

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16904

研究課題名(和文) 小児骨肉腫におけるBRCAnessと化学療法感受性に関する検討

研究課題名(英文) Analysis of BRCAness as a Predictive Biomarker of Neoadjuvant Chemotherapy in Childhood, Adolescents, and Young Adults with Osteosarcomas

研究代表者

山崎 文登 (YAMAZAKI, Fumito)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70529354

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)：小児・AYA世代骨肉腫に、BRCA1/2変異はないが同様の相同組み換え修復機能の異常の関与が考えられるBRCAnessが存在すると考え、24例を対象にSNPアレイ・エクソーム解析でコピー数異常に着目したLOH(loss of heterozygosity)スコア(大領域のLOHの個数)を算出した。骨肉腫のSNPアレイのLOHスコアはBRCA1/2が不活性化した乳がんと同等の水準であった。エクソーム解析の結果も含めて、術前化学療法の感受性が良好と判断される腫瘍壊死率が高い症例では腫瘍壊死率が低い症例に比べてLOHスコアが有意に高かった(20.8 vs 14.9,  $P=0.023$ )。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児・AYA世代骨肉腫症例でLOHスコアはBRCA1/2が不活性化した乳がんと同等の高い水準にあり、相同組み換え修復機能の異常が腫瘍発症に寄与している可能性が示唆された。また、化学療法後の腫瘍壊死率が高い治療反応良好群でLOHスコアが高かったこと、およびLOHスコアが高値の例では限局例において予後良好な傾向があったことから、LOHスコアは治療開始時に評価可能な、化学療法感受性および予後予測のためのバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination deficiency (HRD), mainly due to BRCA1/2 inactivation, causes many copy number alterations (CNAs) and structural variations (SVs) in breast and ovarian cancer genomes. Furthermore, similar genomic alterations are observed in BRCA1/2-intact cancers. This phenomenon is called "BRCAness." Osteosarcoma (OS) exhibits a high number of CNAs and SVs. Thus, this study aimed to assess genomic alterations in OS from the viewpoint of HRD. Single nucleotide polymorphism array and whole-exome sequencing analyses were performed on 19 and 5 OSs, respectively, from childhood, adolescents, and young adults. The HRD-LOH (loss of heterozygosity) scores in OSs were as high as those reported in breast cancers, and the scores of good responders to neoadjuvant chemotherapy were higher than those of standard responders (20.8 vs. 14.9,  $P=0.023$ ). The study results indicate that HRD underlies high genomic alterations in OS and the HRD-LOH score is a predictive biomarker for OS treatment.

研究分野：小児血液・腫瘍

キーワード：骨肉腫 BRCAness 相同組み換え修復機能 化学療法感受性

1. 研究開始当初の背景

BRCA1/2 変異に代表される相同組み換え修復機能の異常 (homologous recombination deficiency: HRD) によるゲノム不安定性はがんの発症に関わる中心的な機序の一つである。BRCA1/2 の生殖細胞系列・体細胞機能失活変異は著明な染色体転座・欠失、遺伝子増幅・融合などのゲノム変化を引き起こし、乳がん、卵巣がんをはじめ種々のがんに関与していることが知られている。一方で、プラチナ製剤や PARP 阻害剤などが相同組み換え修復機能の異常の存在下で効果的に細胞死を誘導することから、治療薬開発のターゲットとしても注目されている。

近年、BRCA1/2 の変異はないが、BRCA1/2 変異陽性腫瘍に似た特徴的なゲノム変化を示す腫瘍の存在が知られており、BRCA1/2 変異と同様に相同組み換え修復機能の異常の関与が考えられることから、このゲノム変化は BRCAness と呼ばれている (図 1)。原因として ATM、ATR、CHEK1/2、DSS1、RAD51、NBN、FANCFamily などの遺伝子異常が知られているが、いまだ原因不明の腫瘍も多数存在する。注目すべきことに、BRCAness を有すると判定された腫瘍は BRCA1/2 変異のある症例と同様に、

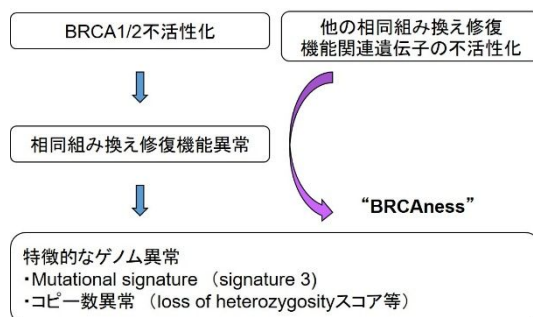


図 1. BRCAness の概念図

プラチナ製剤や PARP 阻害剤に対して高い感受性を示すことが、成人乳がん・卵巣がんにおいて報告されている (Lord CJ, Ashworth A. Nat Rev Cancer 2016;16:110)。

BRCAness の判定には相同組み換え修復機能の異常に関連する遺伝子異常の同定や、BRCA1/2 変異と高い相関を示す SNP アレイを用いたゲノムのコピー数異常に着目した種々のスコアリングなどが用いられて来た。また近年、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンズ解析・全エクソームシーケンズ解析により喫煙、紫外線や化学物質など特定の変異プロセスによってもたらされる特徴的な遺伝子変異パターン (mutational signature) が同定され (Alexandrov LB, et al. Nature 2013;500:415) BRCA1/2 変異に関連する特有の signature が BRCAness をも評価しうる新たな方法としても注目されている。

BRCAness に関するこれらの検討の多くは成人乳がん・卵巣がんに対するものであり、他のがん種に関しての知見は限られている。申請者らは 50 例の AYA 肉腫の全エクソームシーケンズ解析を行い、骨肉腫 (5 例) が BRCA1/2 変異がないにも関わらず、他の肉腫に比べて BRCA1/2 変異に特徴的な mutational signature (signature 3) の寄与が高いことを見出した (図 2)。また大領域 (>15 Mb) のヘテロ接合性消失 (loss of heterozygosity: LOH) の数 (HRD-LOH score) とも相関する (図 3) ことから、BRCAness の状態である判断した。

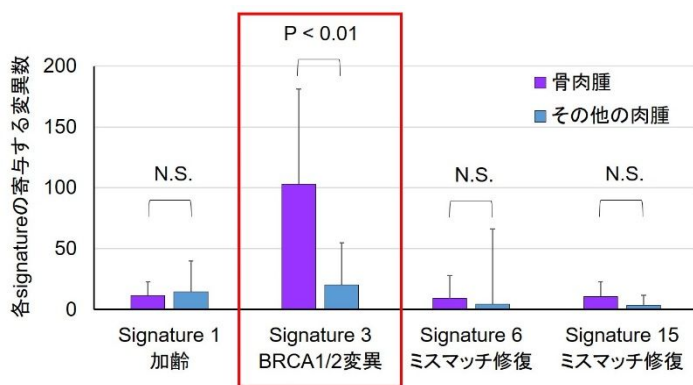


図 2. AYA 肉腫に見出された上位 4 種の mutational signature

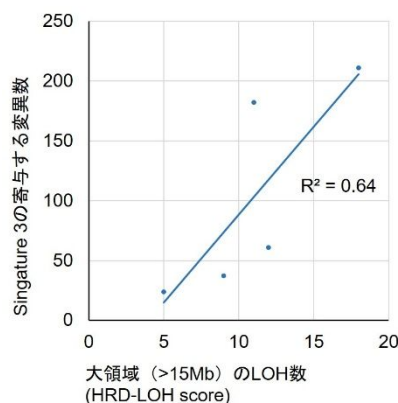


図 3. 骨肉腫 5 例での signature 3 と HRD-LOH score

2. 研究の目的

他の小児がんと異なり、骨肉腫は高度な染色体異常性を示し、多数の遺伝子変異・構造異常・コピー数異常を有する特徴があり、ゲノム不安定性が存在すると考えられている。TP53 や RB1 などのがん抑制遺伝子の変異が高頻度に認められ、発症に深く関わっていることが示唆されている一方で、ゲノム不安定性を説明できる遺伝子異常は明確になっていない。AYA 骨肉腫での特徴的な signature と、それと良く相関する HRD-LOH score から、BRCAness が見出されたことを踏まえ、このゲノム不安定性が相同組み換え修復機能の異常に由来するのではないかと考えた。

骨肉腫はプラチナ製剤を含む多剤併用化学療法により治療されるが、化学療法感受性(術前化学療法終了後の手術試料における腫瘍壊死率で評価される)には幅があり、低感受性例の予後は不良であることが知られている。化学療法感受性に影響する要因としては、腫瘍自体の分子遺伝学的特徴の他に各薬物の代謝など様々な角度から研究が進められているが、未だ明らかになっていない。乳がん・卵巣がんにおける化学療法感受性の報告を踏まえ、骨肉腫においても相同組み換え修復機能の異常が化学療法感受性を決定しているのではないかと考えた。

そこで本研究では本邦の小児・AYA 世代骨肉腫において、HRD-LOH score により BRCAness の存在を確認し、BRCAness の強弱がプラチナ製剤を含む化学療法感受性マーカーとなりうるかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

小児・AYA 世代骨肉腫におけるコピー数異常の評価、HRD-LOH score の検討

国立がん研究センター中央病院で治療を受けた 39 歳以下の小児・AYA 世代骨肉腫症例について SNP アレイ・エクソーム解析を実施し、コピー数異常の評価を行い、既報と比較した。ここから大領域 (>15 Mb) の LOH の数である HRD-LOH score を求めた。SNP アレイ・エクソーム解析双方を行った症例については解析法によるスコアリングに差がないかを調べた。また、他の腫瘍における報告と比較検討した。

小児・AYA 世代骨肉腫における化学療法感受性マーカーとしての BRCAness の評価法の確立  
化学療法の投薬量を含めた全治療内容の詳細、病理組織所見(初診時の組織型、術前化学療法終了時の腫瘍壊死率など)、他の臨床情報(発症年齢、原発部位、進行度、予後など)の情報を取得した。腫瘍壊死率を化学療法反応性と考えて、HRD-LOH score の強弱との関連を検討し、化学療法感受性マーカーとしてのカットオフ値を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 小児・AYA 世代骨肉腫におけるコピー数異常の評価

小児・AYA 世代骨肉腫の 21 例に対して SNP アレイを実施、加えて 6 例に対してエクソーム解析を行った。解析に不適な症例を除いた、SNP アレイ 19 例およびエクソーム解析 5 例の各々の方法によるコピー数解析で、染色体レベルでは 1p, 8q, 17p amplification (>4 copies) および 3p, 6q, 20p loss (<2 copies) が見られた。遺伝子レベルでは *COPS3*, *PRKDC*, *RAD21*, *CCNE1*, *FLCN*, *MYC*, *CCND3*, *RAC1*, *HSP90AB1*, *VEGFA* amplification (>30% に認められた) が、*CDKN2A/B*, *RB1* loss (>20%) が高頻度に見られた。これらの結果は既報の結果を支持するものであった。

#### (2) 小児・AYA 世代骨肉腫における HRD-LOH score

19 例の SNP アレイのコピー数解析の結果から HRD-LOH score を計算したところ、*BRCA1/2* が正常の乳がん(中央値: 6)、*BRCA1/2* が不活性化した乳がん(中央値: 16) (Timms KM, et al. Breast Cancer Res. 2014;16:475) と比した際に、*BRCA1/2* が不活性化した乳がんと同等の水準(中央値: 19)であることが示された(図 4)。SNP アレイとエクソーム解析の結果がある 5 例において、双方の方法での HRD-LOH score の結果の相関は良好 ( $R^2=0.72$ ) であった。エクソーム解析のみを行った 5 例の結果も含めて、全体(年齢中央値 14 歳、小児 15 例・AYA 世代 9 例)での HRD-LOH score は中央値 19 (範囲: 0-27) であった。小児例と AYA 世代例で特に分布に違いはなかった。

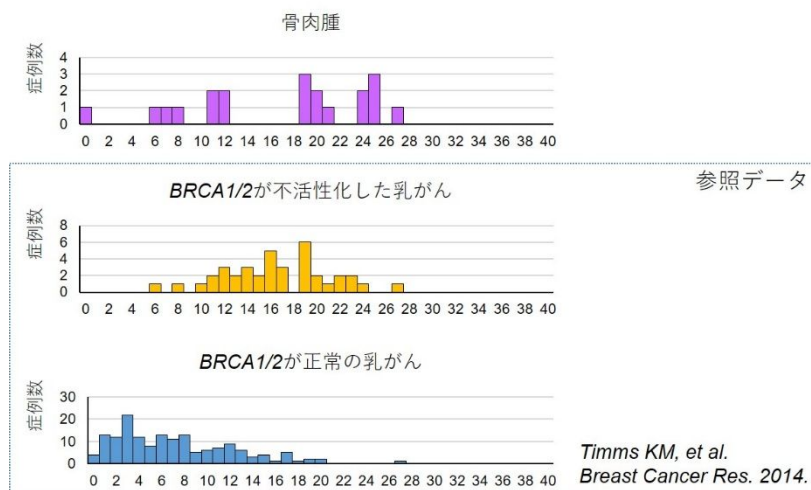


図 4. 骨肉腫 19 例と乳がん症例の HRD-LOH score

( 3 ) 化学療法感受性マーカーとしての HRD-LOH score の検討

HRD-LOH が評価できた 24 例の小児・AYA 世代骨肉腫全例で術前化学療法が実施され、手術時の病理診断で腫瘍壊死率が評価されていた。化学療法感受性として腫瘍壊死率と HRD-LOH score の関連を調べたところ、Good responder (腫瘍壊死率 90%以上) 群 9 例では Standard responder (腫瘍壊死率 90%未満) 群 15 例と比較して有意に HRD-LOH score が高かった (20.8 vs 14.9,  $P=0.023$ ) ( 図 5 )。HRD-LOH score のカットオフ値を 13 に設定して、化学療法感受性マーカーとなりうるかを検討した。High HRD-LOH score (13 以上) の 15 例中 8 例が治療反応良好 (腫瘍壊死率 90%以上) であったのに対し、Low HRD-LOH score (13 未満) では 9 例中 1 例にとどまっていた ( $P=0.08$ ) ( 図 6 )。

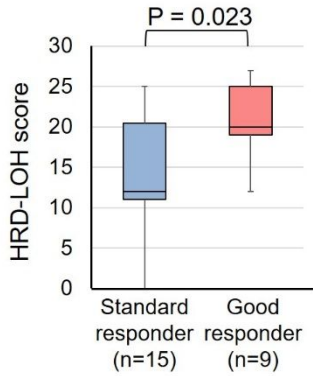


図 5 . 治療反応性と HRD-LOH score

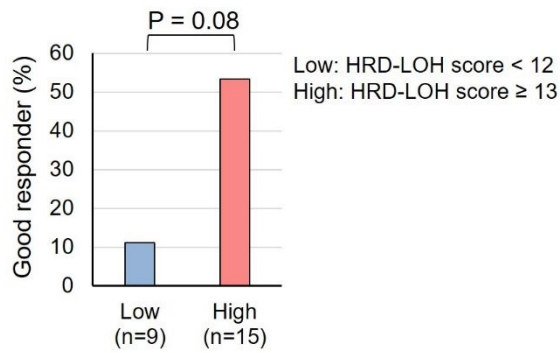


図 6 . HRD-LOH score 低・高値群に含まれる Good responder の割合

さらに、転移がなく、手術で腫瘍が広汎全摘された症例において予後を検討したところ、High HRD-LOH score 10 例が Low HRD-LOH score 8 例に比べて再発が少ない傾向 (5 年無イベント生存率 60% vs 25%,  $P=0.19$ ) であった ( 図 6 )。

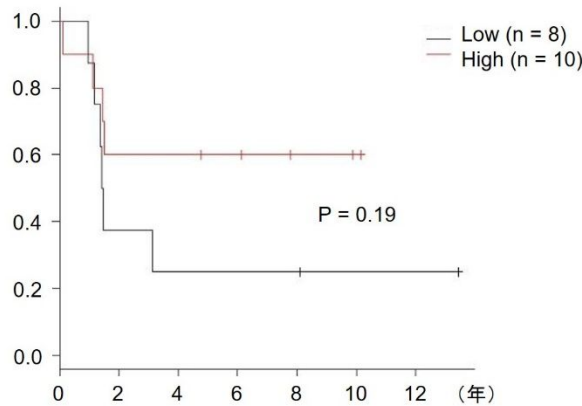


図 7 . HRD-LOH score 低・高値群と無イベント生存率

( 4 ) 結論

小児・AYA 世代骨肉腫症例で HRD-LOH score は *BRCA1/2* が不活化した乳がんと同等の高い水準にあり、相同組み換え修復機能の異常が腫瘍発症に寄与している可能性が示唆された。また、化学療法後の腫瘍壊死率が高い Good responder では Standard responder より有意に HRD-LOH score が高く、HRD-LOH score が高値の例では限局例において予後良好な傾向があったことから、HRD-LOH スコアが化学療法感受性を予測するマーカーとなり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎文登, 浅野尚文, 関水壮哉, 三谷幸代, 久保崇, 小川千登世, 川井章, 吉田朗彦, 市川仁
2. 発表標題 遺伝子変異プロファイリング・コピー数解析による骨肉腫における相同組み換え修復
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究協力者	市川 仁  (ICHIKAWA Hitoshi)		
研究協力者	三谷 幸代  (MITANI Sachiyo)		

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
---------	---------