

XCL1発現に着目した卵巢成熟嚢胞性奇形腫悪性転化症例に対する新規治療戦略の構築

新潟大学医学部産科婦人科 助教 田村 亮

要約

先行研究において、卵巢成熟嚢胞性奇形腫から発生した扁平上皮癌で、*TP53*と*PIK3CA*の遺伝子変異を高頻度に認めること、また細胞障害性T細胞の活性化の過程で重要な役割を持つXCL1が特徴的に高発現し、その発現がCD8陽性リンパ球の腫瘍浸潤および腫瘍PD-L1発現と相関があることを明らかにした。先行研究の結果から、本疾患の発生・進展に*TP53*、*PIK3CA*の変異が重要であることや、本疾患の多くに抗PD-1抗体が有効な可能性が示唆された。しかし、課題として、腫瘍組織の一箇所のためのサンプリングであり、遺伝子変異がどのように空間的に広がりを見せているのか明らかにできていないこと、XCL1発現や腫瘍リンパ球浸潤が少ない症例に対して治療方法を、提案できていないことが挙げられる。そこで本研究では、①同一症例の正常上皮を含む複数の部位に対して網羅的解析を行うことで、腫瘍内不均一性を明らかにすること、②XCL1発現に基づくサブグループの特徴を明らかにし、*in vitro/vivo*で薬剤感受性を評価することで、さらなる治療戦略を構築することを目的とした。今回、上記①を目的とし、2症例に対して腫瘍内の正常上皮部分や複数の癌部分からマルチサンプリングを行い、網羅的ゲノム解析を行った。いずれの症例でも腫瘍内に組織学的異質性が存在し、(症例1: 非角化型扁平上皮癌および角化型扁平上皮癌、症例2: 非角化型扁平上皮癌および未分化癌)、組織型ごとに異なる遺伝子異常のプロファイルを有していた。また症例1では正常上皮を含む全ての部位で*TP53*変異を認めたのに対し、症例2では非扁平上皮癌の部分でのみ*TP53*の変異を認めた。いずれの症例も*PIK3CA*は非角化型扁平上皮癌でのみ認められた。今回の研究により、本疾患の発生・進展における多様性や組織学的・分子生物学的に強い腫瘍内異質性が明らかとなった。

緒言

卵巢成熟嚢胞性奇形腫は最も頻度の高い良性卵巢腫瘍であり、生殖年齢の女性を中心に幅広い年齢層で生じる。また卵巢成熟嚢胞性奇形腫は約1%で悪性転化するが、その発生機序は不明である。悪性転化症例に対する標準治療は確立しておらず、化学療法抵抗性であり、進行症例の5年生存率は20%以下と極めて不良である¹。そのため、悪性転化の発生機序の解明とその分子生物学的特徴に基づいた新規治療薬の開発は喫緊の課題である。しかし、疾患自体の頻度が少ないこと、術前・術中の診断が難しいなどの複数の要因により、検体採取自体が困難であり、臨床検体を用いたオミックス解析が行われていなかった。我々は先行研究にて、卵巢成熟嚢胞性奇形腫悪性転化 8症例に対して、統合オミックス解析を行い、大規模データベースと比較することで、本疾患における分子生物学的特徴を明らかにした²。先行研究の重要な点として、卵巢成熟嚢胞性奇形腫から発生した扁平上皮癌において*TP53*と*PIK3CA*

の遺伝子変異を特徴的に高頻度で認めること、また細胞障害性T細胞の活性化の過程で重要な役割を持つXCL1が本疾患で特徴的に高発現していることを明らかにしている。さらに腫瘍XCL1発現が免疫チェックポイント阻害薬の奏効を予測する有力なバイオマーカーになる可能性があること、CD8陽性リンパ球の腫瘍浸潤および腫瘍PD-L1発現と相関があることを見出した。このことより、本疾患に対して抗PD-1/PD-L1抗体が奏効する可能性が示唆された。

先行研究の課題として、一箇所のためのサンプリングであり、遺伝子変異がどのように空間的に広がりを見せているのか明らかにできていないこと、XCL1発現や腫瘍リンパ球浸潤が少なく、免疫学的にcoldな症例に対して治療方法を、提案できていないことが挙げられる。そこで本研究では、①同一症例の正常上皮を含む複数の部位に対して網羅的解析を行うことで、腫瘍内不均一性を明らかにすること、②XCL1発現に基づくサブグループの特徴を明らかにし、*in vitro/vivo*で薬剤感受性を評価することで、

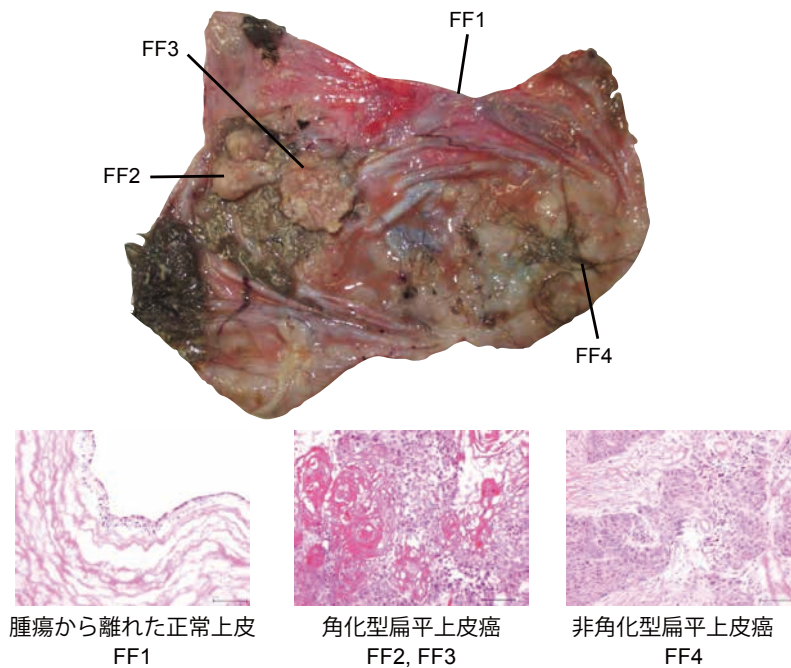


図1. 検体採取部位と病理所見 (症例1)

症例1: 50歳代、進行期IIB期 (非角化型扁平上皮癌+ 扁平上皮癌)

さらなる治療戦略を構築することを目的とした。

しかし、*in vitro/vivo*での検証に関しては予定していた実験リソースの作成に苦慮しており、報告できる段階に至っていない。今回の助成期間においては、①を目的とし、2症例に対して腫瘍内の正常上皮部分、正常と癌の移行部、複数の癌部分からマルチサンプリングを行い、網羅的ゲノム解析を行った結果を報告する。

方法

本研究は、新潟大学遺伝子倫理委員会の審査・承認の下で実施した。

1. 同一腫瘍内の複数部位からの検体サンプリング

症例1は、50歳代、進行期IIB期の角化型扁平上皮癌、非角化型扁平上皮癌が混在する症例であった。腫瘍内には隆起した腫瘍部分(主に角化型扁平上皮癌)と、周囲に浸潤性に広がる腫瘍部分(主に非角化型扁平上皮癌)が混在し、転移巣である腹膜播種病変は、非扁平上皮癌であった。腫瘍から離れた正常上皮部分(Case1_FF1)、2箇所の隆起した部分(Case1_FF2, FF3)、浸潤性に広がる部分(Case1_FF4)をそれぞれ採取した(図1)。症例2は70歳代、進行期IIIC期の未分化癌と非角化型扁平上皮癌が混在する症例であった、主病変の充実性腫瘍部分

や小腸転移部分は未分化癌であり、浸潤性に広がる腫瘍部分は非扁平上皮癌であった。正常上皮部分(Case2_FF1)、複数箇所の浸潤性に広がる腫瘍部分(Case2_FF2, FF3)、主病変の充実性腫瘍部分(Case2_FF4)、小腸間膜転移部分(Case2_FF5)をそれぞれ採取した(図2)。

2. 凍結検体を用いたDNA抽出と全エクソンシーケンス

それぞれの症例の正常上皮部分、腫瘍部分、またコントロールとして血液からDNAを抽出し、全エクソンシーケンスを行った後に、遺伝子変異、コピー数変化について解析し、検体間での類似性を確認した。また先行研究において同定した、本疾患に特徴的に病的変異の頻度が高い遺伝子である *TP53*、*PIK3CA* の変異ステータスについて、それぞれの部位で評価を行った。

3. ホルマリン固定検体からのレーザーマイクロダイセクションを用いたDNA抽出と全エクソンシーケンス (症例1)

組織所見と遺伝子変異の関連をより明らかにするため、症例1に対してレーザーマイクロダイセクションを用いて、腫瘍と連続する正常組織や異形成部分、複数箇所の角化型扁平上皮癌および非角化型扁

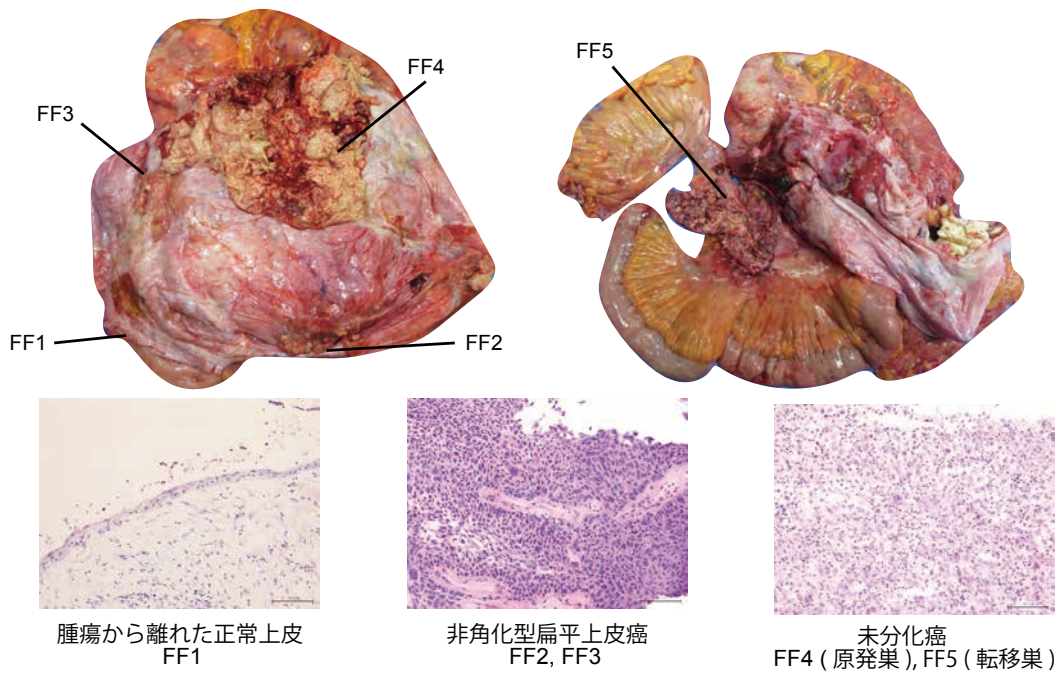


図2. 検体採取部位と病理所見 (症例2)

症例2: 70歳代、進行期III期 (非角化型扁平上皮癌+ 未分化癌)

扁平上皮癌についてそれぞれDNAを採取し、全エクソンシーケンスを行った。それぞれの部位でのTP53、PIK3CAの変異ステータス、凍結検体で角化型および非角化型扁平上皮癌で同定した変異が、それぞれの検体でどれだけ共有されているかを調査した。

結果

1. 凍結検体を用いた全エクソンシーケンス (症例1, 2)

全遺伝子を対象に各部位での遺伝子変異の共有の程度を評価した。その結果、組織型毎で多くの遺伝子変異を共有しており、症例1では角化型扁平上皮癌のFF2とFF3が、症例2では、非扁平上皮癌であるFF2とFF3が、また未分化癌であるFF4とFF5が多くの遺伝子変異を共有していた。症例2の正常上皮部分ではほとんど遺伝子変異が同定されなかった(図3A)。

次に、COSMIC Cancer gene census³に登録されている癌関連遺伝子の異常について評価した。先行研究において、本疾患に特徴的に高頻度に認めるTP53、PIK3CA遺伝子変異に着目すると、症例1では正常上皮を含む全ての検体でTP53の変異を同定したのに対し、症例2では非角化型扁平上皮癌の検体のみでTP53の変異を認めた。PIK3CAのHotspot変異(p.Glu545Lys)に関しては、いずれの検体も非

扁平上皮癌の検体のみで認めた。その他の癌関連遺伝子に関しても、全遺伝子と同様に組織型毎に異なる変異を共有していた(図3B)。

2. ホルマリン固定検体を用いた全エクソンシーケンス (症例1)

同一切片内の連続する癌領域と連続した正常扁平上皮、異形成上皮、角化型扁平上皮癌、非角化型扁平上皮癌 (FFPE1-4)、さらに異なる部位から角化型扁平上皮癌 (FFPE5, 6)、非角化型扁平上皮癌 (FFPE7, 8)をそれぞれレーザーマイクロダイセクションを用いてサンプリングした(図4A)。TP53、PIK3CAに着目すると全ての部位でTP53変異を共有しており、PIK3CAの変異に関しては、角化型扁平上皮癌の検体を除いて同定された。さらに非角化型扁平上皮癌の部分では、さらなる新たなPIK3CAの変異(p.Asp626Asn)が加わっていた。両遺伝子のアレル頻度はいずれの部位でも高かった(図4B)。凍結検体で角化型・非角化型扁平上皮癌のみで同定した変異について個数を調べてみると、組織型ごとに空間を超えて遺伝子変異を共有しており、また同一切片内の正常上皮部分 (FFPE1)・異形成部分 (FFPE2)は非角化型扁平上皮癌部分との遺伝子変異の共有が多かった(図4C)。

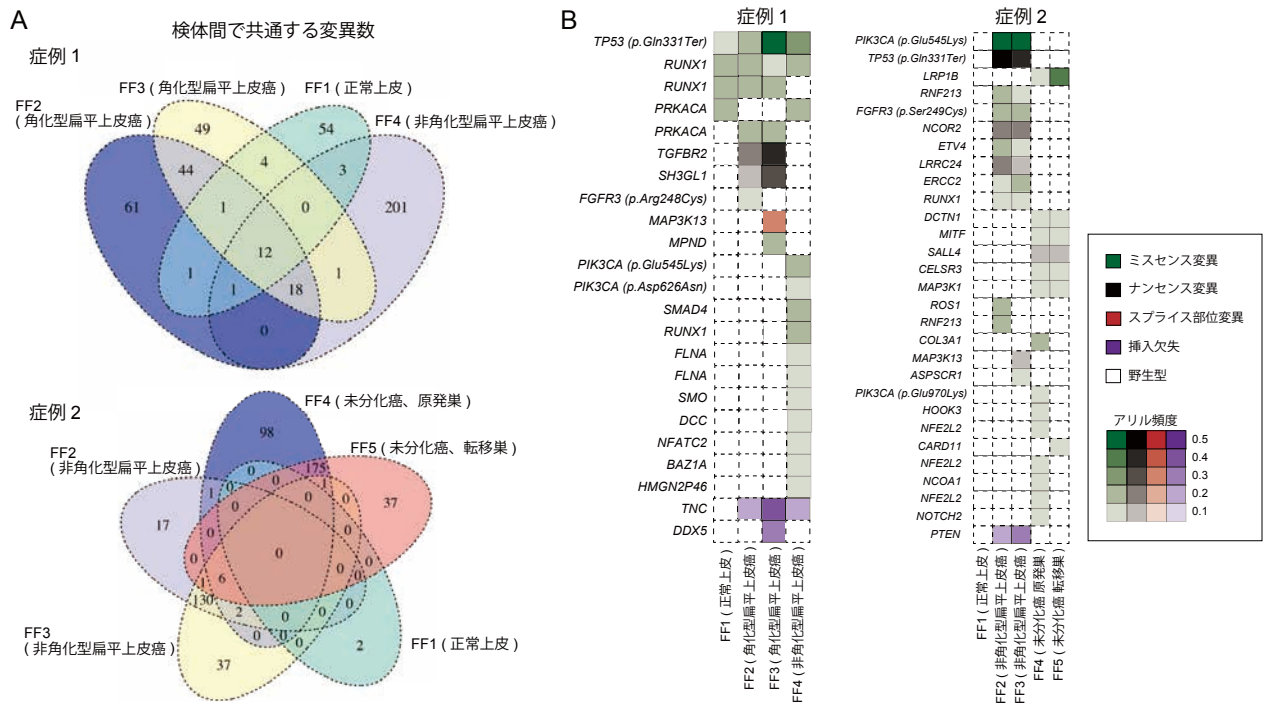


図3. マルチサンプリングを行った各部位の遺伝子異常プロファイル

A. 検体間の共通する遺伝子変異数。Vendiagramは共通する遺伝子変異の数を示している。
 B. COSMIC Cancer Gene Censusに登録されている癌関連遺伝子の異常。ヒートマップは遺伝子異常の種類とアレル頻度を示している。

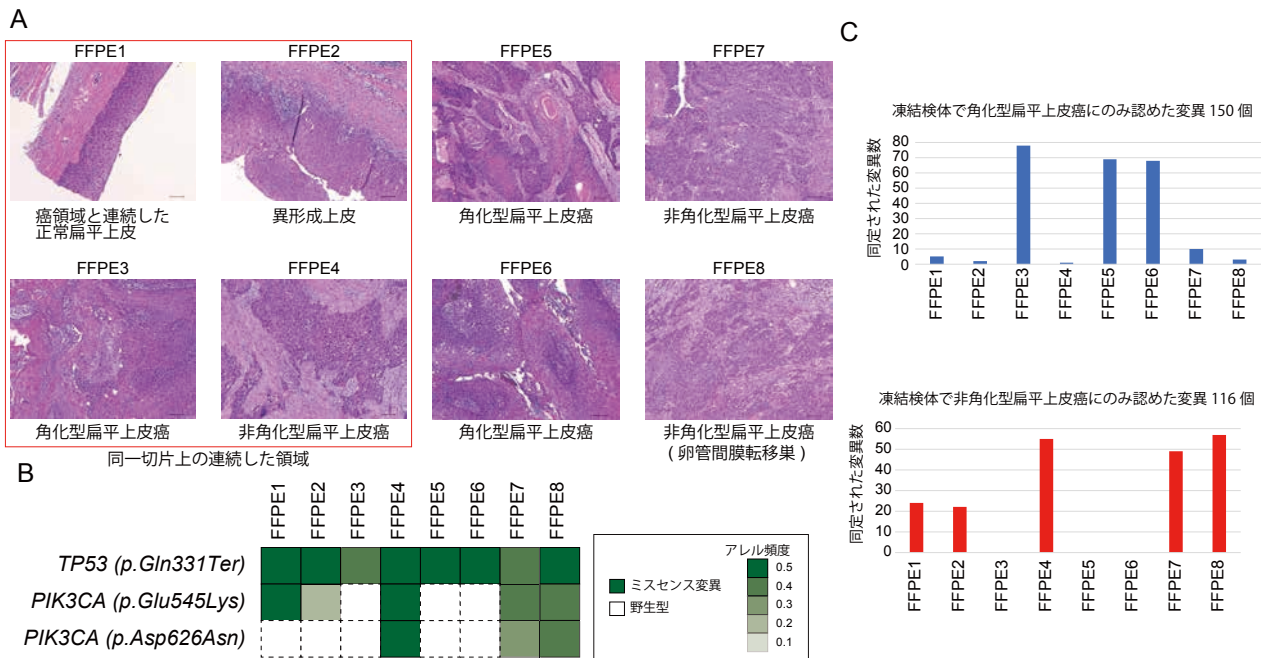


図4. ホルマリン固定検体を用いた組織型毎の複数部位でのマルチサンプリング

A. レーザーマイクロダイセクションを行った8領域の病理所見。FFPE1-4は同一切片。
 B. 各部位でのTP53とPIK3CAの変異ステータスとアレル頻度
 C. 凍結検体で角化型・非角化型扁平上皮癌のみに認められた遺伝子変異の各部位での共有

考 察

今回、卵巣成熟嚢胞性奇形腫悪性転化2症例に対して、複数箇所からサンプリングを行い網羅的ゲノム解析をすることで、症例により遺伝子変異の広がりにより多様性があること、腫瘍内不均一性があり組織型に応じて異なる遺伝子プロファイルを持つことを同定した。腫瘍内不均一性は、癌腫横断的調査で多くの腫瘍に認められ、治療抵抗性やゲノム不安定性に影響しているとされる⁴。本疾患では腫瘍内により様々な肉眼的・組織学的所見を認め、これまでも腫瘍内に異なるがん成分が混在していた報告が複数あり⁵、症例2のような未分化癌と扁平上皮癌が混在する症例も報告されている⁶。今回、症例1のように扁平上皮癌でも角化型・非角化型では遺伝子プロファイルが異なっていること、症例2のような複数の組織型が混在していること腫瘍ではそれぞれ別の遺伝子プロファイルを持っていることを同定した。また、症例1では、非角化扁平上皮癌の成分のみが、症例2では未分化癌の成分がそれぞれ転移していた。今回の研究から、本疾患の治療を考える際に、その腫瘍の中でどの成分か病状増悪や予後に影響しうるかを慎重に考慮し、治療や遺伝子検査を進めていく必要があると考えられる。

いずれの症例でも本疾患に特徴的である *TP53* と *PIK3CA* の遺伝子変異を認めたが、その腫瘍内での広がりには2症例で異なっていた。*TP53* に関しては、症例1では嚢胞内に広範囲に広がっているのに対し、症例2では非角化型扁平上皮癌の部分でのみ認めた。症例1では *TP53* が嚢胞全体に広がり、そこから遺伝子変異が蓄積し、角化型・非角化型のクローンが発生したこと、また症例2では嚢胞内の局所に *TP53* の病的変異が生じ、その部分に非角化型扁平上皮癌が発生したことが推察される。一方、*PIK3CA* 変異については凍結検体の解析では、いずれの症例も非扁平上皮癌が部位でのみ認め、本疾患の非角化型扁平上皮癌への分化に関与している可能性が示唆される。症例1において、同一切片内に正常上皮、異形成上皮、角化型扁平上皮癌、非角化型扁平上皮癌が混在していた部位では、正常上皮や異形成の部分にも *PIK3CA* (p.Glu545Lys) 変異を認めており、遺伝子変異も非角化型扁平上皮癌と共有している遺伝子変異が多く、非角化型扁平上皮のクローンに近づいている変化が起こっているものと考えられる。また非角化型扁平上皮癌の部分にはさらに1つ *PIK3CA*

(p.Asp626Asn) 変異が加わっていた。*PIK3CA* の複数箇所の変異は癌遺伝子の機能の増強と関連している可能性が報告されており⁷、今回の症例においても phenotype の変化に影響していた可能性がある。

今回の報告は2症例のみの検討であり、今後さらなる症例数を追加しての腫瘍の発生・進展や腫瘍内異質性の検証が必要である。また、卵巣成熟嚢胞性奇形腫の腫瘍内環境が様々な部位の発癌に影響している可能性が高く、その機序解明は今後の課題である。引き続き計画した研究を遂行し、本疾患における分子生物学的特徴のさらなる解明と新規治療戦略の構築を進めていきたい。

参考文献

- 1 Hackethal, A., Brueggmann, D., Bohlmann, M. K. et al. Squamous-cell carcinoma in mature cystic teratoma of the ovary: systematic review and analysis of published data. *Lancet Oncol* 9, 1173-1180, doi:10.1016/S1470-2045(08)70306-1 (2008).
- 2 Tamura, R., Yoshihara, K., Nakaoka, H. et al. XCL1 expression correlates with CD8-positive T cells infiltration and PD-L1 expression in squamous cell carcinoma arising from mature cystic teratoma of the ovary. *Oncogene* 39, 3541-3554, doi:10.1038/s41388-020-1237-0 (2020).
- 3 Forbes, S. A., Beare, D., Gunasekaran, P. et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* 43, D805-811, doi:10.1093/nar/gku1075 (2015).
- 4 Andor, N., Graham, T. A., Jansen, M. et al. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nat Med* 22, 105-113, doi:10.1038/nm.3984 (2016).
- 5 Allam-Nandyala, P., Bui, M. M., Caracciolo, J. T. & Hakam, A. Squamous cell carcinoma and osteosarcoma arising from a dermoid cyst--a case report and review of literature. *International journal of clinical and experimental pathology* 3, 313-318 (2010).
- 6 Aryal, V., Maharjan, R., Singh, M. et al. Malignant transformation of mature cystic teratoma into undifferentiated carcinoma: A case report. *Clin Case Rep* 9, e05240, doi:10.1002/ccr3.5240 (2021).
- 7 Saito, Y., Koya, J., Araki, M. et al. Landscape and function of multiple mutations within individual oncogenes. *Nature* 582, 95-99, doi:10.1038/s41586-020-2175-2 (2020).

Abstract

We previously found that squamous cell carcinoma arising from mature cystic teratoma of the ovary showed a high frequency of *TP53* and *PIK3CA* mutations, and a specific high expression of XCL1. The expression of XCL1 was correlated with tumor infiltration of CD8 lymphocytes and tumor PD-L1 expression. These results suggest that *TP53* and *PIK3CA* mutations are important in the development and progression of this tumor, and that anti-PD-1 antibodies may be effective in majority of this tumor. In this study, we aimed to clarify intratumor heterogeneity by performing a comprehensive analysis of multiple sites including normal epithelium in the same patient, characterize subgroups based on XCL1 expression, and evaluate drug sensitivity in vitro and in vivo to develop further treatment strategies. In this time, we performed genomic analysis for multi-sampling from normal epithelial parts and multiple cancerous parts in the two cases. Both cases showed histological heterogeneity within the tumors (case 1: non-keratinizing squamous cell carcinoma and keratinizing squamous cell carcinoma, case 2: non-keratinizing squamous cell carcinoma and undifferentiated carcinoma), and each histological type had a different profile of genetic alterations. In case 1, *TP53* mutations were found in all sites including normal epithelium, whereas in case 2, *TP53* mutations were found only in non-keratinizing squamous carcinoma. In both cases, *PIK3CA* was found only in non-keratinizing squamous cell carcinoma. Our study revealed the diversity in the development and progression of this tumor and the strong intratumor heterogeneity in histology and molecular biology.