

論文の内容の要旨

論文題目 卵巣癌各組織型における網羅的な染色体異常及び
遺伝子発現異常の解析

指導教員 矢野 哲准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入(進)学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 上原 ゆり子

悪性腫瘍は発生および進展の過程でさまざまな遺伝子に発現異常が生じ、これが蓄積していくことで浸潤、転移などの悪性形質を獲得していくとされているが、この背景には、個々の遺伝子変異に加えて、染色体コピー数異常による染色体不安定 (Chromosomal instability : CIN) が重要な因子であることが明らかとされている。悪性腫瘍におけるゲノムワイドな染色体変異についてのこれまでの報告は CGH (comparative genome hybridization) 法によるものがほとんどであった。当初の CGH 法は解像度が低かったため、その後 CGH マイクロアレイ法が開発され、数百 kb の染色体変化の領域が同定可能となったが、CGH では相対的なゲノムの増減としてしか変化を捉えることができないという問題点があった。近年、SNP タイピングアレイが開発され、CGH マイクロアレイ法に比べさらに高解像度で、かつアレル別コピー数解析により絶対的なゲノムコピー数の推定による染色体変異の解析が可能となってきた。その結果、染色体不安定性と発癌との関連についてより詳細に解析できるようになった。

卵巣癌は発症率に比して致死率が高く、婦人科癌において最も死亡率の高い悪性腫瘍である。同じ卵巣上皮由来でありながら、多数の組織型が存在し、分子生物学的にも多様であるため、その発癌過程の相違には未知の部分も多い。また、従来報告されている卵巣癌の解析の多くは卵巣癌で最も高頻度である漿液性腺癌が中心であり、欧米では症例の少ない明細胞腺癌や類内膜腺癌についての網羅的な解析は少ない。しかし、各組織型により発癌の背景、遺伝子異常の特徴が異なり、今後、個々の組織型により適した治療法を選択するためには、組織型毎の遺伝子異常についての解析が重要である。

本研究では高解像度 SNP タイピングアレイと発現マイクロアレイ技術を用いて染色体コピー数異常及び遺伝子発現異常を網羅的に解析することにより、いまだ遺伝子背景の不明な部分の多い明細胞腺癌や類内膜腺癌を中心に各組織型に特徴的な発癌のメカニズムを探り、個別の治療戦略を検討することを目的とした。

対象は卵巣癌の主な組織型である漿液性腺癌、明細胞腺癌、類内膜腺癌を中心とした 65 例の卵巣癌臨床検体とし、SNP タイピングアレイを用いて網羅的かつ高解像度にアレル別の染色体コピー数異常を解析するとともに、発現アレイを用いて遺伝子発現異常を網羅的に解析した。

SNP タイピングアレイによるゲノムコピー数解析の結果、コピー数解析を行った 56 症例のうち、12%の症例にはコピー数異常を認めず、それ以外の 88%の症例には少なくとも 1ヶ所以上のコピー数異常を認めた (CIN 陽性)。これらのコピー数異常の程度と部位とについて、各組織型における特徴を比較解析した。

コピー数異常を示す程度による特徴を比較するため、コピー数異常が 10 腕領域以上で生じている症例を CIN-high、1-9 腕領域で生じている症例を CIN-low、コピー数変化がないものを CIN-negative と分類したところ、漿液性腺癌では CIN-high の症例が 85%を占めており、臨床進行期に関わらずコピー数異常が高頻度に生じていることが明らかになった。一方、明細胞腺癌では CIN-low、CIN-negative の両方で 78%を占め、臨床進行期に関わらず、コピー数異常の頻度は低かった。類内膜腺癌については、臨床進行期が進むにつれ、コピー数異常が高頻度になる傾向にあった。

次に CIN 陽性例のコピー数異常の領域について解析をしたところ、明細胞腺癌では、

漿液性腺癌に比べて有意に染色体腕単位でのコピー数異常の比率が高く、特に全長が長い染色体に多く腕単位での異常が見られた。漿液性腺癌ではその領域は狭いものから腕単位のものまで多岐にわたっていた。また、明細胞腺癌では約 30%に 8 番染色体の特徴的なコピー数異常を認めた。すなわち、8p12-11 を境界とし、短腕側は染色体欠失、長腕側は染色体増加を示していた。また、片アレルのコピー数増加し、他方のアレルが欠失した片親性ダイソミー (UPD) を短腕に認める症例もあり、短腕が欠失した後、長腕が結合した同腕染色体を生じている可能性も考えられた。

実際にコピー数異常を認めた部位として、コピー数増加では 3 つの組織型に共通して、癌遺伝子 cyclin E2、MYC を含む 8q22.1-q24.13、8q24.21-24.3、20q13.13-13.33 で高頻度に認めた。漿液性腺癌、類内膜腺癌に共通した領域として 6p25.3-p12.3、漿液性腺癌に特徴的な部位として、3q26.1-28 で高頻度にコピー数増加を認めた。また、明細胞腺癌に特徴的な部位としては、今回新たに 8p11.21-q11.23 を同定した。

ヘテロ接合性の消失 (LOH) 領域については、全ての組織型に共通して高頻度に認めたのは、8p23.3-12 であった。漿液性腺癌、類内膜腺癌に共通して最も高頻度に LOH を認めたのは、癌抑制遺伝子 TP53、BRCA1、NF1 を含む 17p13.3-q21.2 であった。この領域は CGH では検出不可能であった UPD も含めると、漿液性腺癌での染色体欠失頻度は 92%に上がることが明らかとなった。一方で明細胞腺癌では 20%以下であり、17q には全く LOH を認めなかった。その他、漿液性腺癌では 4q、13q など様々な染色体で高頻度に LOH を認めた。

また、アレル別のコピー数解析により同定可能となったホモ欠失 (HD) 領域は 6 例 9 ヶ所、片親性ポリソミー/ダイソミー (UPP/UPD) 領域は 34 例 141 ヶ所であった。正常 DNA のコントロールを用いた SNP タイピングアレイがこれらの異常の同定に極めて有効であり、卵巣癌において HD、UPD を含むコピー数異常を高頻度に認めていることが明らかとなった。実際、本研究で同定された HD の 9 箇所のうち、2 箇所には 10q23.3-23.31; PTEN、13q14.2; RB1 の既知の癌抑制遺伝子を含んでいた。また、その他の HD 領域でも癌抑制遺伝子の可能性が指摘されている 4q35.2 に含まれる FAT や 13q13.3 に含まれる NBEA が含まれており、これらの遺伝子を含む領域では LOH を高頻度に認め、卵巣癌の

発癌に重要な遺伝子である可能性が考えられた。

UPP/UPD については全組織型に共通して高頻度に認めた領域はなかった。漿液性腺癌、類内膜腺癌で共に高頻度に UPP/UPD を認めたのは、TP53 を含む 17p13.1 であった。明細胞腺癌では癌遺伝子 PIK3CA を含む 3q26.31-q29 で高頻度に UPD を認めた。漿液性腺癌ではこの領域に含まれる 3q26.1-28 のコピー数増加が多く、UPD は 1 例と少ない。類内膜腺癌でも UPD を認めず、明細胞腺癌に特徴的な変化を示していた。

さらに、各組織型におけるコピー数異常発現に関与する主要なシグナル経路毎に比較することにより、各組織型の発癌過程の探索を行った。漿液性腺癌では発癌に関与する主要なシグナル経路のほとんどにコピー数異常を認め、その中でも各経路の中心的な TP53、RB1、PIK3CA、APC 遺伝子に高頻度にコピー数異常をきたしていた。特に TP53 は UPD を同定することにより、TP53 の異常がより多くの漿液性腺癌の発癌に関わっていることが明らかになった。一方、明細胞腺癌では RTK/RAS/PI3K シグナル経路で高頻度にコピー数異常が生じ、特に PIK3CA 領域に UPD を高頻度に認めた。PIK3CA 領域の UPD は報告がなく、本研究のアレル別解析によって初めて明らかになった。類内膜腺癌では、CIN(H)の症例に漿液性腺癌と同様、TP53 のコピー数異常を高頻度にコピー数異常を認めた。

発現解析では、解析を行った臨床検体 33 症例の発現アレイの結果を元に階層的クラスタリング解析を施行したところ、明細胞腺癌、漿液性腺癌の各々を中心とした 2 つのクラスター（I 型・II 型）に分類され、両者は遺伝子発現の特徴が異なることが明らかになった。類内膜腺癌は特異的な遺伝子発現プロファイルは示さず、早期癌でコピー数異常が少ない症例は I 型に、進行癌でコピー数異常が高頻度の症例は II 型のクラスターに分類された。これらの 2 群で特徴的な遺伝子セットについて解析すると、漿液性腺癌を中心とした I 型では p53 の経路、明細胞腺癌を中心とした II 型では RTK/RAS/PI3K の下流でもある hypoxia / HIF-1 の経路の異常を高頻度に認めた。

以上より、上皮性卵巣癌は同じ卵巣上皮由来でありながら、組織型毎に染色体コピー数異常や遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが明らかになった。漿液性腺癌では、進行期によらずコピー数異常の程度が強く、p53 経路の遺伝子群の発現異常が多いことか

ら、p53をはじめとする主要な癌抑制遺伝子の機能を正常化させる治療の開発が望まれる。一方、明細胞腺癌ではコピー数異常の頻度は少ないものの、RTK/RAS/PI3K 経路の癌遺伝子に UPD を高頻度に認め、HIF-1 経路の遺伝子発現異常を認めることから、RTK/RAS/PI3K 経路は有力な標的経路と思われた。類内膜腺癌においては、早期癌では明細胞腺癌に、進行癌では漿液性腺癌に類似した染色体コピー数異常の程度や遺伝子発現プロファイルを呈しており、今後この分類に即した治療法の検討は有用と考えられた。本研究をもとに個々の遺伝子発現異常の意義をさらに明確にしていくことで、分子生物学的背景を踏まえた治療法の開発など、臨床応用への発展性が期待される。