

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

日本人悪性黒色腫における体細胞遺伝子変異ならびに
バイオマーカー候補と臨床料理学的因子との関連に関する研究

研究代表者 寺本 由紀子 (国際医療センター 皮膚腫瘍科)

緒言

研究の背景

1) 悪性黒色腫の治療

進行期悪性黒色腫に対する治療は、ダカルバジンしかない状態が半世紀間続いたがこの数年で劇的に変化した。2011年以降に進行期悪性黒色腫の治療薬として米国FDAによって承認された新薬は以下の6つである。

Ipilimumab (2011年) 抗CTLA-4抗体 (免疫療法)

2015年日本承認

Vemurafenib (2011年) BRAF阻害剤 (分子標的療法)

2015年日本承認

Dabrafenib (2013年) BRAF阻害剤 (分子標的療法)

2016年日本承認

Trametinib (2013年) MEK阻害剤 (分子標的療法)

2016年日本承認

Nivolumab (2015年) 抗PD-1抗体 (免疫療法)

2014年日本承認

Pembrolizumab (2015年) 抗PD-1抗体 (免疫療法)

(日本承認予定)

進行期悪性黒色腫に対する治療は、免疫療法と分子標的療法が主流となった。さらに新規開発中の薬剤や上記薬剤の組み合わせによる併用療法について、現在世界中で多くの臨床試験が進行しており、標準治療の確立が進められている。

分子標的治療のみならず抗CTLA-4抗体 (Ipilimumab) による免疫療法において腫瘍の体細胞遺伝子変異数がその臨床効果に影響を及ぼすとする報告¹⁾が出ており、これからの悪性黒色腫の治療は、各個人の遺伝子プロファイルを明らかにした上で治療を選択するオーダーメイド治療となっていくことは明らかである。

2) 日本人悪性黒色腫の特徴

これまでの免疫療法や分子標的療法の開発は欧米人を対象とした研究から生まれてきた。

日本人では末端黒子型 (ALM) が全体の約45%を占めているが、欧米では2-10%とされ、研究対象のごく一部を占めるのみである。また、欧米人ではALMはその他の病型

よりも予後が悪いとされるが、日本人の予後データは欧米と比較して劣っておらず、ALMを日常診療している中でALMがとりたてて予後不良であると感じたことはない。この一因として裸足の生活習慣がある日本人のALMとそうではない欧米人のALMでは同じ病型でも遺伝子学的特徴が異なっている可能性がある。同様に、欧米人の表在拡大型 (SSM) が紫外線に起因していることは知られているが、日本人では日光浴などの生活習慣もないため、同じSSMでも日本人では紫外線による原因は考えにくい。よって、日本人悪性黒色腫におけるmolecular signature (分子的特徴) を明らかにすることで、日本人により効果のある治療方法が得られ、今後日本人における治療指針を決定する基盤となるのではないかと考えた。

材料と方法

対象症例

埼玉医大国際医療センター皮膚腫瘍科・皮膚科で2007年4月～2014年8月の間に手術 (病巣切除) をうけており、かつ下記患者選択基準を満たす症例を対象とした。

患者登録基準は以下の通り。

- 1) 組織学的に皮膚原発悪性黒色腫の診断が得られていること
- 2) 日本人を主とする東アジア人であること
- 3) 切除時の組織標本がパラフィン包埋として保存してあること
- 4) 原発巣の腫瘍のtumor thickness 2 mm以上であること*

※ DNA, RNA抽出に際し腫瘍細胞量を確保するため、原発巣のtumor thicknessを2 mm以上とした。tumor thicknessが2 mmより小さい症例のほとんどがStage Iで5年生存率は90%以上であるため、tumor thicknessが2 mmより小さい症例を除いても予後との相関には影響を与えないと考えた。

遺伝子解析

- 1) 登録症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロック標本の薄切スライド (10 μm厚) を作成し、Leica LMD-7000を用いたレーザーマイクロダイセク

ションあるいはマニュアルダイセクションにより腫瘍部のみを選択的に回収する。

- 2) マイクロダイセクションにより回収した腫瘍細胞より QIAGEN 社の QIAamp® DNA FFPE Tissue キットを用いてゲノム DNA を抽出し、Promega 社の Quantus™ Fluorometer および QuantiFluor® dsDNA System を用いて 2 本鎖 DNA の濃度測定を行う。
- 3) 抽出した DNA をコントロールとなる DNA 断片の PCR 増幅および同産物の Agilent 2100 Bioanalyzer の泳動により、抽出 DNA の品質確認を行う。
- 4) 研究対象遺伝子 (KIT, BRAF, MEK, NRAS, PTEN, ERBB4, GRIN2A, KEAP1, RAC1, PPP6C, PREX2, TRRAP, FBXW7, MTOR 遺伝子) について、FFPE 由来 DNA に対応するように設計したカスタムメイド HaloPlex HS でターゲットエンリッチメントを行い、Illumina 社の MiSeq を用いた次世代シーケンスにて塩基配列を決定する。
- 5) 得られた塩基配列結果 (fastq ファイル) より、種々のバイオインフォマティクスツールを使用して、体細胞変異を抽出する。
- 6) 変異が同定された場合は、必要に応じてサンガーシーケンスにより変異の確認を行う。

統計学的解析

- 7) 欧米で報告された変異頻度との比較を行う。
- 8) 遺伝子変異と臨床病理学的因子との相関解析を行う。

結果

- 1) 59 症例を登録し、計 78 検体 (原発巣 56 検体, in-transit 1 検体, リンパ節 21 検体) の病理組織標本ブロックの薄切スライドの作成を行った。この薄切スライドを脱

パラフィン処理後、トルイジンブルー染色を行ったのち、レーザーマイクロ/マニュアルダイセクションにより腫瘍組織を選択的に回収し、これより DNA の抽出を行った。このうち 2 検体はパラフィン包埋時に脱灰処理がされており、DNA 抽出が不可能であった。抽出した DNA の濃度の中央値は 26 ng/μL (範囲 0.0051-170 ng/μL) であった。

- 2) 抽出した DNA の品質確認のため、アジレント社のプロトコルに従い、コントロール実験用の *GAPDH* 遺伝子 PCR 用プライマー 4 本を合成し、準備を行った。
- 3) DNA のキャプチャには DNA ライブラリに分子バーコードを導入し、従来の方法に比して低頻度の変異を高い信頼性で検出することを可能とした HaloPlex HS を選択した。Agilent 社の SureDesign v1.1 より HaloPlex Advanced Design Wizard を使い、FFPE 抽出サンプル用に最適化したアルゴリズムで、標的とする 14 遺伝子をキャプチャするカスタムデザインを行った (図 1)。ターゲットリージョンのサイズは 55.928 kbp, 総アンプリコン数 5153, ターゲットのカバー率は 99.9% であった。1 サンプルあたりに必要とされる最小シーケンスは、37.249 MBp であり、MiSeq シーケンサーの泳動で十分に賄えるデータ量であった。
- 4) 症例の情報を診療録より抽出し、データベース化した。評価項目は年齢、性別、原発巣の部位、病型、tumor thickness、潰瘍の有無、所属リンパ節転移の有無、病期、化学療法の施行の有無とそのレジメン、術後再発の有無、無病生存期間 (disease-free survival: DFS), 全生存期間 (overall survival: OS)。登録症例は 59 例で平均年齢は 66.8 (33-97) 歳。性別は男性 35 例 (59.3%), 女性 24 例 (40.7%)。病型は ALM25

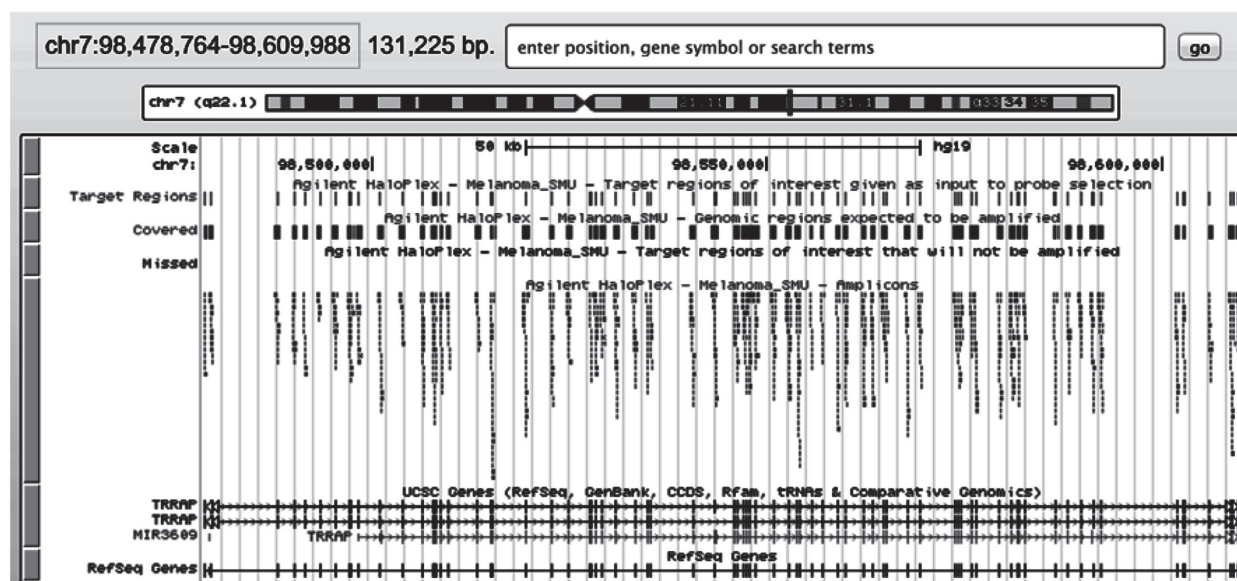


図 1. Agilent 社の SureDesign v1.1 HaloPlex Advanced Design Wizard を用いた遺伝子のキャプチャ領域の例。TRRAP 遺伝子。

例 (42.4%), SSM20例 (33.9%), NM6例 (10.2%), LMM8例 (13.5%)。病期はIB期1例, IIA期9例, IIB期14例, IIC期8例, IIIA期6例, IIIB期7例, IIIC期12, IV期2例であった。

- 5) 抽出したDNAが微量なものについては, Whole genome amplificationを行う可能性があるため, Sigma社のGenomePlex[®] Optimized kit with enzyme for amplifying a variety of DNA including FFPE tissueを購入し, 予備的にFFPE組織から抽出したコントロールDNAの増幅を行い, PCRにて増幅の確認を行った。

考 察

今回DNA抽出を行った試料のうち, メラニン色素に富む組織の中には抽出効率が他に比して低いものが僅かながら存在し, このような試料の場合のより良いDNA抽出法を検討する必要性が考えられた。現段階では未だ抽出したDNAの品質チェックを終えていないが, 例えかなりの分解が進んでいる場合 (Average Yield Ratio <5%) だとしても, 半数以上の検体でDNAの増幅を行うこと無く, 次世代シーケンサー解析に必要充分な量のDNAが得られている事が確認出来た。DNAの品質チェック後, 必要なDNA量を計算し, HaloPlex HSによるキャプチャ, MiSeqシーケンサーによる塩基配列情報の取得, バイオインフマティクス解析による, 体細胞変異の同定へと進む予定である。また, 体細胞変異を選択的に検出するためには, 対象となる健常者のDNAの変異データが必要となるが, ごく最近東北メディカル・メガバンク機構より, Integrative Japanese Genome Variation Databaseが公開され, 1,070名の東北地方在住日本人健常者の遺伝子情報が入手され, 今後フィルタリングを行う際に使用することが可能となった。

悪性黒色腫は人種間で発生頻度や発生部位, 病型に差がある。欧米人での悪性黒色腫においては, 病型別に遺伝子変異の頻度も異なることが報告されている。BRAF遺伝子変異は欧米人の悪性黒色腫の40~50%に認められ, NRAS遺伝子変異は15~20%の頻度でみられるとされる^{2,3)}。さらに, BRAF遺伝子変異はSSMや紫外線ダメージの少ない部位に多く, NRAS遺伝子変異はNMや紫外線ダメージを受けた部位に多く認めると報告されている⁴⁾。また, KIT遺伝子の変異頻度は全体では2%と低いが, 粘膜やALMではそれぞれ18%, 21%と報告されている⁵⁾。しかし, これらの報告は欧米人のデータによるものであり, 日本人の悪性黒色腫における遺伝子情報は現時点でほとんど得られていない。日本人の悪性黒色腫における遺伝子変異率はBRAF遺伝子26.7%, KIT遺伝子5.0%, NRAS遺伝子7.1%との報告はあるが一施設のデータであり^{6,7)}。日本人全体で同じような頻度で生じているか, そのほかの遺伝子についてはどうかをはじめ日本人の悪性黒色腫病型の約半数を占めるALMが欧米人のALMと同様の遺伝子変異パターンをもつか否かについては明らかでは

ない。このような遺伝子情報を探索することは, 今後日本人の悪性黒色腫における治療指針を考えるうえで基盤となり, 非常に重要である。

悪性黒色腫に対する分子標的治療薬の先駆けとなったのは, BRAF阻害薬のVemurafenibである。Vemurafenibは, 治療歴のないBRAFF600遺伝子変異陽性の切除不能または転移性悪性黒色腫の患者に対し, 第III相試験 (BRIM-3試験) が行われた⁸⁾。全生存期間と無増悪生存期間についてダカルバジンと比較されたが, Vemurafenibの死亡ハザード比は0.44 ($p<0.0001$) で死亡または増悪のハザード比は0.26 ($p<0.0001$) であった。無増悪生存期間中央値は, Vemurafenib群が5.3か月, ダカルバジン群が1.6か月であった。このような生存期間の延長が示されたことは半世紀もの間ダカルバジン以上の治療がなく, また, 生存期間の延長が得られる治療が存在しなかった悪性黒色腫の分野では非常に画期的なことであった。この試験結果をもとに, 2011年Vemurafenibは米国FDAに承認され, さらに, 2013年にはBRAF阻害薬2剤目となるDabrafenibとMEK阻害薬であるTrametinibがFDAの承認を受けた。この2剤の併用療法は, Vemurafenib単剤投与と全生存期間について第III相試験 (COMBI-v試験)⁹⁾が行われ, 全生存期間中央値がDabrafenib / Trametinib併用群で25.6か月, Vemurafenib単独群で18.0か月, ハザード比0.66 [95 % CI 0.53 ~ 0.81], $p<0.001$) であり, 2年後の全生存率はDabrafenib / Trametinib併用群で51%, Vemurafenib単剤群で38%, さらに, 全奏効率の中央値はDabrafenib / Trametinib併用投与の患者さんで65.6%, Vemurafenib単剤投与では52.8%とDabrafenib / Trametinib併用群で統計学的にも優位な結果が得られた。日本では, 2015年にVemurafenibが保険承認を取得し, 2016年5月にDabrafenibとTrametinibが承認された。

また, 腫瘍の体細胞遺伝子変異の重要性は分子標的治療に対するだけでなく, 悪性黒色腫における治療の主流となった免疫療法の治療効果に対しても関係することが示唆されている。抗CTLA-4抗体の臨床効果と腫瘍の体細胞遺伝子変異数が影響を及ぼすとする報告¹⁾やNRAS変異とIpilimumab, IL2, 抗PD-1/PD-L1抗体を用いた免疫療法の臨床効果が相関するという報告¹⁰⁾がある。このように腫瘍の変異を調べることは分子標的治療薬の対象となるか否かのみならず, 免疫療法に対する効果にも影響を与える可能性がある。

本研究では, 以下の14遺伝子の変異について解析を行う予定である。上記に述べた現在すでに阻害薬が使用されているBRAF遺伝子, MEK遺伝子のほか, 臨床試験が進行中のKIT^{5, 11)}, NRAS¹²⁾, MTOR^{13, 14)}遺伝子について変異の検索を行う。また, 近年悪性黒色腫において変異が報告されている遺伝子 (PTEN^{15, 16)}, ERBB4¹⁷⁻¹⁹⁾, GRIN2A²⁰⁻²²⁾, KEAP1²³⁾, RAC1²⁴⁻²⁷⁾, PPP6C²⁷⁾, PPEX2²⁸⁾, TRRAP²⁰⁾, FBXW7²⁹⁾遺伝子) は今後治療対象遺伝子となる可能性があるため, これら9遺伝子について

も変異の検索を行う。本研究では次世代シーケンス技術を用いることにより、これまでの報告よりも多くの遺伝子変異を網羅的に調べることができる。

皮膚悪性腫瘍学会皮膚がん予後統計委員会によれば、日本の総登録症例は3278症例あり、平均63.4歳で性別は男性1531例(47%)・女性1744例(53%)、病型内訳はALM45%、SSM23%、NM11%、LMM9%、粘膜その他12%である。また、これと本研究の登録症例の分布を比較したところ、ALMが約半数を占めているなどの点で概ね一致していた。このことから、本研究の登録症例について遺伝子情報と臨床病理学的因子、特に治療に示す効果や予後との相関をさらに解析することにより日本人における悪性黒色腫における体細胞変異等の分子腫瘍学的ならびに臨床病理学的特徴を明らかにすることが可能であると思われる。このような大規模な解析は本邦で初めてであり、難治である悪性黒色腫の分子標的治療の基盤を形成するものと期待される。今後も実験を進め、遺伝子解析および分析を進めていく予定である。

引用文献

- 1) Snyder A, Makarov V, Merghoub T, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2014; 371: 2189-99.
- 2) Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2135-47.
- 3) Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 2010; 29: 5545-55.
- 4) Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* 2011; 164: 776-84.
- 5) Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* 2011; 305: 2327-34.
- 6) Uhara H, Ashida A, Koga H, et al. NRAS mutations in primary and metastatic melanomas of Japanese patients. *Int J Clin Oncol* 2014; 19: 544-8.
- 7) Ashida A, Uhara H, Kuniwa Y, et al. Assessment of BRAF and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci* 2012; 66: 240-2.
- 8) Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364: 2507-16.
- 9) Robert C. Two year estimate of overall survival in COMBI-v, a randomized, open-label, phase III study comparing the combination of dabrafenib(D) and trametinib(T) with vemurafenib(vem) as first-line therapy in patients(pts) with unresectable or metastatic BRAF V600E/K mutation positive cutaneous melanoma. Abstract #3301 18th ECCO-40th ESMO European Cancer Congress, September 2015, Vienna, Austria.
- 10) Johnson DB, Lovly CM, Flavin M, et al. Impact of NRAS mutations for patients with advanced melanoma treated with immune therapies. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 288-95.
- 11) Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013; 31: 3182-90.
- 12) Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013; 14: 249-56.
- 13) Margolin KA, Moon J, Flaherty LE, et al. Randomized phase II trial of sorafenib with temsirolimus or tipifarnib in untreated metastatic melanoma (S0438). *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012; 18: 1129-37.
- 14) Dronca RS, Allred JB, Perez DG, et al. Phase II study of temozolomide (TMZ) and everolimus (RAD001) therapy for metastatic melanoma: a North Central Cancer Treatment Group study, N0675. *Am J Clin Oncol* 2014; 37: 369-76.
- 15) Jeck WR, Parker J, Carson CC, et al. Targeted next generation sequencing identifies clinically actionable mutations in patients with melanoma. *Pigment cell Melanoma Res* 2014; 27: 653-63.
- 16) Zebary A, Omholt K, Vassilaki I, et al. KIT, NRAS, BRAF and PTEN mutations in a sample of Swedish patients with acral lentiginous melanoma. *J Dermatol Sci* 2013; 72: 284-9.
- 17) Rudloff U, Samuels Y. A growing family: adding mutated Erbb4 as a novel cancer target. *Cell Cycle* 2010; 9: 1487-503.
- 18) Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet* 2009; 41: 1127-32.
- 19) Manca A, Lissia A, Cossu A, et al. Mutations in ERBB4 may have a minor role in melanoma pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 1685-7.
- 20) Wei X, Walia V, Lin JC, et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* 2011; 43: 442-6.
- 21) D'mello SA, Flanagan JU, Green TN, et al. Evidence That GRIN2A Mutations in Melanoma Correlate with Decreased Survival. *Front Oncol* 2014; 3: 333.

- 22) Prickett TD, Zerlanko BJ, Hill VK, et al. Somatic mutation of GRIN2A in malignant melanoma results in loss of tumor suppressor activity via aberrant NMDAR complex formation. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 2390-8.
- 23) Miura S, Shibasaki M, Kasai S, et al. A somatic mutation of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 553-6.
- 24) Mar VJ, Wong SQ, Logan A, et al. Clinical and pathological associations of the activating RAC1 P29S mutation in primary cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014.
- 25) Watson IR, Li L, Cabeceiras PK, et al. The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer Res* 2014; 74: 4845-52.
- 26) Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; 44: 1006-14.
- 27) Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 150: 251-63.
- 28) Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012; 485: 502-6.
- 29) Aydin IT, Melamed RD, Adams SJ, et al. FBXW7 mutations in melanoma and a new therapeutic paradigm. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: dju107.
- Sato S, Fujisawa Y, Fujimoto M, Otsuka F, Hayashi N, Yamazaki N, Yamamoto A. Effect of non-amputative wide local excision on the local control and prognosis of in situ and invasive subungual melanoma. *J Dermatol* 2015; 42(9): 861-6.
- 3) Imamura T, Nakamura Y, Teramoto Y, Sato S, Asami Y, Arai E, Yamamoto A. A case of giant primary Dermal melanoma with BRAF V600E mutation. *Acta Derm Venerol* 2016 [Epub ahead of print].
- 4) Tsutsumida A, Takahashi A, Namikawa K, Yamazaki N, Uhara H, Teramoto Y, et al. Frequency of level II and III axillary nodes metastases in patients with positive sentinel lymph nodes in melanoma: a multi-institutional study in Japan. *Int J Clin Oncol* 2016 [Epub ahead of print].
- 5) 中村泰大, 寺本由紀子, 佐藤さゆり, 山田勝裕, 山本明史, 関根小弓, 藤澤康弘. 浸潤性爪甲下悪性黒色腫における腫瘍-末節骨間最短距離の計測. *日本皮膚外科学会雑誌* 2015; 19(2): 114-5.

学会発表

研究成果リスト

論文

- 1) Teramoto Y, Nakamura Y, Sato S, Yamamoto A. Low probability of lymphatic drainage to Cloquet's node is of limited value as indicator for pelvic lymph node dissection in patients with lower limb melanoma. *Lymphat Res Biol* 2015 [Epub ahead of print].
- 2) Nakamura Y, Ohara K, Kishi A, Teramoto Y, Sato S, Fujisawa Y, Fujimoto M, Otsuka F, Hayashi N, Yamazaki N, Yamamoto A. Low probability of lymphatic drainage to Cloquet's node is of limited value as indicator for pelvic lymph node dissection in patients with lower limb melanoma. 11th European Association of Dermato Oncology and 8th world Meeting of Interdisciplinary Melanoma/Skin Cancer Centers, Oct 2015, France
- 3) 今村太一, 浅見友梨, 寺本由紀子, 中村泰大, 山本明史. Vemurafenib 半量投与でPRを得た悪性黒色腫多発転移の1例. 第79回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会, 2016年2月, 新宿