

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	御 子 柴 飛 鳥
論文審査担当者	主 査 柴 祐 司 副 査 竹 下 敏 一・菅 野 祐 幸
論文題目	Detecting copy number alterations of oncogenes in cell-free DNA to monitor treatment response in acral and mucosal melanoma (末梢血中の Cell-free DNA のコピー数異常を用いた肢端型・粘膜型メラノーマ患者での治療効果の評価)

(論文の内容の要旨)

[背景と目的]

進行期メラノーマの治療はここ数年で目覚ましく進歩した。個々人にあつた治療を進めていく上で、治療効果を正確に反映するバイオマーカーが必要である。現在、Lactate Dehydrogenase (LDH) が広く使われているが、非特異的なことも多く、病勢を反映するマーカーが必要とされている。Circulating tumor DNA (ctDNA) は、末梢血中の腫瘍由来の DNA であり腫瘍細胞と同様の遺伝子異常を有している。メラノーマでは、*BRAF*や*NRAS*の変異 DNA をターゲットとして、ctDNA が解析されている。メラノーマはサブタイプごとに、遺伝子変異に特徴を有しており、表在拡大型では *BRAF*変異の頻度が高い。しかし、黄色人種に多い肢端型、粘膜型では特異的な遺伝子変異が少なく、ctDNA の解析が進んでいない。一方で肢端型、粘膜型メラノーマでは、Copy number alterations (CNA) の頻度が高いとされ、癌遺伝子である *KIT*、*CDK4*、*CCND1* でもしばしばコピー数が増加し、メラノーマの増殖との関連が指摘されている。そこで、肢端型、粘膜型メラノーマにおいて、*KIT*、*CDK4*、*CCND1* の CNA の頻度を調べた。さらに、末梢血中から DNA を分離し *KIT*、*CDK4*、*CCND1* の Copy number ratio (CN ratio) を定量し、メラノーマの病勢を反映するバイオマーカーになりうるか検討することとした。

[材料及び方法]

本研究では、メラノーマ患者 37 人 (肢端型 27 人、粘膜型 10 人) を対象とした。Droplet digital PCR を用いて CN ratio を解析し、CN ratio は標的遺伝子/*APOB* 遺伝子 (reference gene) $\times 2$ で計算した。Copy number gain (CN gain) は、カットオフ値より大きい値と定義した。

[結果]

対象患者の腫瘍組織を用いて遺伝子変異 (*BRAF*、*NRAS*、*KIT*) の頻度を調べた。いずれの遺伝子変異も有しない症例が肢端型では 55.6%、粘膜型では 90%と半数以上であり、変異型 ctDNA はバイオマーカーとして不適であった。一方、*KIT*、*CDK4*、*CCND1* の CN ratio を定量すると、1 つ以上の遺伝子で CN gain を認める症例は肢端型では 62.9%、粘膜型では 70% と高頻度であった。また免疫染色の結果から、CN ratio が高いことがタンパク質の高発現に関与していると思われた。これらの結果から *KIT*、*CDK4*、*CCND1* の CN ratio を肢端型、粘膜型のメラノーマ患者の末梢血でモニタリングできないか検討することとした。腫瘍組織の CN ratio が上昇していた患者 24 人を対象とし、末梢血の DNA を用いて腫瘍由来の CN gain を検出できるか調べた。*KIT* と *CCND1* では末梢血の CN ratio は健常人と比較してメラノーマ患者で有意に上昇していた。また、臓器転移 (リンパ節転移を除く) がある患者は、ない患者と比較し血漿の CN ratio が有意に上昇しており、その中でも腫瘍組織の CN ratio が高い患者では特に末梢血の CN ratio が高かった。以上より、組織の CN ratio が高かつ全身の腫瘍量が多い患者では末梢血の CN ratio が上昇しており、*KIT*、*CDK4*、*CCND1* の CN ratio がバイオマーカーになり得ると考えた。実際に、腫瘍組織の CN ratio が高く

臓器転移がある場合、病勢の変化に応じての末梢血の CN ratio が変化した。ただし、腫瘍組織の CN ratio が高い点、臓器転移がある点の両者を満たさない場合、末梢血の CN ratio は病勢に応じて変化せず感度は高いと言えなかった。

〔結論〕

肢端型、粘膜型のメラノーマでは *KIT*、*CDK4*、*CCND1* の CN gain を高頻度に認め、これらの CN gain はタンパク質発現を介して腫瘍の病態に関わると思われた。また、腫瘍組織の CN ratio が高く、臓器転移（リンパ節転移を除く）がある患者においては、末梢血の CN ratio が病勢に応じて変化した。LDH は簡便かつ頻回に採取でき汎用性あるマーカーであるが、非特異的に上昇することがある。画像検査は正確だが頻繁な実施は困難である。肢端型、粘膜型のメラノーマでは、末梢血の CN ratio を LDH や画像検査とともに用いることでより正確な病勢の評価が可能になると考えた。