

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17323

研究課題名（和文）頭部血管肉腫の病態に迫る複層的な腫瘍ゲノム変異パターンの解析から治療戦略の構築へ

研究課題名（英文）Development of therapeutic strategies for angiosarcoma of the scalp and face based on genome-wide analysis of tumor somatic mutation pattern

研究代表者

内海 大介（UTSUMI, DAISUKE）

琉球大学・医学部・特命助教

研究者番号：40551958

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）：本研究では、頭部血管肉腫組織検体のエクソーム解析より、腫瘍ドライバー変異同定、腫瘍変異量定量、Mutational signature解析を試みた。9症例の永久標本からDNA抽出を行い、シーケンスを行ったが、8症例においてC>Tの置換の頻度が極めて高く、強いバイアスが観察された。これは、永久標本作成あるいは保管中に起こったアーチファクトと考えられ、これら8症例は解析には不適切と判断した。代替の解析方法とし癌パネルを用いた特定の癌関連遺伝子にフォーカスした解析を行うこととした。現在すでに8検体の癌パネルのシーケンスが終了している。特に腫瘍ドライバー変異の同定を目標にし、現在解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤は予後不良な頭部血管肉腫に対して有望な治療薬と期待される。その奏効率は遺伝子変異量定量に相関するとされ、本研究により頭部血管肉腫の遺伝子変異量の傾向を明らかにすることで、免疫チェックポイント阻害剤の有用性の予測が期待できる。腫瘍ドライバー遺伝子は低分子阻害剤や抗体医薬などの分子治療の標的となり得、その同定は治療法開発の重要な足掛かりとなる。頭部血管肉腫は沖縄県で多発する地域特異性の高い疾患であり、現在でもその罹患患者数は増加傾向にある。その疾患メカニズムの解明や候補治療薬の選定は、疾患の地域特異性の原因解明や、沖縄県の一つの医療課題の解決につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted tumor driver mutation identification, tumor mutation burden quantification, and mutational signature analysis based on exome analysis of head angiosarcoma tissue samples. The frequency of C>T substitutions was extremely high in 8 cases, and a strong bias was observed. This was considered to be an artifact that occurred during the preparation or storage of the formalin fixed paraffin embedded tissue samples, and these 8 cases were deemed unsuitable for analysis. As an alternative analysis method, we decided to focus on specific cancer-related genes using cancer panel sequencing. Currently, sequencing of 8 cancer panel samples has already been completed. The analysis is currently underway with the particular goal of identifying tumor driver mutations.

研究分野：皮膚科学

キーワード：頭部血管肉腫 エクソーム解析 免疫チェックポイント阻害剤 ドライバー変異 Mutational signature
e 次世代シーケンサー 遺伝子変異

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

頭部血管肉腫は、頭部に発症する脈管内皮細胞を発生母地とする稀な皮膚悪性腫瘍である。高齢者の頭皮に好発し、しばしば局所多発性に急速に進展拡大し、再発や肺転移を起こしやすい。治療効果の高い化学療法もなく、外科的手術や放射線療法によっても根治は困難であり、予後は極めて悪い。

沖縄県は頭部血管肉腫の好発地域であり、申請者達の疫学調査では、沖縄県内の過去 15 年間の年平均発症率は 4.3 人であった。140 万人程の県民人口より計算した沖縄県の発症率は、日本の他地域や海外と比較し、3~5 倍程度高い。琉球大学皮膚科における頭部血管肉腫患者の生存期間中央値は 403 日、5 年生存率は 9.6%と、ヒトの癌腫の中でも極めて予後不良な悪性腫瘍である。琉球大学でも近年の増加傾向があり、本邦でも今後はさらに増加することが予測される。近年、悪性黒色腫や非小細胞肺癌に対して、抗 PD-1 阻害薬、抗 CTLA-4 阻害薬などの免疫チェックポイント阻害剤が高い奏効率を示しており、頭部血管肉腫に対しても有望な治療薬となる可能性がある。さらに、頭部血管肉腫の好発地域である沖縄だけではなく、今後高齢化社会の進展により血管肉腫症例の増加が予想される状況においては、有効な新規治療薬開発の必要性も高い。しかし、治療薬開発に足掛かりとなる頭部血管肉腫の病態メカニズム解明は未だなされておらず、沖縄に多発する頭部血管肉腫発症原因の端緒を見出すことは琉球大学皮膚科の責務と考える。

沖縄県は他県と比較し紫外線量が高く、頭部血管肉腫発症要因の一つの可能性として紫外線に着目した。発癌要因により特徴的な **mutational signature** が誘導されることが知られており、悪性黒色腫で特徴的にみられる紫外線関連 **signature** が知られている。頭部血管肉腫の発症要因は大部分が未知であるが、血管肉腫において **mutational signature** 解析を行うことで、その発症要因の本態に迫ることが可能である。

頭部血管肉腫の有望な治療薬候補の一つとして免疫チェックポイント阻害剤があげられる。これまでに免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を治療前に予測するために様々なバイオマーカーが検討されており、その一つに腫瘍遺伝子変異量(TMB)が注目されている。TMB は癌細胞における遺伝子変異の総量を示す定量的バイオマーカーである。高 TMB の癌細胞は、免疫系に異物として抗原認識されるネオアンチゲン発現レベルが高く、免疫チェックポイント阻害剤の奏効率が上昇する。頭部血管肉腫もその TMB が高いことが予想される。有効な治療薬がない頭部血管肉腫において、免疫チェックポイント阻害剤は有望な治療薬となりえる。希少な頭部血管肉腫の TMB 定量についての報告はなく、検証の意義は高いと考える。

沖縄県は頭部血管肉腫の好発地域であり、その地理的特異性を活かした研究が可能であると考えられた。また、琉球大学皮膚科は県内の血管肉腫症例の集積する施設であり、効率的かつ集約的に症例の蓄積および解析が可能な優位性を有している。ゆえに沖縄県は頭部血管肉腫の発症原因を紐とく糸口が存在する土壌であると考えられる。

2. 研究の目的

頭部血管肉腫の発症機序や、沖縄県で特に多発する原因は明らかになっていない。仮説として、腫瘍形成に関与する感染性病原体の存在や、発症リスクを高める沖縄人ゲノム内の特有の遺伝的疾患感受性の存在、また沖縄における紫外線暴露などの要因が挙げられる。全エクソームシーケンス、全ゲノムシーケンスにより大規模な癌ゲノムの網羅的変異解析が可能になり、異なる癌

腫が特徴的な“mutational signature”をもつことが明らかとなっている。この mutational signature は 30 パターン以上に分類され、それぞれの signature は喫煙、紫外線暴露、加齢、相同組換え修復異常、DNA 複製校正異常、APOBEC3 ファミリーによる変異導入、アフラトキシン B1 暴露による発癌と関連する生物学的意義をもつとされる。沖縄県は他県と比較し紫外線照射量が極めて高く、紫外線暴露量の増加が沖縄県の頭部血管肉腫が好発するリスク要因となっている仮説が考えられるが、次世代シーケンサを用いた mutational signature 解析を行うことで、その仮説の検証を行う。さらに頭部血管肉腫に対する免疫チェックポイント阻害剤の有効性の予測、分子標的薬の治療ターゲットとなるドライバー変異の探索、腫瘍形成に関連する要因の検証を行う。これらを次世代シーケンサ解析により明らかにし、効果的治療法の導入と血管肉腫の腫瘍形成原因の解明に発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 検体およびデータの蓄積: 診断目的に生検された頭部血管

頭部血管肉腫組織 FFPE 標本からゲノム DNA を抽出しエクソームシーケンスを行う。解析に用いる検体数はこれまでに教室内に保存された凍結標本と新たに生検で得られる組織を併せて約 30 検体を予定している。

(2) 腫瘍遺伝子変異の抽出

腫瘍組織由来ゲノム DNA のバリエーションを検出し腫瘍に生じた遺伝子変異を検出する。シーケンスデータの解析は教室内に設置したサーバで実施し、教室内で完結させる。解析には NGS 解析パッケージである bcbio-nextgen を利用する。

(3) 遺伝子変異量解析

腫瘍に生じた遺伝子変異数を集計し、100 万塩基対あたりの腫瘍遺伝子変異量(TMB)を算出する。比較を行う他癌腫は 33 癌腫、約 10000 サンプル分のデータを格納する The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースから取得する。TMB について血管肉腫と他癌腫と比較することで、免疫チェックポイント阻害剤の奏効予測を行う。

(4) 腫瘍ドライバー変異探索

各腫瘍検体に共通する遺伝子変異から抽出する。頭部血管肉腫発生の直接的な原因となるドライバー変異と、関連の乏しいパッセンジャー変異を鑑別する必要がある。数多く検出される変異候補から絞り込みを行うために、関連遺伝子の遺伝子発現の評価を頭部血管肉腫と TCGA など取得した他癌腫の発現変動解析により行う。

(5) Mutational signature 解析

Mutational signature 解析では、体細胞変異が起きた塩基だけではなく、その直前、直後の塩基配列情報を加味することで、C>A、C>G、C>T、T>A、T>C、T>G の 6 種類の塩基置換パターンとその直前、直後の合計 3 塩基パターンを $6 \times 4 \times 4 = 96$ 種類に分類する。上記(2)で得られた変異情報をもとに、変異パターンの頻度を集計し mutational signature を検出する。解析には MuSiCa、Mutalisk、signeR などのオープンソースのツールを活用する。発癌プロセスにより特徴的な mutational signature が誘導されるとされ、血管肉腫がどの mutational signature に近似するかを評価する。

4. 研究成果

本研究では、頭部血管肉腫組織検体のエクソーム解析より、腫瘍ドライバー変異同定、腫瘍変異量定量、Mutational signature 解析を試みた。9 症例の永久標本から DNA 抽出を行い、シー

ケンスを行ったが、8症例においてC>Tの置換の頻度が極めて高く、強いバイアスが観察された。これは、FFPE 標本作成あるいは保管中に起こったアーチファクトと考えられ、これら8症例は解析には不適切と判断した。代替の解析方法とし癌パネルを用いた特定の癌関連遺伝子にフォーカスした解析を行うこととした。現在すでに8検体の癌パネルのシーケンスが終了している。特に腫瘍ドライバー変異の同定を目標にし、現在解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 松尾 雄司, 内海 大介, 苅谷 嘉之, 林 健太郎, 宮城 拓也, 山口 さやか, 高橋 健造	4. 巻 63
2. 論文標題 右大腿部に生じた進行性アポクリン腺癌の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 皮膚科の臨床	6. 最初と最後の頁 1942-1946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18888/hi.0000002964	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 堀川 知久, 松尾 雄司, 内海 大介, 宮城 拓也, 高橋 健造	4. 巻 43
2. 論文標題 【高齢者の皮膚疾患】ダブルフェニブ・トラメチニブ併用療法により横紋筋融解症をきたした悪性黒色腫	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 皮膚病診療	6. 最初と最後の頁 1044-1048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 松尾 雄司, 内海 大介, 苅谷 嘉之, 山口 さやか, 高橋 健造	4. 巻 40
2. 論文標題 乳児に生じた多発皮膚筋線維腫の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本小児皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 71-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 小松 恒太郎, 山口 さやか, 内海 大介, 山本 雄一, 高橋 健造	4. 巻 40
2. 論文標題 優性栄養障害型表皮水疱症の患児での皮膚症状の経年変化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本小児皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 76-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sakugawa H, Hayashi K, Uema M, Miyagi T, Utsumi D, Yamaguchi S, Takahashi K	4. 巻 47
2. 論文標題 Carney complex 1 with PRKAR1A mutations presented with multiple repeated skin myxomas : a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e122-e124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15254	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 Utsumi D, Yasuda M, Amano H, Suga Y, Seishima M, Takahashi K	4. 巻 83
2. 論文標題 Hair abnormality in Netherton syndrome observed under polarized light microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Acad Dermatol	6. 最初と最後の頁 847-853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaad.2019.08.024	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 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋健造, 山口さやか, 松尾雄司, 與那嶺周平, 内海大介
2. 発表標題 基底細胞母斑症候群患者の年代別の観察.
3. 学会等名 第484回大阪地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内海 大介, 高橋 健造, 安田 正人, 天野 博雄, 須賀 康, 清島 真理子
2. 発表標題 偏光顕微鏡下に見いだされたネザートン症候群の特徴的毛髪所見.
3. 学会等名 第295回東海地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 さやか, 松尾 雄司, 與那嶺 周平, 内海 大介, 高橋 健造
2. 発表標題 基底細胞母斑症候群患者の年代別の観察.
3. 学会等名 第17回加齢皮膚医学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮城拓也, 内海大介, 山口さやか, 高橋健造, 柳瀬隆史, 吉田由起子, 浅井達哉, 大堀耕太郎
2. 発表標題 AIの新技术Wide Learningを皮膚病の病態解析や診断の適正化へ用いる試み
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会
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
---------	---------