

主 論 文

Comparative study on driver mutations in primary and metastatic melanomas at a single Japanese institute: A clue for intra- and inter-tumor heterogeneity
(原発、転移メラノーマにおけるドライバー変異の比較研究：腫瘍内、腫瘍間不均一性について)

【緒言】

白人のメラノーマの遺伝子変異パターンは病型分類(CSD, non-CSD, acral, mucosal)との関連が知られており、それらの病型の頻度は人種によって異なることが報告されている。一方、発癌において遺伝子変異には不均一性があり、原発巣においても異なる遺伝子変異を持つ複数のサブクローニング認められることが報告されている。本研究では日本人のメラノーマ患者におけるドライバー変異の頻度とパターンを検討し、メラノーマの原発巣に複数のドライバー変異が存在し得ること、原発巣の遺伝子変異が転移巣で変化し得ることを検証することを目的とした。

【材料と方法】

症例と検体

本研究は岡山大学病院倫理委員会の承認と、患者の同意を得て実施した。診断目的あるいは外科的治療の結果、60 症例から 77 検体を得た。症例の内訳は、CSD 5 例、non-CSD 26 例、acral 21 例、mucosal 2 例、原発不明 6 例であった。原発巣を 23 例、転移巣を 20 例、原発巣と転移巣を 17 例から得た。

ドライバー変異の検出

原発巣、転移巣のパラフィン切片より抽出した DNA を PCR 法にて増幅し、遺伝子解析用マスアレイシステム(MelaCarta Panel v1.0)を用いて解析した。本パネルは、BRAF, NRAS, KIT を含めた 20 種類の既知のメラノーマ癌遺伝子の 70 ドライバー変異を網羅的に高感度で検出できる。

症例の病型と遺伝子変異の比較

検出されたドライバー変異を症例の臨床データと比較した。同一症例での原発巣と転移巣とで検出されたドライバー変異を比較した。

免疫組織化学染色

メラノーマ組織について抗 HMB45 抗体、Tyrosinase 抗体、MART-1 抗体を用いて免疫組織化学染色にて検討した。

統計解析

統計解析はフィッシャーの正確検定を用いた。P 値<0.05 をもって有意差ありと判定した。

【結果】

BRAF 変異の検出率

BRAF 遺伝子変異は non-CSD26 例中 14 例(54%)、原発不明 6 例中3例(50%)で同定された。BRAF 変異陽性率は、CSD 群と比較して non-CSD 群で有意に高かった(non-CSD;14/26、CSD;0/5、P=0.0482)。原発巣と転移巣との比較では有意差を認めなかった(原発巣;10/40, 転移巣;0/5、P=0.6144)。

原発巣、転移巣での遺伝子変異の不均一性

原発巣 40 検体中4検体(10%)において、複数の遺伝子変異が検出された(症例 8; NRAS Q61R + EPHB6 G404S、症例 12; CDK4 R24H + EPHB6 G404S、症例 35; BRAF V600E + CDK4 R24C、

症例 36; EPHB6 G404S + KRAS G12A + NEK10 E379K)。転移巣 37 検体中 3 検体(8%)においても、複数の遺伝子変異が検出された(症例 35:BRAF V600E + BRAF V600K、症例 58:BRAF V600E + CDK4 R24C、症例 59:EPHB6 G404S + PDGFRA E996K + ERBB4 E452K)。遺伝子変異の不均一性は原発巣、転移巣それぞれにおいて存在することが示唆された。

同一症例での原発巣、転移巣におけるドライバー変異の比較

17 症例において、原発巣・転移巣の両検体を検索した。6 症例において、両検体から遺伝子変異を検出した。症例 15 は両検体から BRAF V600E 変異を検出した。3 症例では、原発巣で検出されたドライバー変異が転移巣で変化していた(症例 35:BRAF V600E + CDK4 R24C → BRAF V600E + BRAF V600K、症例 16 と症例 22:BRAF V600E → CDK4 R24C)。2 症例では、原発巣で検出された複数の遺伝子変異のうち、転移巣では 1 つの遺伝子変異のみが検出された(症例 8:NRAS Q61 + EPHB6 G404S → NRAS Q61R、症例 36:EPHB6 G404S + KRAS G12A + NEK10 E379K → EPHB6 G404S)。4 症例では、原発巣で検出された BRAF V600E 変異が転移巣では検出されず、2 症例では転移巣で検出された BRAF V600E 変異が原発巣で検出されなかった。腫瘍間においても、遺伝子変異の不均一性が存在することが示唆された。

免疫組織化学染色での検討

原発巣、転移巣とで検出された遺伝子変異が異なっていた症例について、HMB-45、MART-1、チロシナーゼについて免疫染色を行い検討したが、各症例において明らかな染色性の違いは認めなかった。

[考察]

白人での報告と同様に、本研究においても non-CSD メラノーマにおいて、特に若年層では BRAF 遺伝子変異が最も多く検出された。また、原発不明メラノーマ 6 症例のうち 3 例にても BRAF 遺伝子変異が検出されており、原発不明群の遺伝子変異パターンは non-CSD 群のパターンと類似しており、原発不明メラノーマの中には、一定の割合で皮膚原発(原発巣が消失)したメラノーマが含まれていることが示唆された。本研究では 60 症例中 28 症例(47%)で遺伝子変異が検出されず、これまでの報告と比べてその頻度は多かった。病期別に遺伝子変異の陽性率を検討すると、病期 I,II 群において遺伝子変異が検出されない頻度が多く、病期の早い症例においては検索した組織の腫瘍量が少ないことが検出率が低くなった原因ではないかと考えられた。原発巣 40 検体中 4 検体(10%)において複数の遺伝子変異が検出され、うち 2 症例では原発巣で検出された遺伝子変異のうち 1 つの遺伝子変異のみが転移巣で検出された。この結果はこれまで報告されている腫瘍内、腫瘍間の遺伝子変異の不均一性の概念に合致しており、メラノーマ原発巣に複数のドライバー変異を持つクローニングが存在し、それらのクローニングのいずれかが転移を生じたことを示唆している。原発巣において BRAF 変異のみが検出されたものの、転移巣では遺伝子変異が検出されなかった症例を 4 例、転移巣では遺伝子変異が CDK4 変異に変化した症例を 2 例認めた。この結果は、原発巣に存在していた BRAF 変異以外のマイナーなクローニングが転移を生じたものと考えられた。一方で、原発巣では遺伝子変異が検出されず、転移巣で BRAF 変異が検出された症例も 2 例存在し、これらの症例では転移を生じた後にクローニングが BRAF 変異を獲得したことが示唆された。これらの結果をふまえると、BRAF 変異はメラノーマの進展において必ずしも初期の遺伝子変異ではなく、腫瘍の進展における原発腫瘍内、原発・転移腫瘍間の遺伝子変異の不均一性を強く示唆しているものと考えられた。検出された遺伝子変異が変化している症例において、原発巣・転移巣での免疫染色態度に変化は認められず、免疫染色を用いて遺伝子変異の変化を予想することは困難と思われた。

[結論]

BRAF V600E 変異は non-CSD メラノーマ患者において主な遺伝子変異である。遺伝子変異の不均一性はメラノーマの原発巣において、原発巣と転移巣の間においても存在することが示唆された。