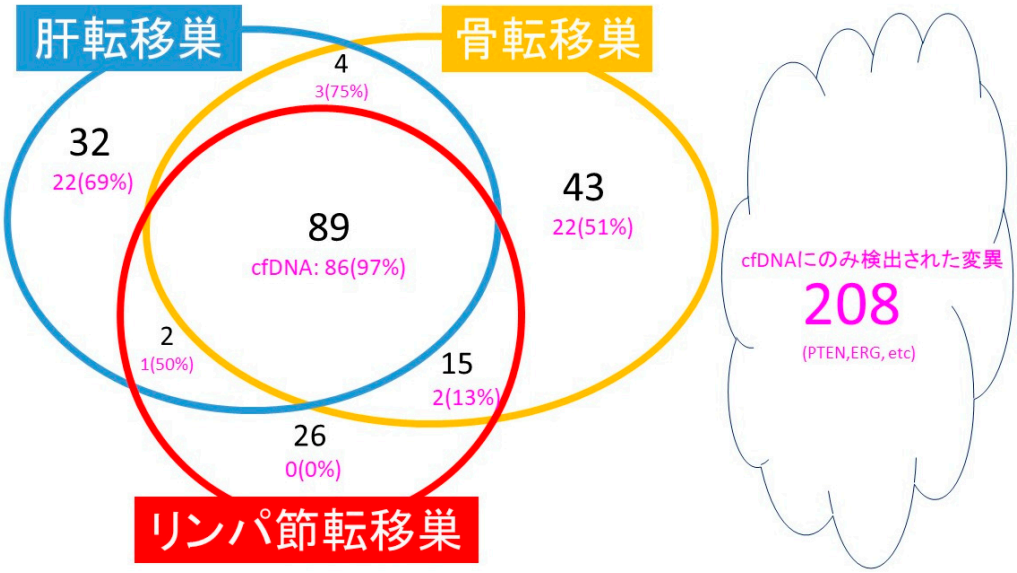
175　腫瘍内不均一性に着目したがんの病理解剖ゲノム研究	前田　大地

【目的】がん症例の病理解剖の際に採取、保存した屍体血中の遊離 DNA（cfDNA）をシーケンスし、全身の癌巣の genotype との比較検討を行うことで、血中 cfDNA がいかに全身のがんの不均一性を反映しているかについて明らかにする。

【方法】多発転移によって死に至った前立腺癌の病理解剖症例を対象に、凍結保存した 3 個の転移巣、屍体血中 cfDNA の全エクソンシーケンスを行った。転移巣において検出された変異、屍体血中 cfDNA において検出された変異を比較した。そして、屍体血中 cfDNA のみで検出された変異の由来を探究すべく、ホルマリン固定パラフィン包埋された多数の癌巣を対象にサンガーシーケンスを施行した。

【結果】全エクソンシーケンスを施行した 3 個の転移巣に共通した変異のほぼ全てが屍体血中 cfDNA のシーケンスによって検出された。個々の転移巣に固有の変異も多数存在したが、これらの一部は cfDNA 中に存在していた。なお、cfDNA においてのみ検出された変異の一つである *PTEN* に関して、ホルマリン固定された全身の癌巣を対象に変異の有無を確認したところ、検索した 14 個のリンパ節転移巣のうちの 1 個、15 個の肝転移巣のうちの 1 個、そして 2 個の肺転移巣のうちの片方において変異が検出された。

転移巣及び屍体血中 cfDNA の全エクソンシーケンスの結果



175. 腫瘍内不均一性に着目したがんの病理解剖ゲノム研究

前田　大地

*秋田大学 大学院医学系研究科 器官病態学講座

Key words：病理解剖，屍体血，遊離 DNA，全エクソンシーケンス

緒　言

日本における病理解剖の件数は 1970 年ころをピークに、死亡数に対する病理解剖施行数の率（剖検率）は 1990 年をピークに減少を続けている。その背景には、放射線画像診断、各種検査法の進歩によって、生前の臨床診断の精度が上がったことがある。言い換えると「死因の解明」のニーズが減ってきたということになる。事実、確定診断のついたがんの症例で、多発転移をきたして死亡するようないわゆる典型的な癌死の場合には、「死因が明らかなので、無理に遺族に病理解剖の同意を求めはしない」というスタンスをとる臨床医も多い。しかし、病理解剖の意義は、死因の解明と当該臨床医へのフィードバックのみではない。「死の記録を病理組織として残し、医学の進歩につなげる」という重要な意義があることを忘れてはいけない。病理解剖を施行した上で、最新の技術を用いた解析を行えば、従来の手法では見出せなかった知見が得られ、これは必ず医学の進歩に貢献するはずである。そのためには、病理医の側には古典的な肉眼所見と顕微鏡所見にとどまらず、ゲノミクスを含む様々な解析系を活用して病理解剖の質を改善させるような努力が求められよう。

一方、がん研究という観点から、病理解剖検体は非常に貴重である。生前に外科的に切除されるがんの病巣はそのほとんどが原発巣で、転移巣や播種巣、化学療法後の残存病変が摘出されてくる機会は限られている。結果的に、今までのがんの網羅的遺伝子解析のデータはほとんどが原発巣由来のものとなっている。しかし、多くのがん症例で患者を死に至らせるのは転移巣、播種巣、化学療法後の残存病変である。これら final killer の genotype に関する知見がきわめて乏しい中、病理解剖検体を有効に活用する動きが出始めている。

近年、欧米の大規模施設では、rapid autopsy と称して、病理解剖時に複数のがん病巣から凍結検体を採取し、全エクソン解析もしくは RNA-seq によってがんの clonal evolution や heterogeneity を評価する研究が進められてきている。その実際については谷内田らの論文に詳しい［1］。病理解剖は、全身の転移巣の genotype を包括的に解析できる実質唯一の機会である。また、病理解剖の対象となるがん症例は化学療法や分子標的薬による治療を経たものが多いことから、rapid autopsy は治療による修飾を評価する上でも有効な手段だと言える。

我々は全国に先駆けて Akita Rapid Autopsy Program（ARAP）を立ち上げ、2014 年以降ほぼ全例の病理解剖において凍結検体のサンプリングを行ってきた。ARAP の一つの目標は、転移巣や治療後の残存病変の網羅的遺伝子解析によってがんの clonal evolution を明らかにすると共に、転移、治療抵抗性に関わる遺伝子異常を同定することである。また、もう一つの目標として、稀少癌のゲノム異常解明を掲げてきた。その過程で、心臓内膜肉腫（心臓移植以外で心臓全体の組織を評価可能なのは病理解剖のみ）の全エクソン解析を施行し、新規遺伝子異常（*PDGFRβ*変異）の同定に至っている［2］。我々がこれら一連の取り組みの先に見据えているのは、病理解剖自体をポストゲノム時代相応のものに進化/深化させること、すなわち、ゲノムデータを反映させた次世代型の病理解剖診断を確立することである。

ARAP では独自の試みとして屍体血の凍結保存、及び屍体血中の遊離 DNA（cfDNA）の解析を行ってきた。所謂 liquid biopsy による cfDNA の評価、がんの病勢把握に多くの期待がかかっている今、がんが進行して亡くなった患者の屍体血中 cfDNA を解析し、その結果を「死の記録」の一部として残すことには十分な意義があると思われたからである。そして、前立腺癌の病理解剖例の解析から、屍体血中にがんの不均一性を反映した包括的なデータが含まれていることが明らかとなったので、以下にその内容を述べる。

*現在の所属：大阪大学 大学院医学系研究科 先端ゲノム医療学講座

方法および結果

1. 世界初の屍体血中 cfDNA 全エクソン解析を施行した症例

【剖検症例】50 代 男性

【依頼科】泌尿器科

【臨床診断】前立腺癌、骨転移、肝転移。肝不全。

【臨床検索希望事項】癌の広がり。ホルモン療法、化学療法に抵抗性であり、「普通の前立腺癌ではない」印象⇒何か病理学的に「普通の前立腺癌」と違いがないか教えて欲しい。

【臨床経過】初発の段階で画像上、骨転移あり。前立腺生検にて腺癌と診断（生前で唯一の病理組織検査）。様々な治療を試すも効果は一時的で、肝転移、リンパ節転移が出現。血清 PSA 値の上昇が続き、最終的には肝不全が前景に出た癌死で永眠。

【病理解剖所見】前立腺癌、多発骨転移、多発肝転移、多発リンパ節転移、副腎転移。直接死因は多発転移による肝不全。組織学的に前立腺の残存病変は微小で、一定の分化傾向と治療による変性が窺われたのに対し、転移巣はいずれも勢いのある低分化な癌であった。

2. サンプル及び解析の内容

A 群　（ホルマリン固定された癌巣）：数百。ホルマリンバケツ内に保存されている。

B 群　（ホルマリン固定後に、切り出しを行い、病理組織標本となった癌巣）：約 50 個。
これらは病理組織学的評価の対象となっている。

B’群　（B 群のうち、FFPE 検体からの DNA 抽出を行った癌巣）：約 35 個

C 群　（病理解剖時に凍結検体サンプリングを行った癌巣）:肝転移巣 3 個、リンパ節転移巣 3 個、骨転移巣 1 個、副腎転移巣 1 個。

C’群　（C 群のうち全エクソン解析を行った癌巣）：肝転移巣 1 個、リンパ節転移巣 1 個、骨転移巣 1 個。

D 群　（凍結した屍体血血漿）⇒ cfDNA の全エクソン解析へ。

3. 全エクソン解析

C’群の全エクソン解析を行った結果、図 1 に示す通り、骨転移巣、肝転移巣、リンパ節転移巣のそれぞれに固有の遺伝子変異が存在することが明らかとなった。同時に屍体血 cfDNA の全エクソン解析の結果から、骨・肝・リンパ節に共通して存在する変異（founder、もしくは clonal mutation に該当するもの）の 97%が cfDNA 中に存在することを突き止めた。これは（少なくともこの症例において）屍体血中 cfDNA の全エクソン解析さえ行えば、founder 変異のほぼ全てを検出できることを意味する。なお、肝転移巣、骨転移巣、リンパ節転移巣の全エクソン解析によってリストアップされた 211 個の変異のうち、cfDNA 中に検出されたのは 135 個にとどまる。これに関しては腫瘍量や検出感度による影響が考慮された。

続いて我々は、cfDNA のみに検出された 208 個の変異に着目した。この中には *PTEN* などの癌関連遺伝子の変異が含まれていた。これらの変異の由来を探究すべく、FFPE 検体である B 群に立ち返ってサンガーシーケンスを行った。マクロダイセクションによってゲノム抽出が可能であった B’群を対象に、cfDNA の全エクソン解析によって検出された *PTEN* 変異（c. 650 T > G）部位を挟むプライマーを用いた PCR ダイレクトシーケンスを行った結果を図 2 に示す。骨転移巣、肝転移巣、リンパ節転移巣の 3 個の凍結検体を用いた全エクソン解析では検出されず、cfDNA の全エクソン解析によって初めて認識された *PTEN* の変異は、検索した 14 個のリンパ節転移巣のうちの 1 個に、15 個の肝転移巣のうちの 1 個、そして 2 個の肺転移巣のうちの片方のみに検出された。

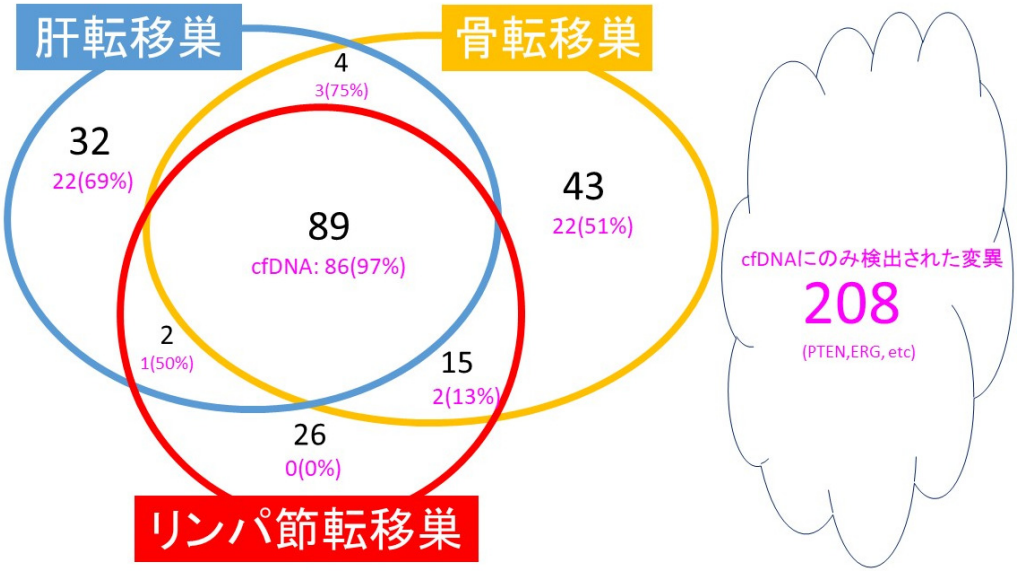


図 1. 前立腺癌病理解剖症例の全エクソン解析の結果

黒字は各転移巣で検出された変異の数。下段のピンク字は cfDNA においても検出された変異の数

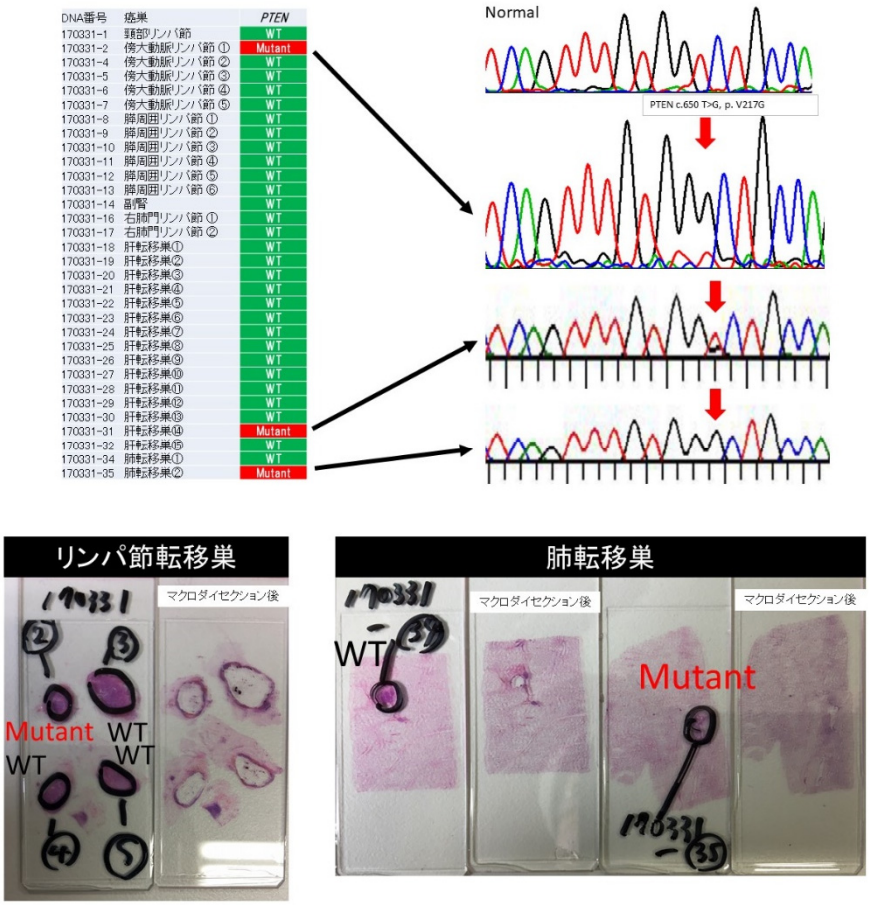


図 2. 全身の転移巣の FFPE 検体から抽出した DNA を用いた *PTEN* 変異解析の結果

考　察

本研究の結果をふまえると、屍体血中 cfDNA には全身の癌巣の不均一性を反映したゲノムデータが含まれていると言える。

Rapid autopsy によって全身の癌巣の不均一性を評価しようとした場合、一般的には「可能な限り多くの凍結検体サンプリングを行い、可能な限り多くの検体で網羅的遺伝子解析を行う」ことが目標とされがちである。しかしながら、今回のような症例では、無数に存在する転移巣の凍結検体を、病理解剖時に採取、保存するのは不可能に近い。また、全エクソン解析や RNA-seq が高額であることを考慮すると、一般的な施設で複数検体の解析を行うことは現実的ではない。今回の我々のデータは「仮に多数の凍結検体を用いて全エクソン解析を施行しても、全身のがんの不均一性を完全に把握することはできない」、すなわち「キリがない」ことを暗に示唆しており、マルティプルサンプリングの限界について考えさせられた。

がんの不均一性を反映するデータとして屍体血中 cfDNA を有効活用する方法があるのではないか？このような発想から、我々は modified rapid autopsy を考案するに至った。具体的には、第一段階として屍体血中 cfDNA の全エクソン解析を行う。そして、リストアップされてきた変異の中から、癌関連遺伝子や治療標的となりうる遺伝子に照準を絞る。その上で、通常の病理解剖 FFPE 検体から抽出した DNA を用いてサンガーシーケンスを行い、変異の分布、ばらつきを評価する。この方法をとれば、病理解剖時に凍結保存する必要がある検体、全エクソン解析の対象となる検体は血清のみとなり、労力面、金銭面において大幅なコストの削減が期待できる。ただちにゲノム解析に回すことがなくても、血清を保存しておくだけで将来的に学術的価値が生じる可能性があることを強調しておきたい。さらに踏み込んで言えば、遺族から病理解剖の同意が得られなかったとしても（現場では「これ以上痛い思いをさせないでほしい」という理由で断られるケースも多い）、末梢からの屍体血採取とその研究利用の同意が得られれば、生前の生検、手術検体との genotype の比較等と通して、がんの evolution、heterogneity に関して一定の評価が可能になるはずである。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学系研究科がんゲノム情報学講座谷内田真一と高井英里奈である。

文　献

1) Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. Nature. 2010 Oct 28;467(7319):1114-7. PMID: 20981102 PMCID: PMC3148940 DOI: 10.1038/nature09515

2) Ito Y, Maeda D, Yoshida M, Yoshida A, Kudo-Asabe Y, Nanjyo H, Izumi C, Yamamoto F, Inoue M, Shibata H, Katoh H, Ishikawa S, Nakamura H, Totoki Y, Shibata T, Yachida S, Goto A. Cardiac intimal sarcoma with PDGFRβ mutation and co-amplification of PDGFRα and MDM2: an autopsy case analyzed by whole-exome sequencing. Virchows Arch. 2017 Sep;471(3):423-42 PMID: 28474091 DOI: 10.1007/s00428-017-2135-x