

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18754

研究課題名（和文）遺伝子解析による鼻副鼻腔悪性黒色腫新規治療標的分子の同定

研究課題名（英文）Targeted next-generation sequencing of patients with sinonasal mucosal melanomas for the identification of novel therapeutic targets

研究代表者

対馬 那由多（Tsushima, Nayuta）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50547643

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）：次世代シーケンサーを用いて鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫18例の遺伝子変異を解析した。NRAS変異を6例（33%）、CTNNB1変異を2例（11%）、BRAF変異を1例（5.6%）に認めた。遺伝子変異の有無による全生存率、無再発生存率、累積遠隔転移率に有意差を認めなかった（ $P = 0.79, 0.97, 0.96$ ）。NRAS変異の有無で比較した場合も全生存率、無再発生存率、累積遠隔転移率に有意差は見られなかったが（ $P = 0.90, 0.30, 0.55$ ）、NRAS変異例では生存率が低く、遠隔転移率が高い傾向が見られた。CTNNB1変異例では免疫組織化学染色でカテニンの核移行を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫では欧米と比べてNRAS変異とCTNNB1変異の頻度が高い可能性が示唆された。NRAS変異例は皮膚および粘膜悪性黒色腫で予後不良との報告があり、CTNNB1変異例では免疫チェックポイント阻害薬の有効性が低下する可能性があるとの報告されている。BRAF変異は頻度が低く、分子標的治療の対象となる症例は少ないと考えられた。NRAS変異が予後規定因子であれば、変異例では積極的に適切に治療強度を高めることが可能となりえる。また、CTNNB1変異がICIの治療抵抗性の原因となっているとすれば、治療方法選択の際に判断基準の1つとして用いることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed genetic mutations in 18 cases of sinonasal mucosal melanoma using next-generation sequencing. NRAS mutations were observed in 6 cases (33%), CTNNB1 mutations in 2 cases (11%), and BRAF mutation in 1 case (5.6%). There were no significant differences in overall survival, recurrence-free survival, or cumulative distant metastasis rates based on the presence of gene mutations ($P = 0.79, 0.97, 0.96$). Although there were no significant differences in overall survival, recurrence-free survival, or cumulative distant metastasis rates when comparing cases with and without NRAS mutations ($P = 0.90, 0.30, 0.55$), cases with NRAS mutations showed a tendency towards lower survival rates and higher distant metastasis rates. Immunohistochemical staining revealed nuclear translocation of β -catenin in cases with CTNNB1 mutations.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫 粘膜悪性黒色腫 NRAS CTNNB1 BRAF 遺伝子変異 次世代シーケンサー
カテニン

1. 研究開始当初の背景

鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫は再発や転移が多く予後不良である。現在の本邦及び UICC の分類では、その予後から進行度は III、IV のいずれかに該当し、全例が進行がんとして扱われる。特に遠隔転移が多く、その制御が予後改善に極めて重要である。

皮膚悪性黒色腫では 66% に BRAF 変異を認め、そのうち 80% は V600E 変異であると報告されている。BRAF V600 変異を認める皮膚悪性黒色腫に対する BRAF 阻害薬と MEK 阻害薬の併用は標準治療として確立している。また、根治切除後の再発リスクが高い患者に対しては術後補助療法として免疫チェックポイント阻害薬を投与することで予後の改善が確認されている。一方、鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫では少数症例での報告ではあるが、BRAF の変異が 0-6% とされ、皮膚原発悪性黒色腫に比べて BRAF 変異の頻度が低い。このことから、皮膚原発の悪性黒色腫と粘膜原発の悪性黒色腫では、遺伝子変異や遺伝子発現プロファイルが異なる可能性が考えられる。しかし、症例数が少ないことから鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫に対する遺伝子変異の報告は少数であり、日本人を対象とした報告は見られない。

2. 研究の目的

日本人の鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫における遺伝子変異を解析することで、生命予後や遠隔転移に關与するバイオマーカーを同定し、皮膚悪性黒色腫のように分子標的治療の対象となる変異が見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

当院で根治目的の手術治療を行った 18 例の鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫症例を対象とした。組織検体は原発巣の手術検体から採取した。ヘマトキシリンエオジン染色により腫瘍の割合が高い部位を同定し、ホルマリン固定パラフィン包埋切片から 10 μm の厚さで切り出しを行った。検体に占める腫瘍の割合が 90% 未満である場合はマクロダイセクション法により非腫瘍組織を除去し、DNA および RNA を抽出した。

next-generation sequencer (NGS)

遺伝子パネルとして The Ampliseq for Illumina Focus Panel (Illumina, San Diego, CA, USA) を用い、既知の固形腫瘍と關連する 52 種類の遺伝子変異について解析を行った。

シーケンス結果の解析

下記基準で有意な遺伝子変異を選択した。(1) バリエントの頻度が 10% 以上であること、(2) バリエント領域で 10x カバレッジ以上であること、(3) 同義置換ではないこと、(4) エクソンにおける変異であること、(5) Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) database に登録されている変異であること。遺伝子変異の機能的意義に関しては ClinVar を用いて評価した。

免疫組織化学染色

CTNNB1 変異を認めた場合、 β カテニンの免疫組織化学染色を行った。CTNNB1 遺伝子は β カテニンをコードし、変異により β カテニンの核移行が生じることが知られている。

統計学的解析

統計学的解析には JMP Pro 17.0.0 (SAS institute) を用い、遺伝子変異と臨床病理学的特徴の關連には Fisher の正確確率検定、カイ二乗検定、もしくは Wilcoxon 検定いずれか適切な方法により検討した。全生存率、無再発生存率、累積遠隔転移率の算出には Kaplan-Meier 法を用い、二群間の比較は log-rank 検定により行った。P 値が 0.05 未満の場合に有意差があると判定した。

4. 研究成果

遺伝子変異と臨床病理学的特徴

臨床病理学的特徴と NGS による遺伝子変異解析の結果を図 1 に示す。NRAS 変異を 6 例(33%)、CTNNB1 変異を 2 例 (11%)、BRAF 変異を 1 例 (5.6%) に認めた。遺伝子変異の有無において有意差を認めた項目はなかった。NRAS 変異の有無では年齢に有意差を認め (中央値 64.5 対 71、 $P=0.04$)、他の項目に有意差をみとめなかった。

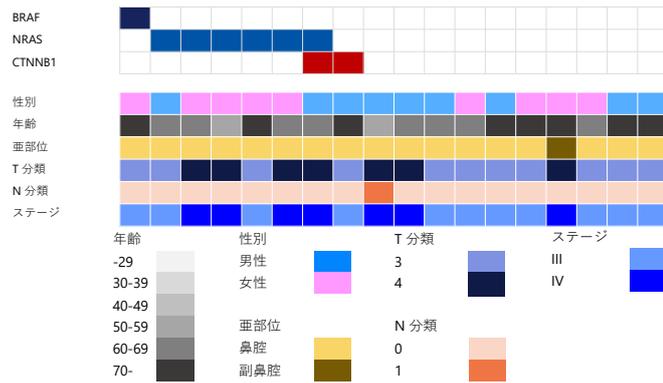


図 1. 遺伝子変異と臨床病理学的特徴

遺伝子変異と生存率および遠隔転移

遺伝子変異の有無による全生存率には差がなく、2年全生存率は変異無しでは 77%、変異有りでは 63%であった ($P=0.79$)。無再発生存率および累積遠隔転移率においても有意差は見られなかった ($P=0.97, 0.96$)。NRAS 変異の有無で比較した場合も全生存率、無再発生存率、累積遠隔転移率に有意差は見られなかった ($P=0.90, 0.30, 0.55$)。

免疫組織化学染色

2 例の CTNNB1 変異例に対してβカテニンの免疫組織化学染色を行った。いずれにおいてもβカテニンの核移行が確認され、ネガティブコントロールでは核移行が観察されなかった (図 2)。

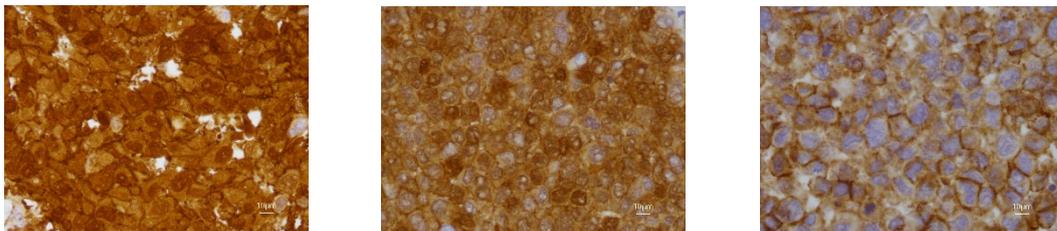


図 2. βカテニンによる免疫組織化学染色 (a, b=CTNNB 変異あり、c= ネガティブコントロール)

遺伝子変異と予後、治療に関して

NRAS 変異例が予後不良であったとの報告があり、本研究では生存解析において有意差は認めなかったが、NRAS 変異例では T4 症例が多く、生存率も低い傾向が見られた。NRAS 変異は本研究で最も頻度が高かったが、特異的な分子標的治療は確立していない。

CTNNB1 変異は進行した粘膜悪性黒色腫例において ICI に対する抵抗性を示すことが報告されている。βカテニンの免疫組織化学染色は NGS による CTNNB1 変異の同定と比較して安価であり、多くの施設で行うことができ、結果の判明も早い。

本研究では BRAF 変異は 1 例 (5.6%) に認めたが、BRAF K601R 変異は BRAF 阻害薬と MEK 阻害薬の併用による分子標的治療の対象とはならない。粘膜悪性黒色腫においては、BRAF V600 変異の頻度の低さから BRAF および MEK に対する分子標的治療の対象となる症例は稀であると考えられる。

本研究で確認された NRAS 変異と CTNNB1 変異はそれぞれ予後規定因子と ICI に対する抵抗性に関連する因子である可能性がある。NRAS 変異が予後規定因子であれば、変異が確認された際に積極的に補助薬物療法を行うなど、適切に治療強度を高めることが可能となりえる。また、CTNNB1 変異が ICI の治療抵抗性の原因となっているとすれば、治療方法選択の際に判断基準の 1 つとして用いることができると考えられる。その場合は免疫組織化学染色によるβカテニンの核移行検出により代用することで、より効率の良い検出も可能となりえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Tsushima Nayuta, Kano Satoshi, Suzuki Takayoshi, Idogawa Hiroshi, Yoshida Daisuke, Yasuda Koichi, Otsuka Manami, Aoyama Hidefumi, Homma Akihiro	4. 巻 279
2. 論文標題 Salvage surgery improves the treatment outcome of patients with residual/recurrent maxillary sinus cancer after superselective intra-arterial cisplatin infusion with concomitant radiation therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Archives of Oto-Rhino-Laryngology	6. 最初と最後の頁 899 ~ 905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00405-021-06822-5	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 -

1. 著者名 Tsushima Nayuta, Kano Satoshi, Yasuda Koichi, Suzuki Takayoshi, Hamada Seijiro, Nakamaru Yuji, Suzuki Masanobu, Uchinami Yusuke, Aoyama Hidefumi, Homma Akihiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Treatment outcomes of the patient with sinonasal mucosal melanoma: the role of endoscopic resection and postoperative radiotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1218 ~ 1226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-023-02368-0	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 -

1. 著者名 Tsushima Nayuta, Kano Satoshi, Hatanaka Kanako C., Suzuki Takayoshi, Hamada Seijiro, Idogawa Hiroshi, Nakamaru Yuji, Suzuki Masanobu, Hatanaka Yutaka, Homma Akihiro	4. 巻 51
2. 論文標題 Targeted next-generation sequencing of Japanese patients with sinonasal mucosal melanomas identifies frequent NRAS and CTNNB1 mutations	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 313 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2023.10.002	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 対馬 那由多
2. 発表標題 鼻副鼻腔悪性黒色腫根治治療例の検討
3. 学会等名 第31回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 対馬 那由多、加納 里志、鈴木 崇祥、浜田 誠二郎、本間 明宏
2. 発表標題 次世代シークエンサーによる鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第47回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naytuta Tsushima, Satoshi Kano, Takayoshi Suzuki, Seijiro Hamada, Koichi Yasuda, Hidefumi Aoyama, Akihiro Homma
2. 発表標題 Treatment outcome of endoscopic surgery and postoperative radiotherapy for sinonasal mucosal melanom
3. 学会等名 AHNS 11th International Conference on Head and Neck Cancer (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nayuta Tsushima, Satoshi Kano, Takatsugu Mizumachi, Takayoshi Suzuki, Akihiro Homma
2. 発表標題 Validity of endoscopic resection and postoperative radiation therapy for treatment of sinonasal malignant melanoma
3. 学会等名 International Congress of ORL-HNS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nayuta Tsushima, Satoshi Kano, Takayoshi Suzuki, Seijiro Hamada, Koichi Yasuda, Hidefumi Aoyama, Akihiro Homma
2. 発表標題 Treatment outcomes of sinonasal mucosal melanoma: usefulness of endoscopic surgery and postoperative radiotherapy
3. 学会等名 3rd International Congress of the Asian Oncology Society in conjunction with the 61st Annual Meeting of Japan Society of Clinical Oncology (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------