serous ovarian cancer

第70回日本産科婦人科学会学術講演会, 2018年

高矢寿光, 中井英勝, 坂井和子, 西尾和人, 松村謙臣

卵巣高悪性度漿液性癌では化学療法後にクローン数が減少する

第76回日本癌学会学術総会, 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 松村 謙臣

ローマ字氏名: MATSUMURA noriomi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。