

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

|         |                                                                                                                                                            |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名      | 大湊 絢                                                                                                                                                       |
| 学位      | 博士 (医学)                                                                                                                                                    |
| 学位記番号   | 新大院博 (医) 第 789 号                                                                                                                                           |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当                                                                                                                                           |
| 博士論文名   | The Role of Mutation Rates of GNAQ or GNA11 in Cases of Uveal Melanoma in Japan<br>(日本人ぶどう膜悪性黒色腫症例における GNAQ 遺伝子及び GNA11 遺伝子の変異率と遺伝子変異と臨床病理学的所見との関連についての検討) |
| 論文審査委員  | 主査 教授 五十嵐 道弘<br>副査 教授 梅津 哉<br>副査 教授 味岡 洋一                                                                                                                  |

博士論文の要旨

<背景・目的>

ぶどう膜悪性黒色腫 は成人の最も頻度の高い原発性眼内悪性腫瘍である。発症頻度は日本人では 100 万人に 0.25 人, 白人では 100 万人で 6 人と報告されている。その多くは脈絡膜原発で, 少数例では毛様体 (6%)・虹彩 (4%) が原発とされる。10 年累積転移率は 50%前後との報告があり, 一度転移が生じると予後はおよそ 8 か月程度で眼科疾患の中でも生命予後が悪い疾患として知られている。

悪性黒色腫の腫瘍細胞増殖に重要なシグナル伝達経路として MAPK 経路が知られている。皮膚悪性黒色腫では BRAF や NRAS に変異が生じることによって MAPK 経路が活性化され細胞増殖に関与していると考えられている。一方でぶどう膜悪性黒色腫では BRAF や NRAS の変異が生じていないにも関わらず MAPK 経路 の活性化が生じていることが知られていて, その理由は謎とされていた。これに関しては近年, ぶどう膜悪性黒色腫で発見された GNAQ 及び GNA11 遺伝子変異が関与していると考えられている。

GNAQ 遺伝子は三量体 G 蛋白の  $\alpha$  サブユニット q をコードし, GNA11 遺伝子は  $\alpha$  サブユニット 11 をコードする。近年, 一部のぶどう膜悪性黒色腫の G 蛋白  $\alpha$  サブユニットにおいて, GNAQ および GNA11 に体細胞遺伝子変異が生じていることが報告された。 $\alpha$  サブユニットは GTP を加水分解することでシグナル伝達を制御・調整を行うが GNAQ および GNA11 変異が生じると加水分解が阻害されて細胞内シグナル伝達が活性状態のままとなり, 腫瘍の細胞増殖につながると考えられている。

既報では白人における GNAQ 変異率は 50%, GNA11 変異率は 30%と報告されている。アジア人である中国からの報告では GNAQ および GNA11 変異が合わせて 40%とされている。一方で, 日本人症例におけるこれら変異率の報告はまだない。以上の背景を踏まえ, 本研究では現在未知となっている日本人ぶどう膜悪性黒色腫症例の GNAQ および GNA11 変異陽性率を検討すること, 遺伝子変異と臨床病理学的因子との関連性を検討することを目的とした。また, Ki67 labeling index (Ki67 LI) や mitotic rate で示される細胞増殖活性と遺伝子変異との関連性についても検討した。

#### <対象・方法>

対象は新潟大学眼科で手術加療された 19 例 19 眼のぶどう膜悪性黒色腫。臨床病理学的データは年齢、性別、組織型、pT ステージ、腫瘍最大径、強膜浸潤の有無を対象とした。遺伝子変異の検索方法はダイレクトシーケンス法を用いた。パラフィン包埋切片から DNA を抽出し PCR 法で GNAQ, GNA11 遺伝子の対象領域を増幅した後、遺伝子配列を決定した。また、細胞増殖活性の指標として Ki67 LI と mitotic rate を用いて遺伝子変異との関連性を検討した。Ki67 LI の評価にはメラニンの影響を考慮し蛍光免疫組織化学 (IF) を用いて評価検討した。Mitotic rate はメラニン脱色の HE 標本で評価した。統計解析には SPSS を用い、p 値は 0.05 以下を有意とした。

#### <結果>

GNAQ 変異陽性率は 19 例中 5 例で 26.3%、GNA11 変異陽性率は 19 例中 6 例で 31.6%だった。GNAQ 変異ではコドン 209 のグルタミンがロイシンに変わるパターンが 5 例中 3 例 (60%)、グルタミンがプロリンに変わるパターンが 5 例中 2 例 (40%) にみられた。GNA11 変異ではコドン 209 のグルタミンがロイシンに変わるパターンが 6 例中 5 例 (83.3%)、コドン 183 のアルギニンがシステインに変わるパターンが 6 例中 1 例 (16.7%) にみられた。全ての変異は排他的に存在していた。

遺伝子変異と組織型の関連性の検討では GNA11 変異と組織型において有意な関連がみられ、GNA11 変異は epithelioid type で変異が多いという結果であった。一方で GNAQ 変異では組織型とこのような関連はみられなかった。また、年齢や性別など他の項目においては GNAQ /11 変異とも有意な関連はみられなかった。

遺伝子変異と IF による Ki-67 LI との関連性については GNAQ / 11 変異の有無で Ki67 LI に有意な差はみられなかった。同様に mitotic rate についても遺伝子変異の有無で両群間に有意な差は認められなかった。

#### <考按>

今回の検討で得られた日本人ぶどう膜悪性黒色腫における GNAQ 及び GNA11 変異の頻度の結果と白人や中国人での既報とを比較検討した。白人での遺伝子変異率は両者合わせて 80%程度、中国人での変異は 40%程度となっているが、白人の遺伝子変異率と比べて日本人の GNAQ/11 変異率は低い傾向にあることがわかった。また日本人と中国人では変異率は同程度であり、アジア人では白人と比較して GNAQ/11 変異率が低い可能性があり人種間でぶどう膜悪性黒色腫の遺伝子背景が異なる可能性が示唆された。

遺伝子変異と臨床病理学的各項目との関連については、今回の結果では GNA11 変異の有無と組織型との間に有意な関連がみられた。白人や中国人での既報では遺伝子変異と臨床病理学的項目との間に関連はないと述べられており、GNA11 変異においてのみ組織型と有意な関連があるという点が日本人ぶどう膜悪性黒色腫症例における特徴である可能性がある。

IF を用いて GNAQ 変異陽性群と陰性群の Ki-67 LI を検討したが有意な差はみられなかった。これは免疫組織化学を用いた既報の結果と同様であった。GNA11 変異と Ki-67 LI との関連については本研究が初めての報告となるが、GNAQ 変異と同様に有意差のない結果となった。また mitotic rate と遺伝子変異の有無にも関連性はなく、Ki67 や mitotic rate で示される細胞増殖活性と

GNAQ/11 変異は関連性が薄い可能性が示唆された。

結論として、日本人ぶどう膜悪性黒色腫症例においても欧米人や中国人の既報と同様の GNAQ/11 変異がみられた。その変異率は GNAQ 変異が 26.3%、GNA11 変異が 31.6%であった。GNA11 変異と組織型に有意な関連がある点は日本人症例の特色である可能性がある。本研究では、Ki67 LI や mitotic rate で示される細胞増殖活性と遺伝子変異との間に有意な関連は認められなかった。

#### 審査結果の要旨

メラノサイトの腫瘍化によって生ずる悪性黒色腫のうち、眼のぶどう膜悪性黒色腫(UMM)は、皮膚以外では最も頻度が高く、転移例は致命率が高い。UMM ではシグナル伝達分子である三量体 G タンパク質の Gq 型に属する GNAQ, GNA11 に関して、活性化が持続するアミノ酸変異異常が報告され、下流の MAPK 活性化を引き起こすとする仮説が提唱されている。よって、これらの変異は発症との関連が議論されているが、欧米より発症例の少ない日本人患者では変異の統計例がない。本学位申請論文で申請者は 19 例の手術摘出 UMM の遺伝子変異と臨床的特徴を解析し、組織像による悪性度等との関連を調べた。遺伝子異常では G209L の変異が最も多かったが、これらの配列異常がないものの方がより多く存在した。また Ki67 labeling index や mitotic rate で示される細胞増殖活性や発症年齢、性別等と上記の遺伝子変異の間には、統計学的に有意な関連性は認められなかった。GNA11 変異は組織型が epithelioid type において多いと著者は結論した。

以上の結果は、解析例数が必ずしも十分とはいえないものの、わが国の UMM の患者に関する診断・治療の指針に重要な基礎的情報を収集・分類したものであり、学位論文としての価値を有すると判定された。