

博士論文

中枢神経胚細胞腫瘍の分子病態解析

高見 浩数

中枢神経胚細胞腫瘍の分子病態解析

脳神経外科学

齊藤 延人

高見 浩数

目次

目次.....	2
本論文で使用した略語.....	4
I 要旨.....	6
II 序文.....	7
1. 小児脳腫瘍のゲノム解析.....	7
2. 胚細胞腫の組織学、疫学.....	8
3. 中枢神経系胚細胞腫の治療と予後.....	10
4. 病態の研究の歴史と背景.....	11
5. 起源細胞 (cell of origin) と病態.....	12
6. 遺伝子変異.....	15
7. 染色体数異常、コピー数異常.....	16
8. 染色体異常の疾患との関連.....	17
9. 胚細胞腫の発現.....	18
10. 胚細胞腫のメチル化の特徴.....	19
11. 胚細胞腫の micro RNA.....	19
12. 胚細胞腫における SNP.....	20
III 研究の目的.....	21
1. 胚細胞腫のホルモンマーカーhCG の意義.....	21
2. RNA Sequence と Whole Genome Sequence の意義.....	23
3. 頭蓋内胚細胞腫瘍ゲノム解析コンソーシアムと過去の研究内容.....	23
IV 方法.....	26
1. HCG 発現解析.....	26
1.1. HCG 発現解析の対象.....	26
1.2. 腫瘍の組織病理診断.....	27
1.3. DNA・RNA 抽出.....	27
1.4. cDNA 作成.....	28
1.5. リアルタイム定量 PCR.....	28
1.6. HCG 免疫染色.....	29
1.7. 統計解析.....	30
2. RNA シークエンス・Whole genome sequence (WGS).....	30
2.1. RNA シークエンスと WGS の対象.....	30
2.2 RNA シークエンスの方法.....	32
2.3. Fusion gene の解析.....	33
2.4. ARR3-RAB41 fusion transcript の機能解析.....	34
2.5. Transcriptome 解析.....	37
2.6. Whole Genome Sequencing の方法.....	39

2.7. 統計解析	41
V 結果	43
1. HCG 発現解析	43
1.1. 対象症例の臨床情報と解析対象の選択方法	43
1.2. 組織ごとの hCG β の発現	43
1.3. Germinoma における hCG β 発現	44
1.4. 発現値と血清/髄液中の hCG の値の相関	45
1.5. 発現と免疫染色の相関	47
1.6. 腫瘍部位別の hCG β 発現	47
1.7. hCG β 発現値と予後	48
2. トランスクリプトーム解析	50
2.1. 発現データ解析	50
2.2. Fusion Transcript の解析	61
3. Whole genome sequence	73
VI 考察	77
1. HCG 発現解析の結果と臨床的意義	77
2. トランスクリプトーム解析	83
2.1. トランスクリプトーム解析にもとづく中枢神経系胚細胞腫の病態と起源に関する考察	83
2.2. 胚細胞腫特異的に発現される新たな融合遺伝子 (ARR3-RAB41 fusion) の意義	87
3. Whole genome sequence	90
VII 結論	92
VIII 謝辞	94
IX 研究期間中の出版論文	95
X 補遺	97
XI 引用文献	99

本論文で使用した略語

A	Astrocytoma
AA	Anaplastic Astrocytoma
ANOVA	Analysis of Variance
BLASTN	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Base Pairs
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CC	Choriocarcinoma
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CDS	Coding Sequence
CGH	Comparative Genomic Hybridisation
CIS	Carcinoma in situ
CLIA	Chemiluminescence Immunoassay
CNS	Central Nervous System
CoV	Coefficient of Variance
CSF	Cerebrospinal Fluid
CTCF	CCCTC-binding factor
DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EIA	Enzyme Immunoassay
Em	Embryonal Carcinoma
ESC	Embryonal Stem Cell
FBS	Fetal Bovine Serum
FDR	False Discovery Rate
FEIA	Fluorescence EIA
FFPE	Formalin-fixed Paraffin-embedded
FISH	Fluorescence in situ Hybridization
GCT	Germ Cell Tumor
GDP	Guanosine Diphosphate
GEO	Gene Expression Omnibus
GIST	Gastrointestinal Stromal Tumor
GO	Gene Ontology
GOI	Gene of Interest
GPCR	G-protein-coupled Receptor
GSEA	Gene-set Enrichment Analysis
GTP	Guanosine Triphosphate
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
HE	Hematoxylin and Eosin
ICM	Inner Cell Mass
ICR	Imprint Control Region
ImT	Immature Teratoma
IRMA	Immunoradiometric Assay
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MSigDB	Molecular Signatures Database
Pure G	Pure Germinoma
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase

Mb	Megabase
Meta	Metastasis
Mixed G	Germinoma mixed with non-germinma components
mRNA	Messenger RNA
MT	Mature Teratoma
NGGCT	Non-germinomatous GCT
O	Oligodendroglioma
OA	Oligoastrocytoma
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFS	Progression-free Survival
PGC	Primordial Germ Cell
PGCLC	PGC-like Cell
RIA	Radioimmunoassay
RIN	Ribonucleic Acid Integrity Number
RPKM	Reads per Kilobase of Exon per Million Fragments Mapped
RNA	Ribonucleic Acid
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STGC	Syncytiotrophoblastic Giant Cells
TIGF	Transcription-induced Gene Fusion
WGS	Whole Genome Sequence
WHO	World Health Organization
YST	Yolk Sac Tumor

I 要旨

中枢神経系胚細胞腫の病態を解明する目的でトランスクリプトーム解析を施行した。hCGの発現解析では93検体全ての胚細胞腫で発現を認め、hCGに基づく治療選択に警鐘を發する結果となった。64検体のRNAシーケンスでは、発現プロファイルにより胚腫とそれ以外に二分された。胚腫はさらに3型に分かれ、リンパ球浸潤の多い胚腫は予後良好であった。主成分解析では胚腫はPGC、それ以外はESC起源を示唆した。Xq上で隣り合うARR3とRAB41の融合遺伝子が胚細胞腫、特に胚腫と卵黄囊腫瘍で特異的に高発現を認め、浸潤・遊走能亢進に関与することが示唆された。4検体のWGSでは、卵黄囊腫瘍で多くの構造異常が検出された。

II 序文

1. 小児脳腫瘍のゲノム解析

悪性腫瘍におけるゲノム異常としては遺伝子変異と並んで、ゲノム構造異常が重要な役割を果たすことが知られている。ゲノム構造異常には染色体の転座(translocation)、欠失(deletion)、逆位(inversion)、重複(duplication)などが含まれる。これらは腫瘍に特異的で病態に深く関わることが多く、血液腫瘍、固形がんを含め、ゲノム構造異常が腫瘍の診断的マーカー、予後予測因子、治療の標的になっている。実際に BCR (breakpoint cluster region)-ABL1 (ABL proto-oncogene 1), PDGFR (platelet derived growth factor receptor), ERBB2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2), EGFR (epidermal growth factor receptor)などは既に治療標的とする薬剤が開発され臨床で用いられるに至っている¹。

小児脳腫瘍でもゲノム構造異常が病態の主因であることを示す報告が近年多くなされている。Pilocytic astrocytoma では7q の tandem duplication が *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)遺伝子の発現を亢進させることが報告された²。Medulloblastoma では Group3, 4 において9q 染色体の局所的な deletion, inversion, tandem duplication などの構造異常により *GFI1B* (growth factor independent 1B transcription repressor)遺伝子近傍に enhancer 配列が位置することになり、*GFI1B* の発現が亢進し oncogenic driver となっていると報告されている³。Embryonal tumors with multilayered rosettes (ETMR)では19q 染色体における *TTYH1* (tweety family member 1)と C19MC micro RNA cluster の fusion により *DNMT3B* (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta) の発現亢進と *RBL2* (retinoblastoma-like 2)の発現低下を生じていることが報告された⁴。また ependymoma では11q 染色体の chromothripsis により *RELA* (v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A)や *YAPI* (Yes associated protein 1)の癒合遺伝子が形成され、NF- κ B 経路を活

性化することが報告された⁵。

一方で胚細胞腫に関しては性腺や頭蓋内を問わず、これまでにゲノム構造異常を網羅的に解析した報告は見られず、ゲノム解析に基づく診断や治療の発展が進んでいない。そのために現在でも通常の放射線・化学療法が標準治療として世界で行われており、分子標的薬の開発などは行われていない。胚細胞腫は germinoma や teratoma を除くと予後は不良であり、また放射線化学療法の長期的な副作用を考慮すると、何らかの新しい診断・治療のブレイクスルーが必要である。

2. 胚細胞腫の組織学、疫学

胚細胞腫 (Germ cell tumor: GCT) は新生児期～若年成人に好発する腫瘍である。好発部位は生殖器 (精巣・卵巣)、仙骨尾骨部、縦隔 (胸腺)、頭蓋内である。精巣・卵巣での発生が最も多く (約 95%) gonadal GCT と分類され、それ以外の部位に生じる胚細胞腫は extragonadal GCT と分類される⁶。Extragenadal GCT は体軸中央部に発生しやすい⁷。中枢神経系胚細胞腫 (central nervous system GCT: CNS GCT) は松果体と神経下垂体部が好発部位であり、それ以外にも脳室内、基底核、大脳・小脳皮質下、脳幹部、脊髄などに散発的に発生する。中枢神経系胚細胞腫は男性に高頻度であり、特に松果体部は男性に圧倒的に多い。一方神経下垂体部の男女比は 1:1 程度である。

WHO 分類では胚細胞腫は 6 つの組織型に分類されている。すなわち、胚種: Germinoma, 奇形腫: Teratoma (成熟奇形腫: Mature Teratoma; MT, 未熟奇形腫: Immature Teratoma; ImT, 悪性転化を有する奇形腫: Teratoma with malignant transformation), 卵黄嚢腫瘍: Yolk Sac Tumor (YST), 絨毛癌: Choriocarcinoma (CC), 胎児性癌: Embryonal Carcinoma (EC), 混合性胚細胞腫: Mixed germ cell tumors である⁸。臨床的、病理学的には

germinoma と、それ以外すべての組織型を合わせて non-germinomatous GCT (NGGCT)とに分類される。NGGCT は EC として未分化状態を維持している場合と、extraembryonic に分化して YST, CC の組織型を示す場合と、embryonic に分化して三胚葉成分を有する teratoma としての組織型を示す場合がある。中枢神経系胚細胞腫の中では、germinoma が 50～60%、Mixed GCT が 30%程度、残りが NGGCT である。

初発中枢神経系胚細胞腫は原発性脳腫瘍の 0.3 – 3 %程度を占めるとされる。日本では 2014 年に発表された全国脳腫瘍統計によると全脳腫瘍の 2.3 %、19 歳以下の小児脳腫瘍の中において 16.9 %の頻度である^{9,10}。一方で欧米では頻度が低く、アメリカでの Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS)の報告では 0～19 歳において 3.9 %と記載されている¹¹。2015 年に開催された第 4 回国際中枢神経系胚細胞腫シンポジウムにおいてインドからの発表では、中枢性胚細胞腫瘍は全脳腫瘍の 0.43 %と報告され欧米並みの低い頻度であることが判明した。各国からの発表によると、韓国・台湾・シンガポールでは頻度が高く、以西では低いという結果であった。このような地域による発生頻度の差の原因としては遺伝学的背景があると推測されている。その1つとして 2014 年に発表された *Nature* の中で、主に日本人の中枢神経系胚細胞腫の患者検体を用いた 62 症例の解析によって、*JMJD1c* の germline の rare variant が日本人に多く(50 例中 9 例:18 %、日本以外は 12 例中 1 例、8.3 %)、また他の悪性腫瘍症例や健康人コントロールと比べて有意に中枢神経系胚細胞腫罹患患者に多いことが示された。また 1000 ゲノムプロジェクト内での探索において健康人のコホートにおいてもこの germline variant は日本人に多く、東アジアで中枢神経系胚細胞腫が多いことの遺伝的背景の 1 つであることが示唆された¹²。

3. 中枢神経系胚細胞腫の治療と予後

中枢神経系胚細胞腫の中では germinoma は一般的に手術による摘出と、その後の化学療法や放射線治療が奏功することが多く、また mature teratoma は全摘出により治癒することが多いことから、比較的予後の良い腫瘍と考えられる傾向にある。

日本における標準治療としては、germinoma の場合は biopsy、それ以外の組織型の場合は可及的摘出を行い、その後は mature teratoma を除いて放射線化学療法が施行される。NGGCT の場合は放射線化学療法後の second look surgery が選択されることもある。放射線療法としては全脳室照射が基本であり、診断から予想される予後に従って全脳・全脊髄まで拡大する。化学療法としてはプラチナ製剤が基本であり、carboplatin + etoposide (CARE) または ifosfamide + cisplatin + etoposide (ICE) 療法が選択される¹³。ヨーロッパでも多少の regimen の違いはあるものの、松谷らにより開発された治療のプロトコールに準拠した、同様な内容の治療が行われている¹⁴。この結果に基づき、松谷らは胚細胞腫を予後に従って 3 つのグループに分類することを提唱した(表 1)。

日本から治療成績についての大規模な報告が行われ、germinoma の 10、20 年生存率はそれぞれ 92.7、80.6 %、mature teratoma, malignant teratoma の 10 年生存率はそれぞれ 92.9、70.7 %、NGGCT の 3 年生存率は 27.3 % とされており、胚細胞腫の中でも治療に良好に反応する組織型は germinoma と mature teratoma だけであり、NGGCT は治療抵抗性の強い疾患であると考えられる¹³。

現在、治療標的が同定されておらず、プラチナ製剤を中心とする化学療法と脳室を含む放射線治療が標準となっている。しかし患者年齢が若年であることより、化学療法や放射線治療による長期生存例での二次癌の発症や血管障害、不妊、代謝疾患などの問題が大きく存在する^{15 16 17}。

また good prognosis group に分類される germinoma の症例でも、約 10% では再発を繰り返す難治性で予後不良の症例があることが知られている。個々の症例により治療の強度を決める何らかの分子マーカーを同定することが求められている。

A. Good prognosis group
a. Pure germinoma
b. Mature teratoma
B. Intermediate prognosis group
a. Germinoma with elevated levels of hCG β
b. Extensive/multifocal germinoma
c. Immature teratoma
d. Teratoma with malignant transformation
e. Mixed tumors composed mainly of germinoma or teratoma
C. Poor prognosis group
a. Choriocarcinoma
b. Yolk sac tumor,
c. Embryonal carcinoma
d. Mixed tumors composed mainly of choriocarcinoma, yolk sac tumor or embryonal carcinoma

表 1 中枢神経系胚細胞腫の予後・治療分類¹³

4. 病態の研究の歴史と背景

前述のように胚細胞腫の 95% は性腺に発生し、そのほとんどが精巣に生じる。このため性腺由来の胚細胞腫の病態解明については、欧米を中心としたオランダ、デンマークからの研究が古くから貢献してきている。一方で中枢神経系胚細胞腫は前述のようにアジアに多く欧米に頻度が低いこと、また手術における腫瘍へのアプローチの困難さ、検体の凍結保存の問題などから、解析に十分な量のサンプルを保有している施設は極めて少ない。さらには、欧米を中心として、診断は病理組織学的な考察を加えないプロトコールが主体になりつつある。すなわち臨床所見、画像上の典型的な発生部位、腫瘍の画像所見、血液・髄液中の腫瘍マーカーにより手術を行わずに診断を行い、治療を開始することが多くなってきている¹⁸。このような背景から現在も欧米において中枢神経系胚細胞腫の研究は進んでいない。

5. 起源細胞 (cell of origin) と病態

胚細胞腫の起源細胞 (cell of origin) についてはいくつかの仮説があり、まだ完全にコンセンサスが得られていない。

最も広く信じられているものは、胚細胞腫の全てが始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) 由来であるというものである^{19,20}。Teilum らの仮説によると、すべての組織型の胚細胞腫は全能性 (totipotency) を有する PGC 由来であり、これが embryonic にも extraembryonic にも分化するとしている。これは、PGC に悪性腫瘍としての特性を与える遺伝子異常が加わると精巣胚細胞腫の場合は前癌病変として carcinoma in situ (CIS) が生じると考えられている²¹。CIS は全能性を維持し、その後の様々な進展・分化の結果として全ての胚細胞腫が生じるという仮説である。

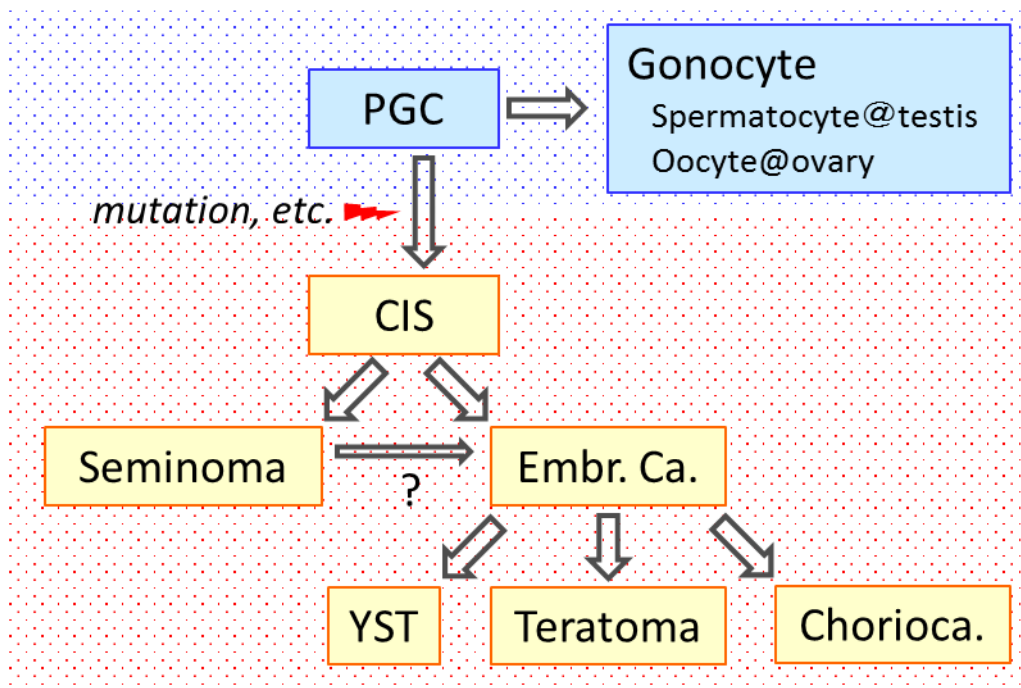


図 1 精巣胚細胞腫の病態発生についての図式

全ての胚細胞腫は始原生殖細胞 (primordial germ cell: PGC) に遺伝子異常などが加わり生じるとする仮説が受け入れられている。前癌病変として carcinoma in situ (CIS) が存在し、これが seminoma に進展する場合と embryonal carcinoma に進展してその後 to yolk sac tumor, teratoma, choriocarcinoma にさらに進むと考えられている。

略称 Embr. Ca.: embryonal carcinoma, YST: yolk sac tumor, Choriocarc.: choriocarcinoma,

PGC はヒトの胎生 4 週に胚盤葉上層(epiblast)の後端で、胚体外外胚葉(extraembryonic ectoderm)に接して生じる²²。Extraembryonic ectoderm から分泌される BMP4 の刺激によって誘導されることが証明されている²³。BMP4 の刺激により *IFITM1* を発現する細胞群が生じ、この細胞群の中の一部が *DPPA3* を発現し、PGC となる。PGC は胎生 5-6 週に migration を開始し、まず卵黄嚢(yolk sac)壁内に移動し、その後腸間膜 hindgut epithelium を通って生殖隆起(後の精巣、卵巣)に移動する。生殖巣に到達後、*SOX9* や *FOXL2* などの影響下でそれぞれの性に沿った gonocyte に分化する(胎生 6-8 週)^{24,25}。

この遊走においては、PGC とそれを囲む Kit ligand (KitL)を発現する細胞群が腸管膜の交感神経に沿って一緒になって運動するとされ²⁶、移動中に mitosis によって細胞数が増加し、生殖巣だけでなく様々な部位に PGC が拡散する。この遊走には secretory chemoattractant factor (SCF)として Kit ligand (KitL)が作用し、PGC 側の受容体としては receptor tyrosine kinase の Ror2 が知られる。Ror2 が PGC 細胞内で不均一な分布を示すことにより細胞の進む方向性が決まると考えられている²⁷。また PGC に発現する CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4)と生殖隆起に発現するその ligand である CXCL12 (chemokine (C-X-C motif) ligand 12)の相互作用により PGC が遊走することがマウスなどで証明され、これがヒトにも当てはまると考えられている^{28,29}。この両者の作用により遊走が機能する²⁷。KitL と協調する PGC の Kit は増殖シグナルとしての働きと運動性に関わるとされる²⁶。正常では生殖巣以外に迷入した細胞は apoptosis を生じるが³⁰、遺伝子変異などで増殖能を獲得するか apoptosis を回避すると、生殖巣以外の部位に胚細胞腫が生じると考えられる。生殖巣以外の胚細胞腫は正中に沿って生じやすく、これは PGC の遊走経路に沿ったものと考えられている⁷。

精巣胚細胞腫においては、germ cell の一部が胎児の生殖巣の中で developmental arrest

を生じ^{31,32}、このような *arrested cells* が CIS として思春期頃まで残存し、PGC や *gonocyte* と似たような発現プロファイルを有することが知られている^{31,32}。思春期の内分泌の変化に曝されるとこれらの細胞の腫瘍化が惹起されると考えられている。CIS は *seminoma* に進展する場合と *non-seminoma* に進展する場合がある。*Non-seminoma* の 1 つである *embryonal carcinoma* は *totipotency* を有し、*teratoma*, *YST*, *choriocarcinoma* に分化するとされる。*Seminoma* の *cell line* の 1 つである *Tcam2* をマウスの腹腔内に移植すると *teratoma* が生じることから³³、*seminoma* から *non-seminoma* に *reprogram* されるとも考え得るが、CIS から *seminoma* と *non-seminoma* に別々に分かれるとも考えられており、この点については依然議論がある。

中枢神経系胚細胞腫の場合は CIS の存在は確認されておらず、精巣胚細胞腫と発生機序が異なる可能性があるが、両者の遺伝子・発現レベルでの比較はまだ行われておらず中枢神経系胚細胞腫の発生機序については未解明のままである。

PGC が胚細胞腫の *cell of origin* であることの病態生理学的な根拠としては *imprinted gene* のメチル化の解析により示されている³⁴。*Imprinting* とは特定の遺伝子において、どちらの親からの由来かによって *allele* 特異的に発現が制御されるよう、エピゲノムレベルでコントロールされているという現象である。*Imprinted gene* では遺伝子の発現制御領域、特に *imprint control region (ICR)* とされる部分のメチル化やヒストンの修飾により発現がコントロールされている。

発生初期において全ゲノム領域にわたる広範な脱メチル化が生じるのは胚盤胞形成時と PGC 形成時だが、*imprinted gene* の脱メチル化と性特異的な再メチル化が生じるのは PGC の *maturation* の段階において他にない。これまでに *imprinted genes* のうち *SNRPN* (*small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*)³⁵ や *IGF2* (*insulin like growth factor 2*)/*H19*³⁶ につ

いて gonadal/nongonadal GCT におけるメチル化が解析され、脱メチル化が認められている。これが胚細胞腫が PGC 由来である根拠として考えられている。

胚細胞腫の全てが PGC 由来ではないとする仮説も存在する。PGC は生殖細胞への分化が運命づけられた細胞という考え方に基づいた場合、それとは分化の方向が異なった他の胚細胞腫の系譜に向かうことが考えづらいことから、non-germinoma は PGC より前の発達段階であり未分化である内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) 由来の embryonal stem cell (ESC) が由来とする考え方である。これが東京大学脳神経外科の佐野らが提唱した embryonic cell 理論である^{37,38}。頭蓋内の胚細胞腫は神経幹細胞から生じていると主張するグループも存在するが現時点では根拠に乏しい^{39,40}。

6. 遺伝子変異

胚細胞腫は他の小児脳腫瘍と同様に遺伝子変異が比較的少ないことが知られており、これは胎生期の細胞が cell of origin であり、多くの変異が蓄積する時間が少ないことを反映していると考えられている。2004 年と 2006 年に 2 つの日本のグループが、中枢神経系胚細胞腫、特に germinoma において *KIT* の変異がそれぞれ 25%、23%に見られることを 16 例、26 例の症例において報告した^{41 42}。追って 2014 年に日本の頭蓋内胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアム(後述)が 65 例の中枢神経系胚細胞腫の症例を調べた研究において、*KIT* または *RAS* の変異は germinoma に多く(60.0%)、NGGCT に少ないこと(8.6%)を報告した⁴³。同年に Wang らは中枢神経系胚細胞腫の exome sequence にて *JMJD1c* の rare germline variant が日本の中枢神経系胚細胞腫患者に高頻度に見られることを発見した。同時に、MAPK 経路、PI3K 経路に相互排他的な高頻度の体細胞変異があることも報告した¹²。

2015 年になり、精巣胚細胞腫においても同様に exome sequence の結果が報告され

MAPK 経路と PI3K 経路に変異が多く見られることが相次いで報告された^{44,45}。それ以外にも、tumor suppressor gene の *CDC27* に 11.9% で変異が発見された⁴⁴。また治療抵抗性の症例で *XRCC2* の変異が見られることも報告された⁴⁴。

これらの変異解析により、中枢神経系胚細胞腫と精巣胚細胞腫は変異プロファイルとしては同様の傾向を示し、少なくとも変異レベルでは counterpart であること、*KIT* を中心とした RAS-MAPK 経路の異常が病態の重要な原因となっていること、germinoma や seminoma の数割程度の症例と NGGCT の大半の症例における発生メカニズムが変異では説明がつかないこと、などが明らかとなった。

7. 染色体数異常、コピー数異常

精巣胚細胞腫では染色体数異常の報告が多くみられ、その知識が確立されている。思春期前発症の症例では Chr 1 の imbalance, 6q loss, 20q gain が特徴で、思春期後発症ではほぼ全例で 12p の gain (ほとんどの場合は isochromosome) が見られ、他に Chr 7, 8, 21q の gain, Chr 11, 13, 18 の loss が見られる。50 代以降に好発する spermatocytic seminoma は Chr 9 の gain が見られることが報告されている⁴⁴。

12p の isochromosome を含む gain は精巣胚細胞腫の 80% に見られ、その他の 20% には小さな領域の増幅が見られるとされる⁴⁶⁻⁴⁸。この染色体部位に含まれる標的遺伝子としては *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*)^{46,49}, *cyclinD2* (*CCND2*)⁴⁶ が考えられている。他にも発生初期に関わる遺伝子として、*STELLA* (= *DPPA3*, developmental pluripotency associated 3), *NANOG*, *EDR1*, *GDF3* (growth differentiation factor 3) が含まれる^{50,51}。

また spermatocytic seminoma に高頻度で見られる 9p の gain の責任遺伝子としては

DMRT1 (doublesex and mab-3 related transcription factor 1)が考えられている⁵²。

中枢神経系胚細胞腫においても日本のグループから 25 症例における FISH による解析にて 20%で 12p の gain (一部で isochromosome 12p)、92%において X の gain があることが報告された⁵³。また 65 例の中中枢神経系胚細胞腫の array comparative genomic hybridization (CGH)による解析でも、12p の gain は 46.2 %と精巣胚細胞腫より頻度が低く、21q, X, 1q の gain (それぞれ 66.1 %, 58.5 %, 44.6 %)が記載された。一方で loss の頻度は少なく、5q, 11q, 13q においてそれぞれ 30.8, 33.8, 41.5 %に見られた⁴³。

このように精巣胚細胞腫と中枢神経系胚細胞腫の染色体数異常のプロファイルは異なったものになっている。中枢神経系胚細胞腫は 9p の gain は稀であり、12p の isochromosome の頻度は少ない。病理の所見は似ている一方で発生機序においては異なる可能性を示唆している。

また染色体不安定性の原因として、特に germinoma や seminoma での global hypomethylation が一因として指摘されている⁵⁴。また L1 トランスポゾンの低メチル化による発現亢進も染色体不安定性に関わるとされている^{55,56}。

8. 染色体異常の疾患との関連

先天性染色体異常の症候群との関連も知られており、Down 症候群(21 trisomy)、Turner 症候群(45XO)、Klinefelter 症候群(47XXY)⁵⁷ の患者に胚細胞腫が有意に多いとされる。Klinefelter 症候群においては縦隔の胚細胞腫のリスクが 67 倍になるとする報告がある⁵⁸。

9. 胚細胞腫の発現

精巣胚細胞腫の発現解析はマイクロアレイや免疫染色を用いて行われたデータが 2000 年代初頭から半ばにかけて相次いで報告された^{59,60,60}。一方で中枢神経系胚細胞腫のゲノムワイドな発現解析は過去に 1 編の報告だけで、germinoma 7 例と non-germinoma 6 例の解析においてマイクロアレイ解析が行なわれたに過ぎない⁶¹。胚細胞腫は全体として stem cell に関わる遺伝子 (*KIT*, *Oct-3/4*, *AP-2* γ , *NANOG* など) や germ cell に特異的な遺伝子 (*MAGE-A4*, *NY-ESO-1*, *TSPY*) などが高発現している⁵⁹。特に germinoma や seminoma はその特徴が顕著であり、加えて leukemia inhibitory factor (JAK/STAT) 経路や cell cycle、DNA 修復、zinc finger-specific transcription repressor、ribosomal protein に関わる遺伝子の高発現と proapoptotic genes の発現抑制がみられる。一方で多分化能を有する embryonal carcinoma を除く non-germinoma や non-seminoma では、分化を示すマーカー遺伝子や Wnt/ β -catenin pathway, epithelial-mesenchymal transition に関わる遺伝子の高発現が指摘されている^{61,62}。Embryonal carcinoma では *SOX2* の高発現が見られることが特徴的である⁶⁰。

多層オミックス解析としては、Zwan らが seminoma と embryonal carcinoma の cell line であるそれぞれ TCam2 と NCCIT において発現 (microarray)・CpG メチル化 (Illumina 450K)・ヒストン修飾 (:H3K4me3, H3K27ac, ChIP-seq) にて解析を行った。NCCIT はより stem cell の特徴を表し、TCam-2 は spermatogonia maintenance や germ cell-Sertoli cell junction, androgen receptor/testosterone target 遺伝子などの germ cell に強く関わる細胞内経路に関連する遺伝子の発現が亢進している結果となった⁶³。

10. 胚細胞腫のメチル化の特徴

精巣胚細胞腫におけるメチル化の解析において、seminoma は global hypomethylation を示す一方で non-seminoma は他の腫瘍などと同程度のメチル化を示すことが報告されている⁶⁴。2015年にオランダの Erasmus Medical Center のグループから精巣胚細胞腫のゲノムワイドのメチル化の解析が報告された。Infinium[®] HumanMethylation450 BeadChip を用いて解析され、全般的なメチル化状態やインプリント遺伝子のメチル化状態などから胚細胞腫の各組織型における発生起源を推測する結果が示された³⁴。一方で中枢神経系胚細胞腫における全ゲノムレベルでのメチル化解析の報告はこれまでになかったが、現在本解析の研究グループが解析を終え、論文を投稿中であり、公表が待たれる。

11. 胚細胞腫の micro RNA

Micro RNA(miRNA)は約 22 bp ほどの長さの小さな non-coding RNA 分子であり、転写後の遺伝子発現調節に関わり、細胞分化やアポトーシスや腫瘍増大などの生物学的プロセスに重要な役割を有することが知られている。miRNA は様々な腫瘍において特徴的な発現パターンを示すことが知られている⁶⁵。精巣胚細胞腫においては miR-371-3 (miR-371a-3p, miR-372, miR-373-3p)や mir-302, 367 が強く関連すると報告されている⁶⁶⁻⁶⁹。miR371-373 は p53 タンパクによる oncogenic stress 下における cellular senescence の機序を防ぐ働きが知られており、胚細胞腫の病態に深く関わっていることが推測されている⁶⁰。また血清中や精巣静脈の血清中でも高濃度に検出されることが報告されており、今後腫瘍の診断や治療後の評価などに有用となる見込みもある⁶⁶。

12. 胚細胞腫における SNP

近年 Genome-wide association study (GWAS)により、精巣胚細胞腫のリスクを上げる single nucleotide polymorphism (SNP)が同定されてきている。これまでに 23 の独立した locus が示されてきており、多くの遺伝子が生殖細胞の発達に関わるものであると報告されている。これらには *TERT* (telomerase reverse transcriptase)/*CLPTMIL* (cleft lip and palate associated transmembrane protein 1-like), *DMRT1*, *DAZL* (deleted in azoospermia like), *PRDM14* (PR domain 14), *KITLG* (KIT ligand), *IGF1R* (insulin like growth factor 1 receptor), *GATA4* (GATA binding protein 4)などが含まれる^{70,71}。細胞経路としては KIT/KITLG signaling, male germ cell development/differentiation, microtubule assembly, telomerase function, DNA damage repair に集約される⁵³。

III 研究の目的

1. 胚細胞腫のホルモンマーカーhCGの意義

近年欧米では中枢神経系胚細胞腫の診断は画像所見と血液・髄液中の内分泌マーカーの所見に基づいて診断と治療を行うことが標準となっている(下図)¹⁸。具体的には human chorionic gonadotropin (hCG)の血液または髄液中での値の上昇や免疫染色陽性所見は germinoma with syncytiotrophoblastic giant cells (STGC)または choriocarcinoma の存在を示唆し、alpha-fetoprotein (AFP)は YST の存在を意味すると考えられている。

さらに hCG の血液または髄液中の上昇は予後を規定する因子であるという理解が一般的となっている。松谷らが提唱している胚細胞腫の 3 群による治療グループでは、germinoma は予後良好群であるのに対し hCG を産生する germinoma は予後中間群に分類され、より強力に放射線・化学療法が施行される¹³。これは 153 例の GCT の解析において 7 例の germinoma with STGC は pure germinoma と比べて放射線治療の感受性が弱く、より強い化学療法が必要とされたためである。ヨーロッパでの clinical trial でも血液中または髄液中の hCG β の値が 50 IU/l を超えると NGGCT と同じ治療群に組み込まれる (https://www.skion.nl/workspace/uploads/2_siop_cns_gct_ii_final_version_2_15062011_unterschrift_hoppenheit.pdf)。

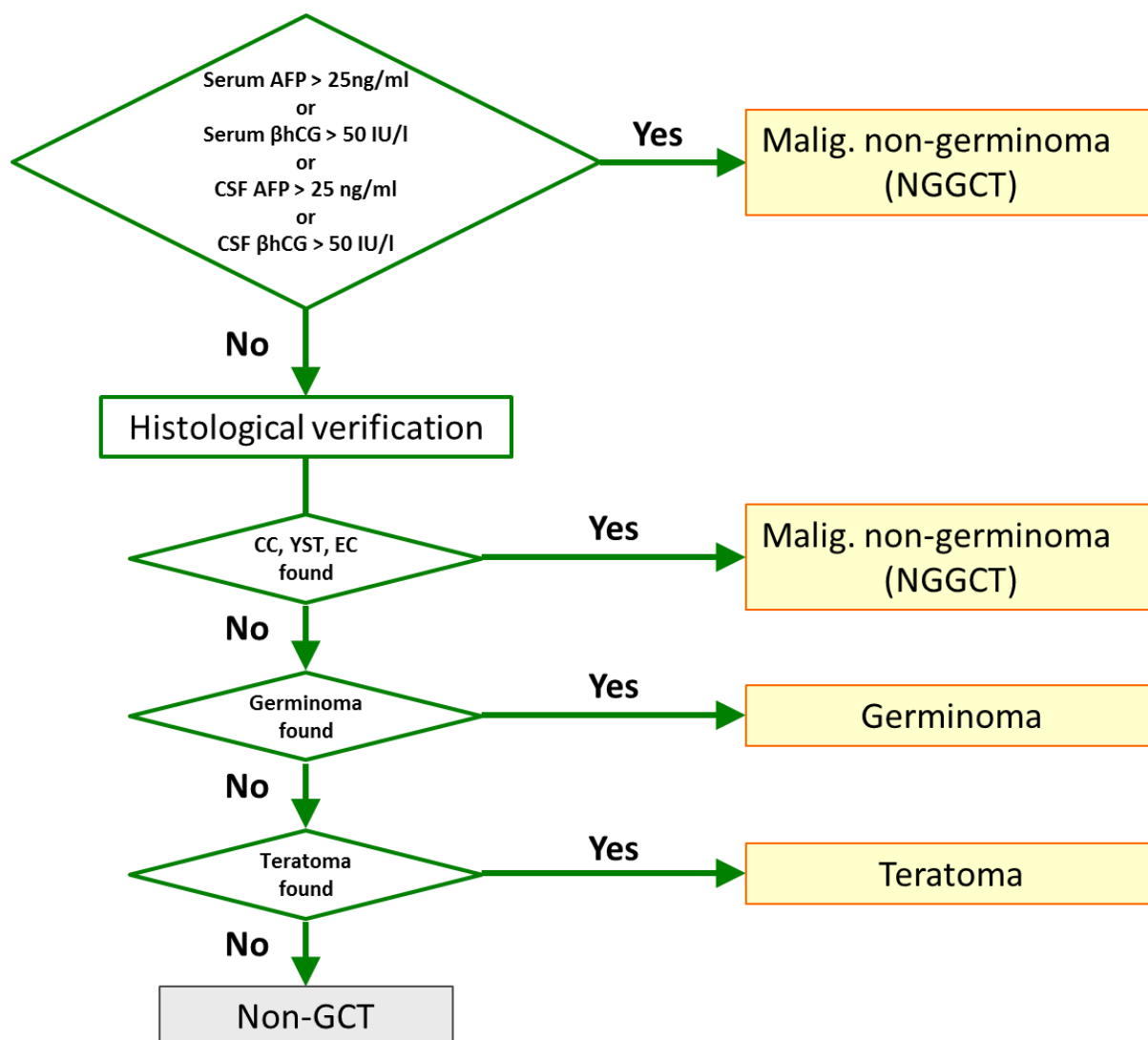


図2 SIOP CNS GCT II による中枢神経系胚細胞腫の診断基準フローチャート

SIOP(Societe Internationale D'Oncologie Pediatrique; International Society of Paediatric Oncology)による欧米を中心とする中枢神経系胚細胞腫の診断プロトコール。血液・髄液の hCGβ が 50 IU/l を超えると malignant non-germinoma として強力な放射線・化学療法が行なわれることになる。

AFP: alpha fetoprotein, β hCG: human chorionic gonadotropin β, Malig: malignant, NGGCT: non-germinatous germ cell tumor, CC: choriocarcinoma, YST: yolk sac tumor, EC: embryonal carcinoma, GCT: germ cell tumor

しかし過去の報告の中には STGC 成分の伴わない germinoma の中にも hCG を産生する subgroup があることが知られており、hCG-producing germinoma とされる。Germinoma において hCG の上昇が予後不良因子であるかどうかは議論がある⁷²⁻⁷⁵。さらに近年の ultrasensitive enzyme immunoassay (EIA) 法によると、ほとんど全ての germinoma は多かれ少なかれ hCGβ を産生していることを示しており^{76 77}、hCG が germinoma with STGC や choriocarcinoma に

特異的であると考えられてきたこと、hCG の産生有無によって germinoma の治療を変えること、について疑義が呈されつつある。

今回 93 検体の様々な組織型の胚細胞腫において hCG の発現を調べることで、胚細胞腫における hCG の意義を調べることとした。

2. RNA Sequence と Whole Genome Sequence の意義

これまで性腺の胚細胞腫に対するマイクロアレイを用いた発現解析が 2000 年代初頭から半ばにかけて報告がなされている。その中では各組織型に特徴的な遺伝子や遺伝経路が記載されている。

一方で次世代シーケンスによるトランスクリプトーム解析はなされていない。中枢神経系胚細胞腫については発現解析の報告は少数例に基づくものであり、少ない組織型でのみ行われているに過ぎない。またこれまでに頭蓋内外を含め、ゲノム構造解析は報告されておらず、融合遺伝子の存在を含めた構造異常は特定されていない。

今回、RNA シーケンスと whole genome sequence (WGS)によりゲノム構造解析と発現解析を施行した。これらの次世代シーケンスの適応により、胚細胞腫の病態解明に迫ることと同時に、新たな分子分類の可能性や、ゲノム構造異常の発見による診断マーカー、予後予測マーカー、治療標的の確立を目指すこととした。

3. 頭蓋内胚細胞腫瘍ゲノム解析コンソーシアムと過去の研究内容

前述したように、精巣胚細胞腫が西欧諸国で頻度が高い一方で、中枢神経系胚細胞腫は日本を含む東・東南アジアで多いことが知られている。また欧米では中枢神経系胚細胞

腫の診断を手術による摘出標本に対する病理所見で行うよりも、臨床症状、血液・髄液検査によるホルモン値のマーカー、画像検査にて行うことが好まれており、凍結標本によるゲノム解析が進みづらい背景となっている。その一方、日本では多くの施設で病理所見による診断・治療が一般化しており、また頻度も高いことから、日本主導でのゲノム解析が世界から期待されている(2015年4月国際胚細胞腫瘍会議より)。こういった状況を踏まえ、国立がん研究センターを拠点として、中枢神経系胚細胞腫瘍のゲノム解析を進めるために、2012年に頭蓋内胚細胞腫瘍ゲノム解析コンソーシアム(iGCT consortium)が立ち上げられた。日本全国、一部韓国の施設が参加し、合計49施設が登録している。このうち、日本の23施設から、2015年9月の時点で計185の症例登録がなされ、ほとんどの症例で手術により摘出された凍結検体が提供されている。凍結検体の入手困難な症例は未染色標本が提供されている。これまでに胚細胞腫に対する exome sequence、array CGH によるコピー数異常の検索、methylation array によるメチル化解析などがなされ、論文が報告または投稿されている^{43 78}。以下にその要旨を述べる。

遺伝子変異解析としては exome sequence が 41 例に対して行われ、この中で同定された 35 の特定の遺伝子について 124 例の中枢神経系胚細胞腫・65 例の精巣胚細胞腫・8 例の頭蓋内転移性胚細胞腫に対して Ion Torrent を用いたターゲットシーケンスが行なわれた。結果、MAPK 経路に相互排他的な遺伝子変異が最も多く認められ(48.4 %)、その中でも特に KIT の遺伝子変異が多かった(27.4 %)。次に多かったのが PI3K 経路の変異で 12.9 % に認められ、その中では MTOR に 6.5 % の頻度で変異が見られた。中枢神経系と精巣の胚細胞腫は同様な変異プロファイルを示したことにより、少なくとも遺伝子変異に関しては胚細胞腫は発生部位に関わらず同様な病態を持つものであることが示唆された(Ichimura et al., 投稿中)。

次にメチル化解析であるが、イルミナ社製の「Infinium® HumanMethylation450 BeadChip」(450k)を用いて 61 症例の中樞神経系胚細胞腫に対して全ゲノム網羅的なメチル化解析がなされた。結果、germinoma は極めて高度の全ゲノム的低メチル化を示すことが明らかになった。これは正常組織・腫瘍組織を含め全身の他のいかなる臓器と比べても、顕著に異なった所見であった。一方で non-germinoma にはこの所見は見られず、正常組織と同程度のメチル化程度を示した。Germinoma のメチル化はトランスポゾン領域にも及び、このことは germinoma が強い染色体不安定性を有することの原因としての腫瘍の特性を示すのと同様、primordial germ cell が起源細胞であることを強く示唆する特徴でもあると言える結果と考えられた(Fukushima et al., 投稿中)。

このように中樞神経系胚細胞腫に対しては現在全ゲノム網羅的解析を含めた多面的なアプローチにより解析が行なわれている。今回の研究はその一翼をなし、これまでのゲノム・エピゲノム解析とはまた異なる視点から、トランスクリプトーム解析、ゲノム構造解析による新たな病態解析を行うという意味を持つ。

IV 方法

1. HCG 発現解析

1.1. HCG 発現解析の対象

頭蓋内胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアムに参加する日本の10施設の脳神経外科(表2)より集められた合計 93 例の中樞神経系原発の胚細胞腫を対象とした。1 例の正常成人脳 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA)、2 例の成人正常精巢 (Cell Applications, San Diego, CA と Clontech Laboratories) を対照として使用した。研究は国立がん研究センターの倫理委員会により承認され、また同時に参加施設の倫理委員会でも承認を得たうえで行われた。

施設名	検体数
埼玉医科大学	37
東北大学	13
東京大学	11
広島大学	9
東京医科歯科大学	7
宮崎大学	5
千葉県立がんセンター	4
大阪医療センター	3
杏林大学	2
金沢大学	2
合計	93

表 2 93 検体の提供施設一覧

血清中・髄液中の total hCG や hCG β の濃度、治療記録(手術、放射線・化学療法の内容)、治療経過(再発、生存情報)などの臨床データは全ての症例で入手できた。血清中・髄液中の total hCG や hCG β の濃度は施設によって chemiluminescence immunoassay (CLIA), enzyme immunoassay (EIA), fluorescence EIA (FEIA), immunoradiometric assay (IRMA), radioimmunoassay (RIA)で検査された。髄液は手術前または手術中に脊髄からま

たは脳室からのドレナージで採取した。

93 の腫瘍の組織型は、pure germinoma 48 例、mature teratoma 12 例、immature teratoma 6 例、germinoma mixed with non-germinoma 19 例、mixed GCT without a germinoma component 1 例、yolk sac tumor 3 例、choriocarcinoma 1 例、embryonal carcinoma 1 例、unspecified high grade GCT 2 例である。

組織型	検体数
Pure Germinoma (PG)	48
Mature Teratoma (MT)	12
Mixed NGGCT (Mixed NG)	1
Immature Teratoma (ImT)	6
Mixed Germinoma (Mixed G)	19
Yolk Sac Tumor (YST)	3
Embryonal carcinoma (EC)	1
Choriocarcinoma (CC)	1
High grade GCT (NS)	2

表 3 93 検体の中央病理診断の一覧

1.2. 腫瘍の組織病理診断

中枢神経系胚細胞腫の病理診断は中枢神経腫瘍の WHO の分類に従って、胚細胞腫の WHO 分類の執筆担当者の一人である群馬大学名誉教授、現日高病院病理部病理診断科中里洋一先生によりなされた。病理診断は研究データとは独立に行われた。

1.3. DNA・RNA 抽出

腫瘍検体と血液検体は DNA・RNA 抽出時まで -80 °C で保管し、DNA は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) にて、total RNA は miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) にてプロトコール通りに抽出した。RNA の品質検定は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて Ribonucleic Acid Integrity Number (RIN 値) の測定を行った。

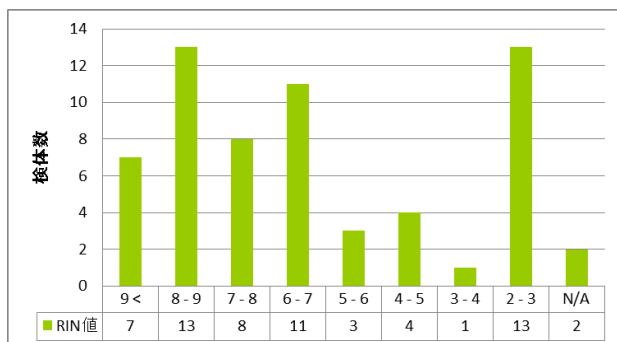


図3 RNA シークエンスに使用した 62 検体の RIN 値の分布

ほとんどは Ribonucleic Acid Integrity Number (RIN 値) が高値であり RNA の分解が進んでいない検体を使用した。胚細胞腫の稀少性により一部は値が低いものも解析した。

1.4. cDNA 作成

First-strand complementary DNA は 500 ng の RNA から作成した。手順は以下の通りである。

1. 500 ng の RNA と 1 μ l の 50 μ M oligo(dT)₂₀ , 1 μ l の 10mM dNTP mix を 65°C 5 分間処理、その後 1 分間氷上に置く。
2. 4 μ l の 5×First-strand buffer, 1 μ l の 0.1M DTT, 1 μ l の RNaseOUT, 1 μ l の SuperScript III を混ぜ、25°C5 分→50°C60 分→70°C15 分の処理を行う
3. Ribonuclease H を 1 μ l 添加し、37°C20 分処理を行う

全て Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) の試薬を用いて作成した。

1.5. リアルタイム定量 PCR

hCG β の mRNA の発現値をリアルタイム定量 PCR にて解析した。実験は、LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) の試薬を用い、SYBR Green I (483-533 nm) detection format にて CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) の器械を用いてプロトコールに従って行った。

次のプライマーペアを作成した。hCG β をコードする遺伝子は CGB3, 5, 7, 8 であるが、CGB1, 2 はコードしないため、前者のみを特異的に増幅するように、下記のようにその共通部分に設計した(図 4)。

Forward: 5'- TAGCACTCGACGACTGAGTCTC -3' (P0285)

Reverse: 5'- GACAACGACGACTCGTA -3' (P0286)

thermal cycling 条件は、95°C 5 分→95°C 10 秒, 58°C 5 秒, 72°C 15 秒をクール→82°C 5 秒とした。

検量線は対象とする PCR 産物をサブクローン化して連続的に希釈したものを用いた⁷⁹。

発現値の解釈としては、H6PD をレファレンスとして検体ごとに hCG β / H6PD の値を計算することで、真の hCG β の発現値として算出した⁴³。各検体の発現値は正常脳の発現値との比較として検討した。

H6PD の発現を調べるために用いたプライマーペアを以下に示す。

Forward: 5'- GATCCTGCCTTTCCGAGAC -3' (P0114)

Reverse: 5'- GACCTCCGTCAGATGGTTC -3' (P0115)

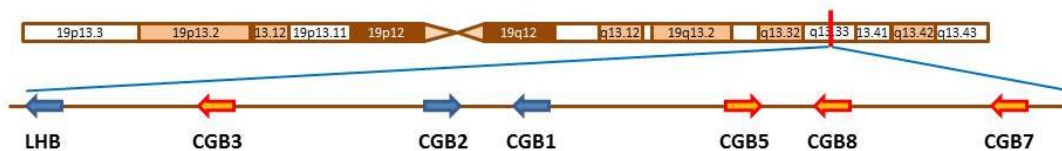


図 4 染色体 19q13.33 における CGB 遺伝子のクラスター

CGB3, 5, 7, 8 (橙色の矢印)のみが hCG β を code しており、これらのみを増幅するプライマーペアを設計した。

1.6. HCG 免疫染色

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)検体が提供された症例 40 例について hCG の免疫染色を施行した。一次抗体として hCG (1:500, Dako, Glostrup, Denmark)を用い、自動

染色装置 (Ventana Benchmark XT, Roche Tissue Diagnostics, Tokyo) にて行った。陽性細胞の割合と程度については光学顕微鏡のもとで群馬大学名誉教授、現日高病院病理部病理診断科 中里洋一先生により評価された。乳癌におけるエストロゲン・プロゲステロン受容体の発現を調べるために汎用されている“Allred score”を用いた⁸⁰。簡潔に記載すると、陽性細胞の割合にて 0 = none; 1 = <1/100; 2 = 1/100 to <1/10; 3 = 1/10 to <1/3; 4 = 1/3-2/3; 5 = >2/3 と分類した。強度は 0 = none, 1 = weak; 2 = intermediate; 3 = strong と分類した。両者の合計は 0~8 点となり、これを “Allred score” とした⁸¹。

1.7. 統計解析

統計解析は JMP version 10 (SAS Institute, Cary, NC) にて行った。mRNA の値は対数を計算し、これを Wilcoxon テストで解析した。mRNA 発現と免疫染色の比較は analysis of variance (ANOVA) で行った。p 値 < 0.05 を統計的に有意とした。

2. RNA シークエンス・Whole genome sequence (WGS)

2.1. RNA シークエンスと WGS の対象

59 例の中脳神経系胚細胞腫 (初発 50 例、再発 9 例)、3 例の精巣胚細胞腫、1 例の正常成人脳 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA)、1 例の成人正常精巣 (Cell Applications, San Diego, CA) を対象として、RNA シークエンスを行った。また 4 例の中脳神経系胚細胞腫を WGS の対象とした。中脳神経系胚細胞腫の凍結検体は頭蓋内胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアム (the iGCT Consortium) に参加している施設のうち、日本の 9 施設の脳神経外科 (表 4) より集められた。精巣胚細胞腫の凍結検体は横浜市立大学病院泌尿器科より提供された。本研究は国立がん研究センターおよび参加施設のそれぞれの倫理

委員会で承認を得たうえで行われた。

施設名	検体数
埼玉医科大学	27
広島大学	9
東北大学	8
東京大学	5
東京医科歯科大学	5
千葉県立がんセンター	2
宮崎大学	1
国立病院機構信州上田医療センター	1
杏林大学	1
合計	59

表 4 RNA シークエンスの対象とした 59 の中枢神経系胚細胞腫の検体の提供施設名一覧

RNA シークエンスの対象症例は、pure germinoma 34 例、mature teratoma 1 例、immature teratoma 3 例、teratoma with malignant transformation 1 例、germinoma mixed with non-germinoma 13 例、mixed non-germinoma 1 例、yolk sac tumor 4 例、embryonal carcinoma 1 例、unspecified high grade GCT 1 例であった。3 例の精巣腫瘍は横浜市立大学病院での病理診断を用い、seminoma mixed with non-seminoma 1 例と embryonal carcinoma 2 例であった。

また WGS 対象症例は、2 例の pure germinoma、2 例の yolk sac tumor を用いた。この 4 例は同一症例の正常血液も解析を行った。胚細胞腫の凍結検体は the iGCT Consortium に参加している施設のうち、日本の 2 施設の脳神経外科 (埼玉医科大学 3 例、関西医科大学附属枚方病院 1 例) より集められた。

組織型	検体数
Germinoma	34
Mature Teratoma	1
Immature Teratoma	3
Malignant Teratoma	1
Yolk Sac Tumor	4
Embryonal Carcinoma	1
Mixed Germinoma	13
Mixed NGGCT	1
Unspecified	1
Testicular GCTs	3
Normal Brain	1
Normal Testis	1

表 5 RNA シークエンスの対象とした 64 検体の中央診断病理組織、またはその他組織の内訳

2.2 RNA シークエンスの方法

RNA シークエンス用の 150~200 bp のライブラリ作成は 400 ng の total RNA より SureSelect Strand Specific RNA library preparation kit (Agilent Technologies)を用い、そのプロトコールに従って行った。Poly-A(+)の RNA を total RNA から精製し、fragmentation buffer にて 94°C 5 分で断片化したのち、二重鎖の cDNA を作成、3'末端をアデニル化し、SureSelect オリゴアダプターをライゲーションし、インデックスを付加し PCR 増幅を行った。ライブラリの精度は Agilent 2100 Bioanalyzer にて分析し、200~600 bp にシングルピークがあることを確認した。

シークエンス用のライブラリは Illumina c-Bot cluster generation system with TruSeq PE Cluster Kit v3 (PE-401-3001, Illumina)を用いて作成した。ライブラリは水酸化ナトリウムで変性させ、ハイブリダイゼーションバッファーに希釈した。このライブラリを HiSeq フローセルに 1 レーンに 4 検体ずつロードした。サンプルライブラリは clonal cluster を形成するために bridge amplification を行い、シークエンスプライマーでハイブリダイズさせた。Illumina HiSeq2000 にて 100bp の pair-end で読んだ。それぞれの end から sequencing-by-synthesis 反応を行っ

た。

PCR duplication (同一の paired-end read)を除去した後、100-bp paired-end reads の RNA シークエンスが RefSeq と Ensembl データベースにある既知の RNA シークエンスに Bowtie プログラムを用いて map された。Bowtie プログラムはミスマッチを 3 個まで許可して(-v 3 オプション)、また RNA データベースには多くの splice variant が含まれるので複数ヒットを許可して(-a オプション)実行された。正常な距離と方向のマッピングからベストヒットが選ばれ reads per kilobase per million mapped reads (RPKM)の値が算出された。

2.3. Fusion gene の解析

Fusion gene の検出力を増やすために、100 bp paired-end read の内側を 50bp カットして paired read の間に距離を増やして、Bowtie プログラムを使用して上記と同じ条件で再マッピングが行われ、2個以下のミスマッチで異なる遺伝子にユニークにマッピングされた paired read が選ばれた。

Fusion gene の検出は下記の方法で行われた。

- 1) 遺伝子上に固まってマッピングされる read のクラスターを forward と reverse のそれぞれの read について下記のように構築する。
- 2) 平均インサートサイズ(300bp)よりも短い距離にマッピングされた read を同じクラスターに含める。
- 3) クラスターサイズ(左端と右端の距離)が最大インサートサイズより大きいクラスターを削除する。
- 4) Forward read のクラスターと reverse read のクラスターについて、対となる paired read が含まれるクラスターのペアを fusion gene の候補とする。対となる paired read 以外はクラスター

一から削除する。

5) Basic local alignment search tool (BLASTN)プログラムを使用して、対となる paired read が同じ遺伝子上の正常な距離と方向に e-value < 10⁻¹ で検出されたクラスターは取り除く。

Sequence に伴う artefact を取り除くためのフィルターとしては、

- (1) リード数 3 以上
- (2) ミスマッチなしのリードが最低 1 個
- (3) がんセンターで解析時 (2014 年 3 月)までに fusion gene 検出を行ったサンプル(576 サンプル、様々な悪性腫瘍と正常組織サンプルを含む)全体の 5%以上で検出されていないを条件とし、かつ

- (1) in-frame で 2 つの遺伝子が結合しているの
 - (2) 複数の症例で見られる (recurrent)
 - (3) breakpoint が exon の断端と離れすぎしていない (1kb 以下)
- のすべてを満たすものをその後の validation study の候補とした。

2.4. ARR3-RAB41 fusion transcript の機能解析

2.4.1. ARR3-RAB41 fusion transcript の validation

Forward primer を ARR3 exon 15 内に、reverse primer を RAB41 exon2 内に設計し、cDNA に対して PCR を行うことで fusion の存在の有無を確認した(結果の項の図を参照)。Primer のシーケンスは、

Forward: 5'-AACCTGATGGTGTCTCTGTG-3' (P0337)

Reverse: 5'-AGCTGTTGTACATGAAGCG-3' (P0338)

とした。

2.4.2. 細胞株と培養

実験に用いた細胞株は、浸潤・遊走・増殖能の機能解析に Glioma 細胞株として T98G を用い、レンチウイルスの作成用に 293TN を、colony formation assay の解析のために NIH3T3 を用いた。T98G は RPMI1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA) に 10 % fetal bovine serum (FBS) を、293TN は DMEM (Sigma-Aldrich, Tokyo) に 10 % FBS を、NIH3T3 には DMEM (Sigma-Aldrich) に 10% calf serum を加えた。レンチウイルスベクター作成時の培地以外にはすべて 10 U/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin を加えた。

2.4.3. Transfection・レンチウイルス

T98G 細胞株に p3XFLAG-CMV-14 recombinant ベクターを PEI (GE Healthcare, Tokyo) にて transfection を行った。G418 で selection をかけ、empty vector (EV) と FUS1 についてそれぞれ 2 つずつの clone を作成した。

NIH3T3 細胞株についてはレンチウイルスを使用して感染を行った。まず 293TN 細胞株にパッケージベクター 3 種類と recombinant 発現ベクター 1 種類を Lipofectamine 2000 (Life Technologies) にて transfection をし、ウイルス作成を行った。ウイルスの濃縮には Peg-it Virus Concentration Solution (SBI) を用いた。ウイルスを NIH3T3 細胞株に感染させる際には Transdux (SBI) を用いた。ウイルスを添加後 2 日目から適切な濃度の puromycin にて選別を行い、1 週間の期間後に選択された細胞群を gene of interest (GOI) 発現細胞としてその後の解析に用いた。EV, ARR3, RAB41, FUS1, FUS2 についてはレンチウイルスで遺伝子導入

を行った NIH3T3 細胞株を作成した。

また colony formation assay の positive control としては、HRAS G12V 変異遺伝子の全長が導入された recombinant レンチウイルス CSII-CMV-RfA を NIH3T3 に感染させることにより、positive control として使用した。このレンチウイルスは理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けており、現慶応義塾大学の三好浩之氏によって開発されたものである。

2.4.4. Western blot によるタンパク発現の確認

GOI が発現していることの確認として、western blot を施行した。細胞を破碎して得られたライセートのタンパク濃度を BCA protein assay kit (TaKaRa) にてプロトコール通りに測定し、同量のタンパクを 10% SDS-PAGE によって分け、タンパクは polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜は Blocking One solution (TOYOBO) にて室温で 1 時間ブロックし、FLAG M2 抗体 (Sigma-Aldrich) を Can Get Signal (TOYOBO) にて 2000 倍に薄めたものを 1 時間投与した。PVDF 膜はその後 TVS-T で 3 回洗浄し、PVDF 膜上に結合した抗体をペルオキシダーゼケミルミネッセント試薬にて可視化した。

2.4.5. 細胞浸潤・遊走能、増殖能の解析

T98G に遺伝子導入を行って実験を行った。8.0 μ m の pore size の Boyden chamber cell culture insert (BD Falcon) を 24-well plate にセットし、migration assay はそのまま使用、invasion assay の場合は insert の membrane に collagen IA を apply した。Collagen : PBS を 1:4 の割合で混合し、実験の約半日前に 120 μ l ずつ apply した。T98G は 400 μ l の serum free の medium に 5×10^4 cell を混合し、upper chamber 内に apply した。Plate の well には

serum 10%の medium を 700 μ l apply した。24 時間 37°Cで incubation を行い、upper membrane surface に残った細胞は綿棒にてこそぎ取り、membrane の lower surface に migration または invasion した細胞は 4%パラホルムアルデヒドで固定し、ギムザ染色をしたのち、400 倍光学顕微鏡下で細胞数をカウントした。

データは control (parental cell または empty vector を transfection した細胞)に対する比として計算し、triplicate したものの平均を用いた。

2.4.6. 足場非依存性増殖(anchorage-independent growth)の解析

足場非依存性増殖は悪性腫瘍の形質の 1 つを反映していると考えられており、今回同定された fusion transcript が悪性腫瘍の性質をもたらすものかどうかを調べるために解析を行った。足場非依存性増殖の解析のために soft-agar colony formation assay を行った。

6-well plate のそれぞれの well に、0.6 %に medium (DMEM, FBS 10 %) で薄めた低融点の UltraPure Low Melting Point Agarose (ThermoFisher) を加え、この上の層として 0.35% の上記アガロースゲルの中に、目的とする遺伝子、または融合遺伝子を導入したリコンビナントのレンチウイルスを感染させた NIH3T3 細胞を 5×10^4 cell ずつ混合した。最上層には medium を 1 ml 加えた。9 日後にコロニーの形成の有無を 100 倍光学顕微鏡下で観察した。

2.5. Transcriptome 解析

2.5.1. 遺伝子発現データ解析

PCR duplication (同じ paired-end sequence)を除去した後、RNA シークエンスデータの 100-bp paired-end reads を RefSeq と Ensembl データベースにある既知の RNA シークエンス

に Bowtie プログラムを用いて map させた。これにより RPKM の値が計算された(上記)。

Hierarchical clustering は distance metric を Euclidean distance とし、Ward 法により行った。発現値は $\log_2(\text{RPKM})$ を用いた。0 の値は極めて小さい数値 ($8.28\text{e-}06$) で置換することにより、無限小にならないようにした。Coefficient of variance (CoV) を全サンプルに渡って計算し、 $\text{CoV} > 3$ となる遺伝子を選択した。

遺伝子変異のデータについては当研究室で過去に行われ、論文として投稿されている内容を用いた (Ichimura et al. “Recurrent neomorphic mutations of MTOR in central nervous system and testicular germ cell tumors may be targeted for therapy”)。MAPK 経路の遺伝子として、*KIT*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *RRAS2*, *NF1*, *CBL*, *FGD6*, *FGFR2*, *TRAF6*, *F2R* を、PI3K 経路の遺伝子として、*MTOR*, *PTEN*, *PIK3C2B*, *PIK3R2*, *MDM2* が対象となっている。

また染色体不安定性の “severe”, “mild” の定義として、Fukushima et al. による論文 “Mutually exclusive mutations of KIT and RAS are associated with KIT mRNA expression and chromosomal instability in primary intracranial pure germinomas. *Acta neuropathologica*. 2014;127(6):911-925” を用いた⁴³。

2.5.2. Gene-set enrichment analysis と Gene Ontology (DAVID)

Germinoma のクラスター間で統計学的に有意に発現が異なる遺伝子を同定するため、Broad Institute が提供している Molecular Signatures Database v5.0 (MSigDB) における gene-set enrichment analysis (GSEA) を施行した (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)。Gene set として C5: GO gene sets (Biological process: BP, Cellular component: CC, Molecular function: MF) と Canonical pathways: CP を用いた。データは $\log_2(\text{RPKM})$ の値を使用した。

また heatmap にて各組織型のクラスターに特徴的な遺伝子群を抽出し、その遺伝子群が反映する gene ontology を探索するために、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)を使用した(<https://david.ncifcrf.gov/>)⁸²。Gene set として Gene_Ontology (BP_FAT, CC_FAT, MF_FAT) , Pathways (BBID, BIOCARTA, KEGG_PATHWAY)を用いた。

2.5.3. Public Data

ヒト発生初期の細胞や ESC, PGC の発現データを Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)から取得して本解析の発現データとの共解析に用いた (Accession Code: GSE 60138, 63818)。

GSE Number	Author	Journal	Cells
60138	Irie N, et al.	<i>Cell</i> 160, 2015	ESC, PGC, PGCLC
63818	Guo F, et al.	<i>Cell</i> 161, 2015	All other cells

表 6 Gene Expression Omnibus より取得して解析に使用した RNA シークエンスによる発現データ一覧

2.6. Whole Genome Sequencing の方法

4 症例に対して施行した。症例番号は GCT01, 25, 29, 167 で、pure germinoma 2 例と YST 2 例である。300~500 bp のライブラリ作成は 200ng の DNA から TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Agilent Technologies)をプロトコール通りに使用して行った。DNA を Covaris S2 system (Covaris, Inc. Woburn, MA)にて 350 bp のインサートサイズに断片化 (10 % duty, 5 intensity with 200 cycles per burst for 45 seconds)、end repair を行い、3' end をアデニル化、その後 DNA アダプターインデックスをライゲートした。アダプターがライゲートされたライブラリは Bioanalyzer 2100 DNA High Sensitivity Chip (Agilent Technologies)に

て 350 bp にピークが存在することを確認した。

ライブラリは TruSeq PE Cluster Generation Kits (Cat. No. PE-401-3001)と cBOT cluster generation system (Illumina)を用いてシーケンス用に調整した。ライブラリは水酸化ナトリウムで変性させ、ハイブリダイゼーションバッファーに希釈した。このライブラリを HiSeq フローセルに 1 症例ずつ(腫瘍を 5 レーン、正常血液を 3 レーン)ロードした。サンプルライブラリは clonal cluster を形成するために bridge amplification を行い、シーケンスプライマーでハイブリダイズさせた。シーケンスは Illumina Genome Analyzer II と HiSeq 2000 のプラットフォームにて 100 bp の paired-end read にて施行した。それぞれの end から sequencing-by-synthesis 反応を行った。

Rearrangement の検出力を増やすために、腫瘍サンプルと正常サンプルの両方について、100 bp paired-end read の内側を 50bp カットして paired read の間に距離を増やして、human reference genome (GRCh37/hg19)に Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (version 0.4.9) と独自に開発したプログラムを用いて alignment を行った。PCR 増幅の工程で産生される重複する read については SAMtools (version 0.1.5c)を用いて同一のゲノム領域に align するものを除去した。

構造異常を検索するために paired-end reads のそれぞれが human reference genome に固有に align され、正常のゲノム配列とは異なる距離、方向であるものを選択した。最初に 2 つのフィルターを用いて品質の悪い read を取り除いた; 1) mapping quality score > 37, 2) mismatch が 2 以下。

構造異常は以下の条件で抽出した。

- 1) 腫瘍サンプルについてゲノム上に固まってマッピングされる read のクラスターを forward と reverse のそれぞれの read について下記のように構築する。

- 2) 平均インサートサイズ(350bp)よりも短い距離にマッピングされた read を同じクラスターに含める。
- 3) クラスターサイズ(左端と右端の距離)が最大インサーサイズより大きいクラスターを削除する。
- 4) Forward read のクラスターと reverse read のクラスターについて、対となる paired read が含まれるクラスターのペアを rearrangement の候補とする。対となる paired read 以外はクラスターから削除する。
- 5) ゲノム上の位置がオーバーラップするクラスターは全て取り除く。
- 6) read 数が 4 未満のクラスターは取り除く。
- 7) 完全一致の paired read がないクラスターは取り除く。
- 8) 正常サンプルにゲノム上の位置がオーバーラップする paired read があるクラスターは取り除く。
- 9) BLASTN プログラムを使用して、対となる paired read がゲノム上の正常な距離と方向に $e\text{-value} < 10^{-1}$ で検出されたクラスターは取り除く。
- 10) 他の正常サンプルにゲノム上の位置がオーバーラップする paired read があるクラスターは取り除く。

2.7. 統計解析

統計解析は JMP version 10 (SAS Institute, Cary, NC)にて行った PFS の解析は log-rank test で解析した。3 群間の性別や発生部位の違いについては Pearson の χ^2 二乗検定で解析した。腫瘍細胞含有率の比較や 2 群間の融合遺伝子の数の比較、融合遺伝子の機能解析における遊走能・浸潤能・増殖能の比較は Wilcoxon テストで解析した。mRNA 発現と

免疫染色の比較は ANOVA で行った。p 値 < 0.05 を統計的に有意とした。Heatmap 作成、principal component analysis などは R version 3.2.0 (<https://www.r-project.org/>)を用いて行った。

V 結果

1. HCG 発現解析

1.1. 対象症例の臨床情報と解析対象の選択方法

93 例に対して hCG β の発現解析を行った。93 例のうち 83 例は初発例であり、10 例は再発症例であった。81 例が男性、12 例が女性であった。診断時の年齢は 2 ヶ月～45 歳に渡った(中央値 15 歳、平均 17 歳)。Pure germinoma はリンパ球浸潤が多いことが知られ、病理学的に典型的な”two-cell pattern”が観察されることが多い⁸³。共存している非腫瘍細胞が発現解析の解釈を困難にすることを避けるため、病理所見で腫瘍細胞が 10%以上見られる症例を解析に含めることとした。

1.2. 組織ごとの hCG β の発現

hCG β は 4 例(1 例の pure germinoma, 2 例の mature teratoma, 1 例の germinoma mixed with immature teratoma and STGC)を除き、胚細胞腫の全例において様々なレベルで発現していた。ほとんどの症例(83/89 例、93.3 %)において正常脳組織よりも hCG β の高い発現が見られた(脳との比で $1.09 \times 10^0 - 1.40 \times 10^5$)。更にその多くで成人の正常精巣よりも高発現が見られた(76/89 例、85.4 %)。図 5 はそれぞれの組織型での発現レベルを示している。この中で唯一の choriocarcinoma の症例が圧倒的に高い発現を示していることがわかる。次に高いのが immature teratoma や STGC や choriocarcinoma 成分を有する germinoma の症例である。Pure germinoma は mature teratoma や immature teratoma, YST よりも有意に高い発現を示した(それぞれ $p=0.01, 0.02, 0.02$, Wilcoxon's test)。

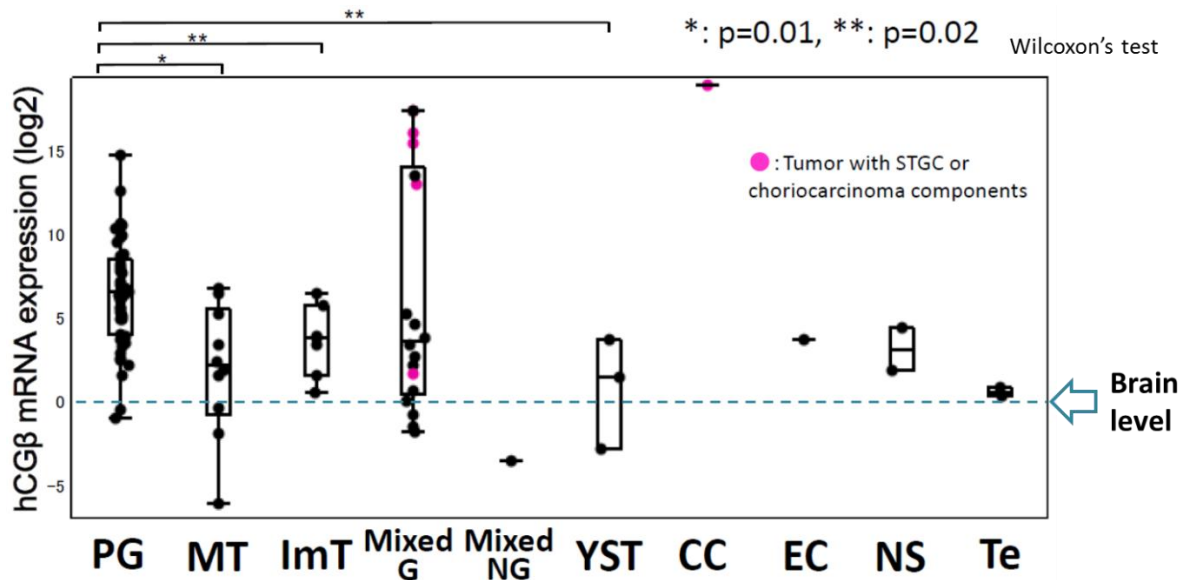


図5 全ての組織型におけるhCGβ発現値

最も高発現の症例はchoriocarcinomaの1例で、次にgerminoma with mixed componentsが続く。Germinoma with mixed componentsにおけるhCGβの発現は様々な値をとり、二峰性を示している。STGCやchoriocarcinoma成分を有する症例(ピンク色の丸)はそれらが無い症例よりも高い値をとる傾向がある。Pure germinomaにおける発現値はmature teratomaやimmature teratoma、YSTに比べて有意に高地である(それぞれp=0.01, 0.02, 0.02, Wilcoxon's test)。(*: p=0.01, **: p=0.02)

PG: Pure Germinoma, MT: Mature Teratoma, ImT: Immature Teratoma, YST: Yolk sac Tumor

CC: Choriocarcinoma, EC: Embryonal Carcinoma, NS: Not-specified, Te: Normal Testis, STGC: syncytiotrophoblastic giant cells

(Takami, et al. Human Chorionic Gonadotropin is Expressed Virtually in All Intracranial Germ Cell Tumors. *J Neurooncol.* 2015 Aug;124(1):23-32.より改変)

1.3. GerminomaにおけるhCGβ発現

49例のgerminomaのうち2例がSTGC成分を有していた。これら2症例のhCGβの発現は、他の1例のpure germinomaと共に最も高い発現を示した(図6)。他のpure germinomaの発現は幅広いレベルを示した。脳との比は $1.09 \times 10^0 \sim 5.88 \times 10^4$ であった。発現の値の分布は連続的であり、二峰性を示さなかった(図6)。

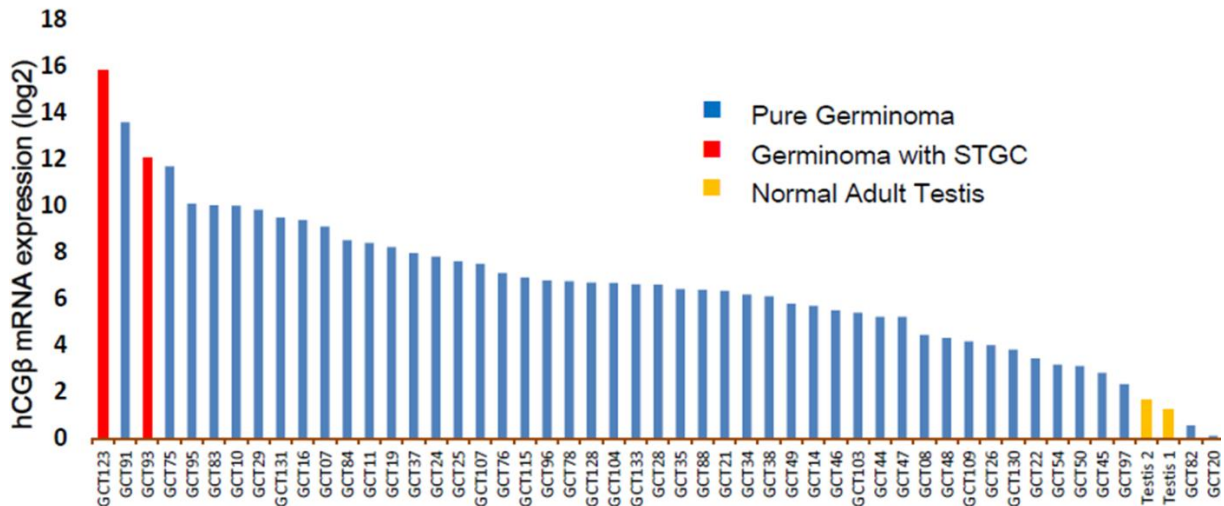


図 6 Germinoma (pure germinoma と germinoma with syncytiotrophoblastic giant cells (STGC)) と 2 つの正常成人精巣サンプルにおける hCGβ 発現値

正常脳と比べて全ての検体において高発現を示し(>0)、ほとんどの症例(48/50 例、96%)において正常精巣に比べて高発現を示す。その中でも 2 例の germinoma with STGC は 1 番目、3 番目に高発現を示す。発現レベルは二峰性でなく、連続的な変化を示している。

(Takami, et al. Human Chorionic Gonadotropin is Expressed Virtually in All Intracranial Germ Cell Tumors. *J Neurooncol.* 2015 Aug;124(1):23-32.より改変)

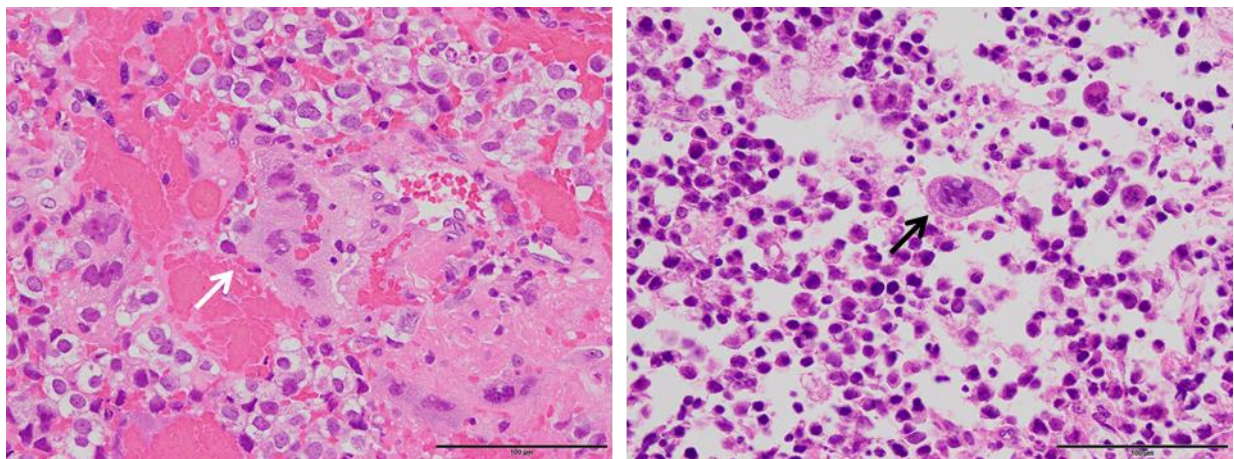


図 7 Germinoma の中で hCGβ mRNA の発現が高かった STGC 成分を含む症例の病理写真 (左)GCT93 (右)GCT123 矢印:STGC 黒棒:100µm

1.4. 発現値と血清/髄液中の hCG の値の相関

hCG の濃度については血清中のデータとして 55 例、髄液中のデータとして 25 例で得られた。このうち total hCG の値が測定されたのはそれぞれ 30 例、19 例においてであった。hCGβ の発現値と血清/髄液中の濃度の比較を行った。腫瘍の hCGβ mRNA 発現値は血清中/

髄液中の total hCG の値の両方ともと正の相関を示す傾向が見られた。発現値の log 値と血清中／髄液中の濃度との相関についての R^2 値はそれぞれ 0.34, 0.11 であった(図 8)。

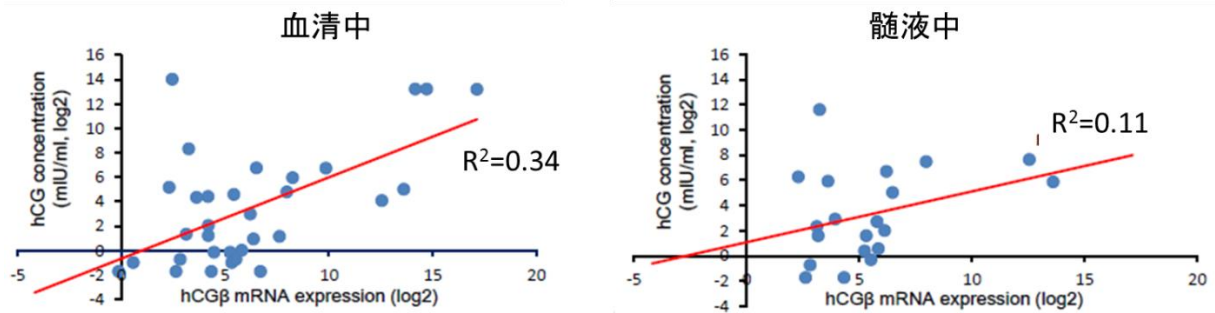


図 8 全ての組織型での hCGβ の発現値と血清(左)／髄液(右)中の濃度の相関
血清中の濃度との相関は見られる($R^2=0.34$)が、髄液中の濃度との相関は弱い($R^2=0.11$)。
(Takami, et al. Human Chorionic Gonadotropin is Expressed Virtually in All Intracranial Germ Cell Tumors. *J Neurooncol.* 2015 Aug;124(1):23-32.より改変)

胚細胞腫の多くは heterogeneous であり組織型の混合がある(mixed GCT)、または 3 胚葉(内胚葉・中胚葉・外胚葉)成分を有する teratoma であり、測定された mRNA 発現値は解析に使われた腫瘍組織の一部を反映したに過ぎず、必ずしも腫瘍全体の全ての組織型を反映したものではない。従って本解析では pure germinoma と単一組織型の NGGCT に解析対象を絞って解析を施行した。血清中／髄液中の hCG の濃度が得られた症例はそれぞれ 21 例、11 例であった。hCGβ の mRNA 発現値と血清／髄液中の hCG 濃度の相関は、全ての組織型を含めた上記解析よりも高くなり、 R^2 値はそれぞれ 0.62, 0.40 であった(図 9)。

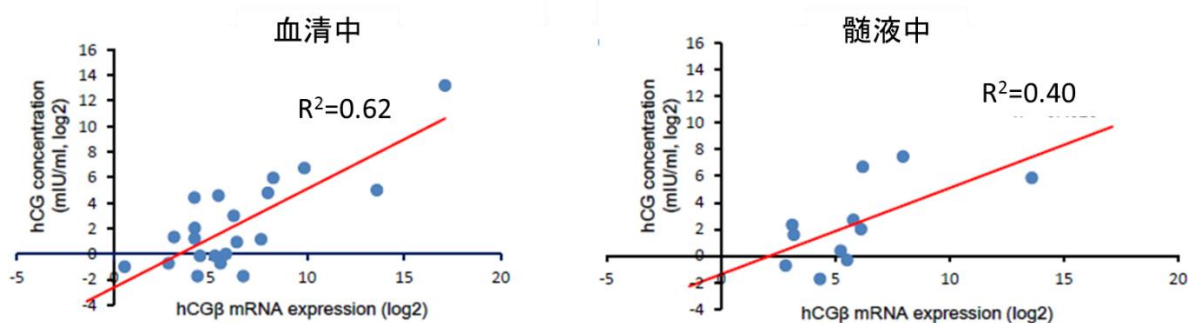


図 9 単一の組織型での hCGβ の発現値と血清(左)／髄液(右)中の濃度の相関
両者の相関は全ての組織型を含めた解析時よりもより強くなる(それぞれ $R^2=0.62$, 0.40)。

(Takami, et al. Human Chorionic Gonadotropin is Expressed Virtually in All Intracranial Germ Cell Tumors. *J Neurooncol.* 2015 Aug;124(1):23-32.より改変)

1.5. 発現と免疫染色の相関

Allred score (割合と強度の合計値) は免疫染色の解析の対象とした胚細胞腫 40 例において 0~8 点であった。最高点は 3 例に見られ、2 例の germinoma mixed with STGC と 1 例の germinoma with a choriocarcinoma component であった。mRNA 発現値の結果と同様、pure germinoma の症例は 0~5 点まで幅広い値を取った。発現値と免疫染色の値の間には、統計学的に有意に近い直線的な正の相関を示した ($p=0.0502$, analysis of variance) (図 10)。

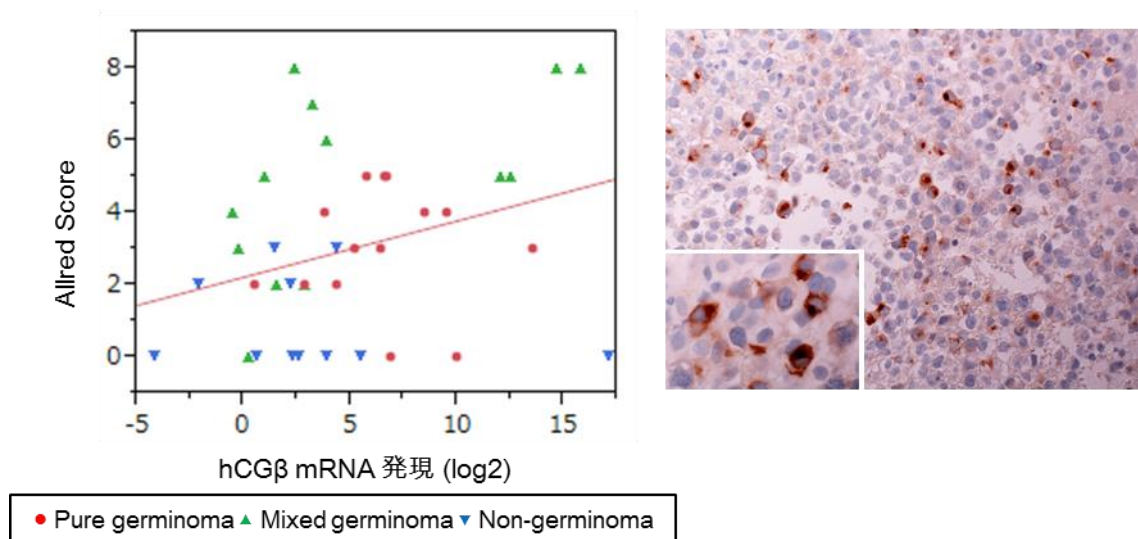


図 10 hCGβ の発現値と hCG 免疫染色のスコア (Allred score) の相関 (左) と pure germinoma の代表的な染色標本 (右)

Analysis of variance では統計学的に有意に近い相関が示された ($p = 0.0502$)。pure germinoma の代表的な染色標本を B に示す ($\times 200$, inset: $\times 400$)。

(Takami, et al. Human Chorionic Gonadotropin is Expressed Virtually in All Intracranial Germ Cell Tumors. *J Neurooncol.* 2015 Aug;124(1):23-32.より改変)

1.6. 腫瘍部位別の hCGβ 発現

hCGβ 発現値と腫瘍の部位についての比較を 41 例の pure germinoma について行った。胚細胞腫は神経下垂体部や松果体部などの中心構造物に生じやすいため、発現値は中

心構造物の症例とそれ以外(視床、基底核、大脳半球、後頭蓋窩など)の症例とで比較した。脳室内に生じた腫瘍の場合は中心構造物にも腫瘍が見られた場合は中心構造物の腫瘍とした。32 例が中心構造物の腫瘍(midline tumor)、残り 9 例が中心構想物以外の腫瘍(non-midline tumor)と分類された。中心構造物にできた腫瘍はそれ以外に比べて有意に低い発現値を示した(log2 の値として、6.0 vs 8.4, $p=0.007$, Wilcoxon's test) (図 11)。

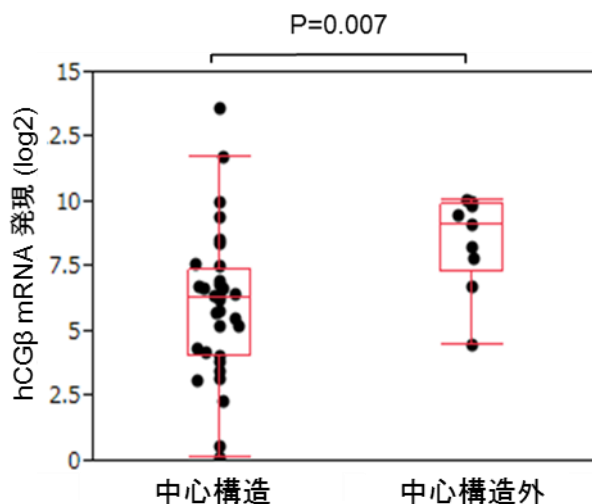


図 11 初発の pure germinoma における腫瘍の発生部位による hCGβ 発現値の比較

中心構造(神経下垂体部、松果体)に生じた腫瘍よりもそれ以外に生じた腫瘍の方が有意に発現が高かった($p=0.007$)

(Takami, et al. Human Chorionic Gonadotropin is Expressed Virtually in All Intracranial Germ Cell Tumors. *J Neurooncol.* 2015 Aug;124(1):23-32.より改変)

1.7. hCGβ 発現値と予後

次に hCGβ 発現が pure germinoma の予後に関わる影響を、最初の治療から3年以上経過した症例において解析した。全部で 32 例の症例のうち、6 例が再発し、そのうち 1 例が死亡した。下記表に再発の有無で分けた時の 2 群の臨床的特徴を記載した。年齢、性別、腫瘍の部位、手術、化学療法の内容は 2 群間で明らかな差はなかった。しかし、局所放射線療法は、腫瘍部位を含む局所と脳室を含む拡大局所放射線療法と比べて、再発しなかった症例(1/26)より再発症例(2/6)に行われていた。

	With Recurrence(n=6)	Without Recurrence(n=26)
Age (years)	23.5±3.6	18.8±3.5
Sex (M/F)	5/1	24/2
Tumour location		
neurohypophyseal, pineal region	4	22
other region	2	4
Operation (biopsy+partial/subtotal+total)	1/5	2/24
Radiation field (local/extensive)	2/4	1/25
Chemotherapy (none/performed)	1/5	1/25
hCG mRNA expression (log2)	6.6±2.6	6.2±1.2

表 7 再発の有無による hCG β 発現値の比較に用いた 2 群の症例の特徴

放射線治療の範囲の違いが hCGβ 発現値と再発の相関の分析に及ぼす影響を排除するため、局所放射線治療より広範な放射線治療を受けた 29 例に絞って解析を行った。再発の有無により hCGβ の発現値の有意な違いは見られなかった (log2 値で 7.7 vs 6.0, $p=0.16$, Wilcoxon's test) (図 12)。

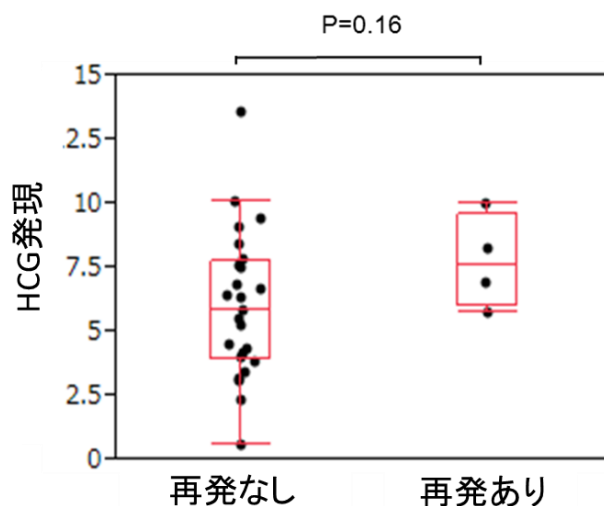


図 12 初発の pure germinoma における腫瘍の再発あり (n=4)、なし (n=25) の症例における hCGβ 発現値の比較

再発の有無と hCGβ 発現値の間には有意な相関はなかった ($p=0.12$)。

(Takami, et al. Human Chorionic Gonadotropin is Expressed Virtually in All Intracranial Germ Cell Tumors. *J Neurooncol.* 2015 Aug;124(1):23-32.より改変)

2. トランスクリプトーム解析

59 例の中枢神経系胚細胞腫と 3 例の精巣胚細胞腫、1 例ずつの正常成人脳、精巣組織に対して、全遺伝子的発現解析とゲノム構造異常(融合遺伝子)の探索を目的として RNA シークエンスを行った。

RIN 値が 3 未満のものが 15 例と、mRNA の分解が進んでいる症例も少なからず解析対象とした。これは一般的な GCT の組織型の分布を反映するために選択する必要があったためである。これらの検体では一度の sequence では coverage が足りず、2 回の sequence を行って合計して解析する必要が生じたものが含まれる。

2.1. 発現データ解析

2.1.1. 全サンプルの発現を対象としたヒートマップ

胚細胞腫全症例と正常検体 2 例を含めた Unsupervised hierarchical clustering の結果を図 13 に示した。Germinoma と Non-germinoma/Mixed germinoma は明確に 2 群に分かれた。

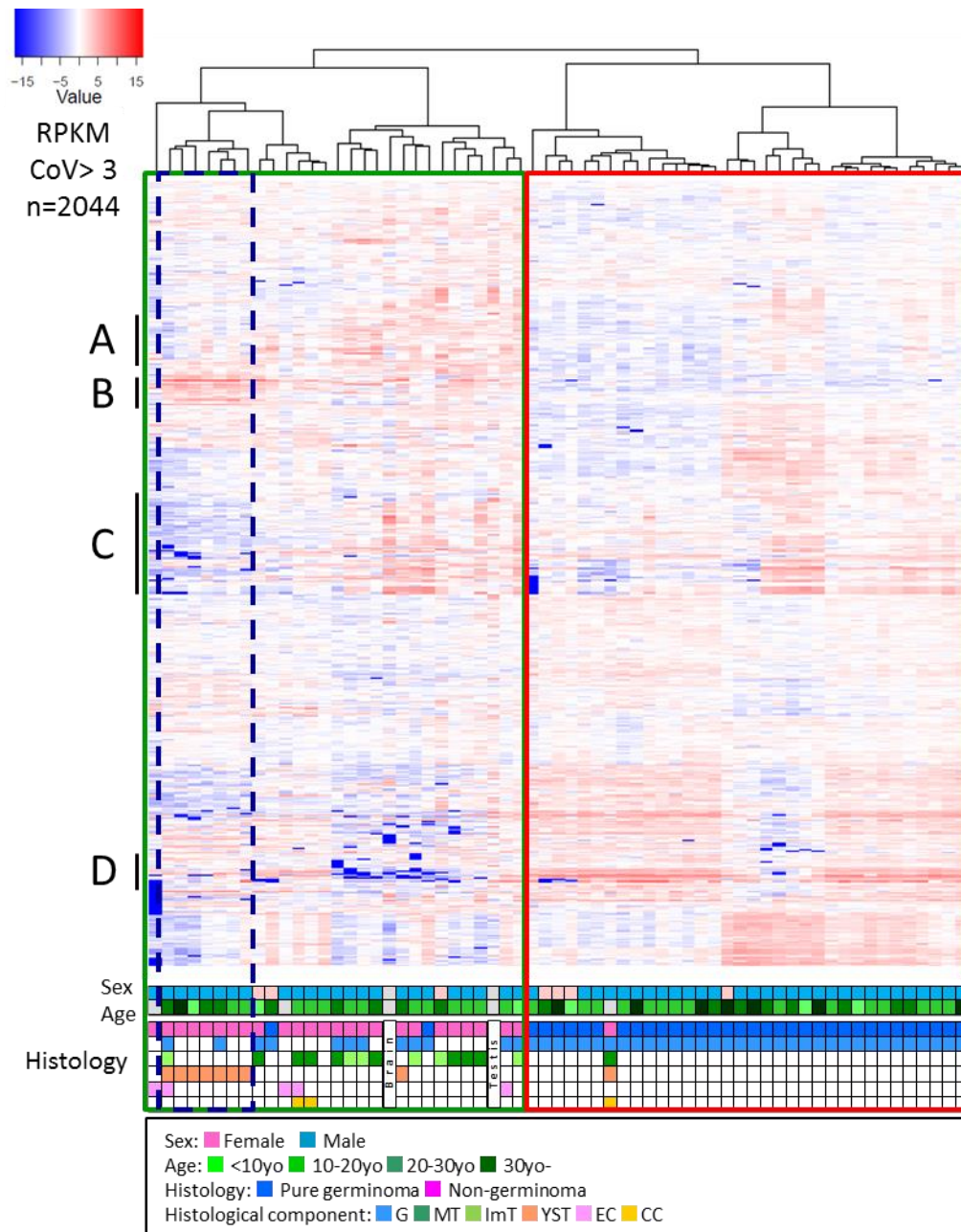


図 13 64 検体全てを対象とした **unsupervised hierarchical clustering** による **heatmap**

64 のサンプルを対象とし、coefficient of variance > 3 となる遺伝子 (n = 2044) を対象とした。下段に臨床情報を記載した。Germinoma (赤枠) と non-germinoma (緑枠) は明確に二分され、non-germinoma の中では yolk sac tumor (青の点線枠) が一群を形成した。A~D は組織型を特徴づける遺伝子群として後の gene ontology の解析に使用した部分を示した。

ヒートマップの作成は国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野 加藤護先生の協力により作成した。

略称: G: germinoma, MT: mature teratoma, ImT: immature teratoma, YST: yolk sac tumor, EC: embryonal carcinoma, CC: choriocarcinoma

Non-germinoma の中では YST が明確な 1 つの群を形成していた。Teratoma も比較的クラスタリングしていた。Teratoma の近傍に正常脳や正常精巣の検体が位置していることも見られ

た。

YST において高発現している遺伝子群 (図 13 の B) を Gene Ontology (GO, DAVID) で解析を行った。False discovery rate (FDR: 棄却された帰無仮説のうち、真の帰無仮説の割合) q value < 0.1 のものを選択した (以下同様)。

Category	Term	Count	List Total	%	P Value	Fold Enrichment	FDR q value
GOTERM_CC_FAT	GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	6	31	18.2	8.12E-04	7.7	0.009

表 7 Heatmap における遺伝子クラスター“B”の遺伝子を DAVID で解析し、有意と判断された gene ontology term の一覧

次に teratoma 群で発現上昇している遺伝子群 (図 13 の A・C) を DAVID で解析を行った。

Category	Term	Count	List Total	P Value	Fold Enrichment	FDR q value
GOTERM_BP_FAT	GO:0048584~positive regulation of response to stimulus	10	114	1.59E-04	5.03	0.003
GOTERM_CC_FAT	GO:0044459~plasma membrane part	38	120	1.44E-04	1.84	0.002
GOTERM_MF_FAT	GO:0019955~cytokine binding	6	113	2.50E-03	6.32	0.033
GOTERM_CC_FAT	GO:0031410~cytoplasmic vesicle	14	120	6.70E-03	2.32	0.080
GOTERM_CC_FAT	GO:0019717~synaptosome	6	120	1.17E-03	7.52	0.014

表 8 Heatmap における遺伝子クラスター“A”と“C”の遺伝子を DAVID で解析し、有意と判断された gene ontology term の一覧

2.1.2. Germinoma の 3 群

上記の胚細胞腫全体を対象として解析した際の heatmap において、germinoma の発現プロファイルは 3 群に分かれることが示された (図 14)。

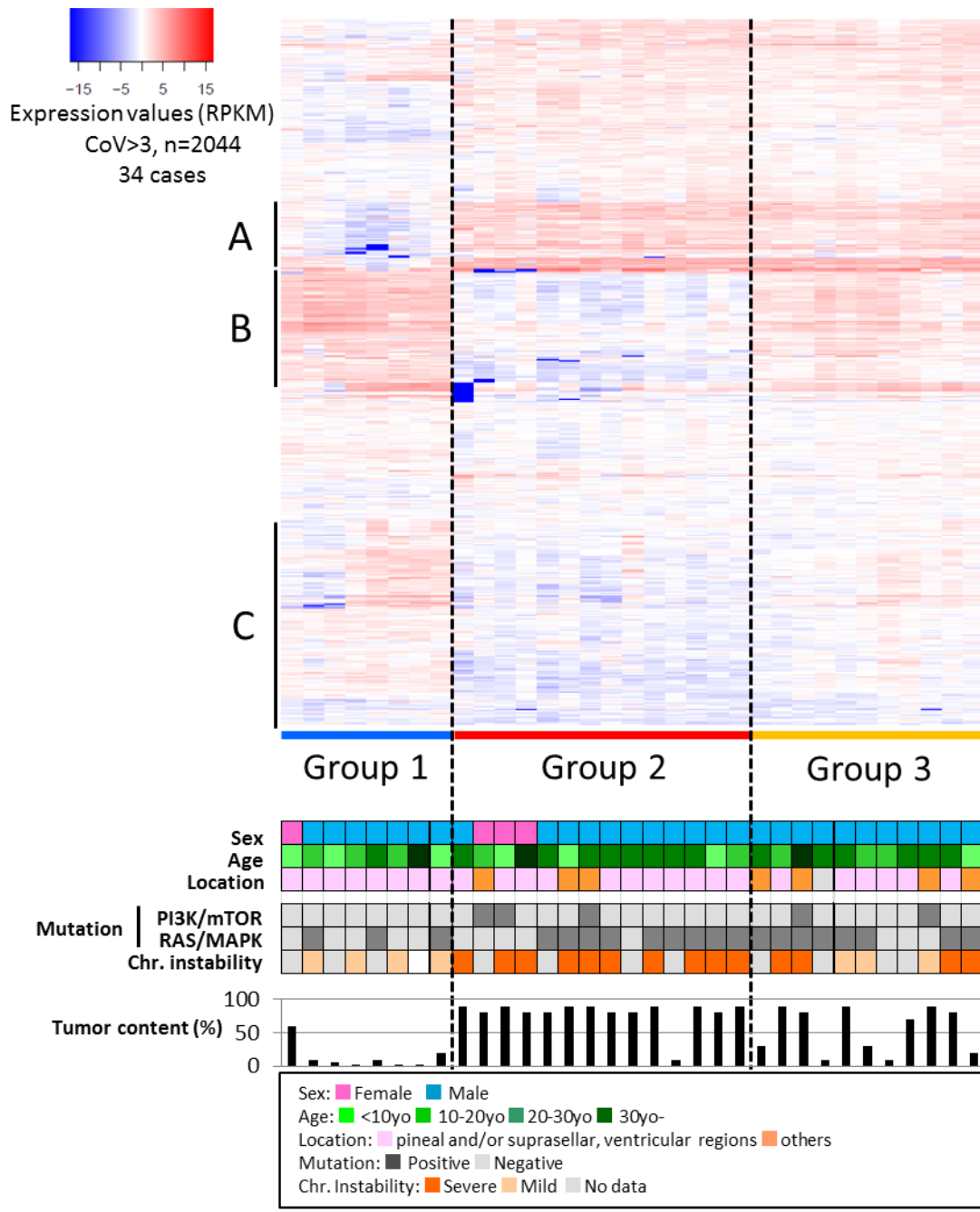


図 14 Germinoma 33 例についての unsupervised hierarchical clustering による heatmap

Germinoma は発現レベルで 3 群に分かれる。下段に臨床情報 (性別・年齢・部位) と遺伝子変異、染色体数異常の程度、HE 染色標本における顕微鏡下での腫瘍細胞含有率を示した。Group 2 は腫瘍含有率が高く、遺伝子変異が多く、染色体不安定性が強かった。Group 1 はその逆の傾向を示した。Group を特徴づける遺伝子群を A~C で示した。

ヒートマップの作成は国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野 加藤護先生の協力により作成した。

Heatmap での左から右の順にクラスターされているそれぞれの群を Group1~3 と呼ぶこととした。Group1, 2, 3 における症例数はそれぞれ、8, 14, 11 例であった。これらの germinoma

3群における臨床的な背景の違いを調べた。

年齢と性別についての特徴を示す。年齢分布は Group2 と 3 においてほぼ近似的な所見を示したが、Group1 は 20 代以上の年齢に多く分布していることが分かった。また性別は Group1 と 2 は同様であったが、Group3 は 11 例全例で男性であった (χ 二乗検定, Pearson's p value = 0.22)。

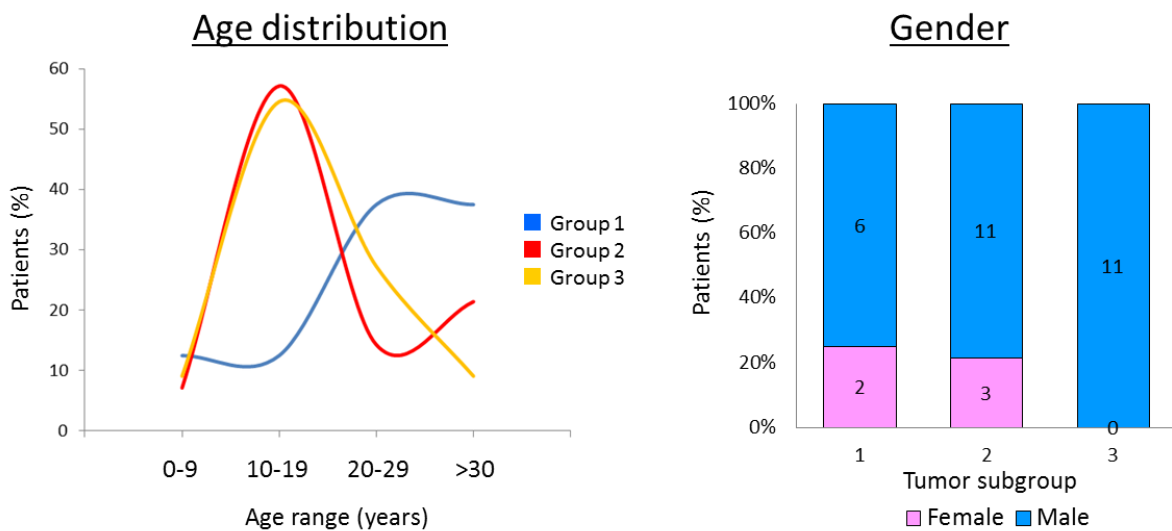


図 15 Germinoma 3 群における年齢(左)と性別(右)の分布

Group 2 と 3 の症例はほぼ近似する年齢分布を示したが、Group 1 は 20 代以降に症例が集まる傾向を示した。性別は Group 1 と 2 は同様な分布だが、Group 3 は女性の症例がなかった。

光学顕微鏡下で観察した際の腫瘍細胞割合は Group1 で有意に低く、Group2 で高く、Group3 でその中間を示した。

腫瘍発生部位を典型的な中心構造物(神経下垂体、松果体、脳室)とそれ以外で分けた時のそれぞれの group での分布を示す。Group 3 では中心構造以外で生じる傾向があるが、有意差はない (χ 二乗検定, Pearson's p value = 0.59)。

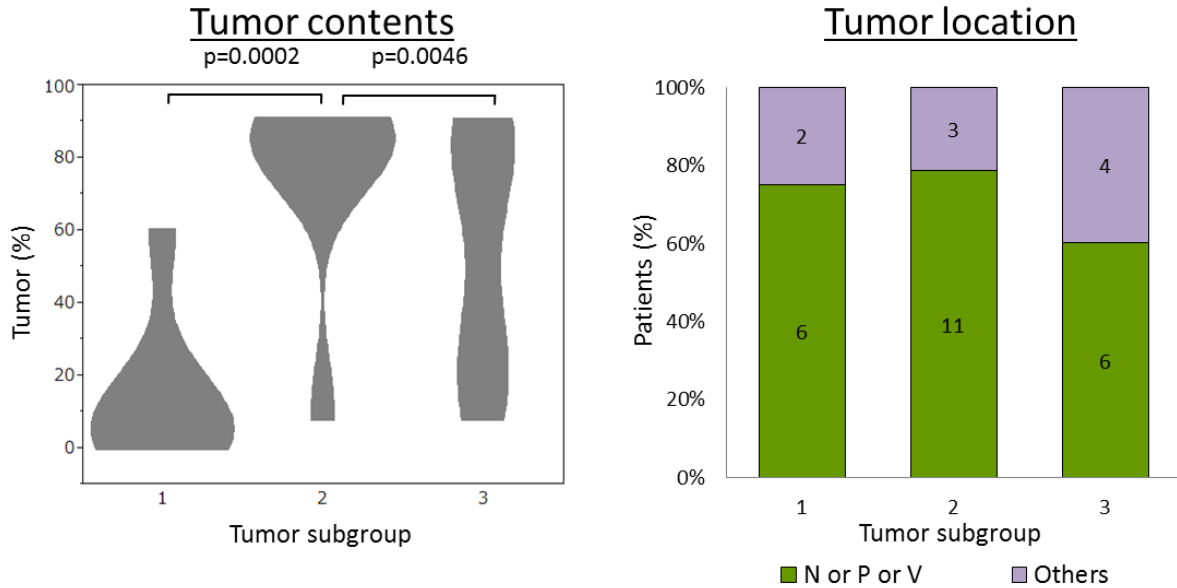


図 16 Germinoma 3 群における腫瘍細胞含有率(%) (左)と腫瘍発生部位(右)の分布

腫瘍細胞の割合は Group 1 で低く、Group 2 で高く、Group 3 は二峰性を示している。腫瘍発生部位は Group 3 で典型的な中心構造以外の部位で発生する傾向がある。

N: neurohypophyseal region, P: pineal region, V: ventricles

次に予後の比較を行った。対象として、初発症例で脳室を含む放射線治療とプラチナ製剤を基本とする化学療法を行った症例に限って予後解析の対象とした。対象は Group 1, 2, 3 においてそれぞれ 8, 12, 7 症例であり、再発を検討した。

平均のフォローアップ期間は Group 1~3 それぞれで、10~228 ヶ月 (平均 88.1 ヶ月)、10~141 ヶ月 (平均 98.3 ヶ月)、30~255 ヶ月 (平均 117.0 ヶ月) であった。再発例はそれぞれのグループにおいて 0, 3, 1 例であった。

Group 2 において最も再発が多く、予後が悪いと考えられた。Group 2 vs その他の症例での log-rank test による予後の解析にて、 $p = 0.18$ であった。

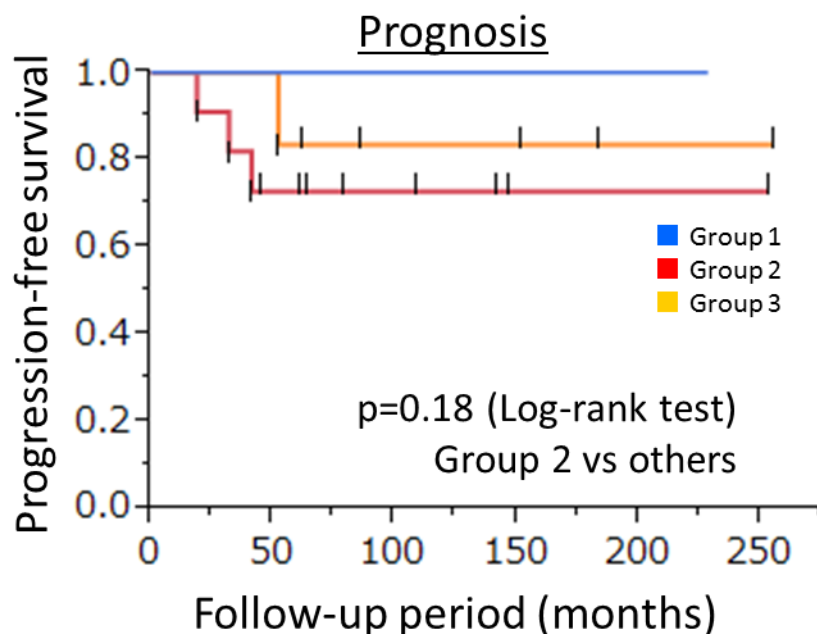


図 17 Germinoma 3 群の progression free survival の Kaplan-Meier プロット

初発症例であり、かつ脳室を含む放射線治療と標準的なプラチナ製剤を含む化学療法を受けた症例のみを対象とした。Log-rank test において $p=0.18$ と有意差はないものの、他の 2 群との比較では Group 2 が最も予後が悪い傾向が見られた。Group 1 の症例には再発は見られなかった。

次にそれぞれの群の特徴的な遺伝子についての検討を行った。上記図 14 において

heatmap 上抽出を行った遺伝子群 A~C について、DAVID で解析を行った。

Gene category “A”

Category	Term	Count	List Total	%	P Value	Fold Enrichment	FDR q value
GOTERM_CC_FAT	GO:0005576~extracellular region	22	55	22.7	3.2E-05	2.5	0.0004
GOTERM_MF_FAT	GO:0005179~hormone activity	7	70	7.2	2.3E-05	12.0	0.0003
GOTERM_BP_FAT	GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	18	66	18.6	3.5E-03	2.1	0.0505
GOTERM_BP_FAT	GO:0007128~meiotic prophase I	3	66	3.1	1.2E-03	55.9	0.0179
GOTERM_BP_FAT	GO:0007267~cell-cell signaling	12	66	12.4	1.2E-04	4.1	0.0018

Gene category “B”

Category	Term	Count	List Total	%	P Value	Fold Enrichment	FDR q value
GOTERM_CC_FAT	GO:0005886~plasma membrane	52	85	43.0	2.79E-09	2.07	3.21E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0002684~positive regulation of immune system process	13	94	10.7	7.89E-08	7.86	1.27E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0045321~leukocyte activation	12	94	9.9	8.02E-07	7.14	1.29E-05
KEGG_PATHWAY	hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	13	51	10.7	5.71E-06	4.95	5.72E-05
GOTERM_CC_FAT	GO:0005576~extracellular region	25	85	20.7	1.99E-03	1.87	2.26E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0002683~negative regulation of immune system process	6	94	5.0	2.62E-04	10.40	4.21E-03
GOTERM_MF_FAT	GO:0019955~cytokine binding	8	85	6.6	6.45E-06	11.21	8.31E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0060558~regulation of calcidiol 1-monooxygenase activity	3	94	2.5	9.60E-04	61.68	1.53E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0005125~cytokine activity	7	85	5.8	1.64E-03	5.48	2.09E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0001817~regulation of cytokine production	7	94	5.8	1.54E-03	5.57	2.45E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0043067~regulation of programmed cell death	15	94	12.4	1.25E-03	2.66	1.99E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0001817~regulation of cytokine production	7	94	5.8	1.54E-03	5.57	2.45E-02
KEGG_PATHWAY	hsa04621:NOD-like receptor signaling pathway	5	51	4.1	3.03E-03	8.04	3.00E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0006935~chemotaxis	6	94	5.0	4.90E-03	5.40	7.60E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0005529~sugar binding	7	85	5.8	1.64E-03	5.48	2.09E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0009615~response to virus	6	94	5.0	9.17E-04	7.92	1.47E-02

Gene category “C”

Category	Term	Count	List Total	%	P Value	Fold Enrichment	FDR q value
GOTERM_CC_FAT	GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	14	150	7.14	9.37E-05	3.73	0.001
GOTERM_CC_FAT	GO:0031226~intrinsic to plasma membrane	28	150	14.29	7.67E-04	1.96	0.010
GOTERM_BP_FAT	GO:0016477~cell migration	9	126	4.59	4.08E-03	3.50	0.065
GOTERM_BP_FAT	GO:0048729~tissue morphogenesis	8	126	4.08	1.40E-03	4.77	0.023
GOTERM_BP_FAT	GO:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis	5	126	2.55	1.88E-03	9.42	0.030
GOTERM_BP_FAT	GO:0048598~embryonic morphogenesis	10	126	5.10	2.18E-03	3.50	0.035

表 9 図 14 の中で遺伝子クラスターA～C の遺伝子の DAVID 解析結果

次にそれぞれの group での特徴的な遺伝子群を同定するため、geneset enrichment analysis で解析を行った。それぞれの Group で上位 5 番目までの遺伝子群の名前を表に示す。Group 1 は lymphocyte, immune response, cellular defense, T cell などの腫瘍免疫に関わる遺伝子群によって特徴づけられた。Group 2 は、mitosis に関わるような chromatin binding/modification/assembly/disassembly, spindle formation, microtubule, RNA splicing などの遺伝子群が上位に並んだ。Group 3 は intracellular transport, transferase activity transferring acyl groups, electron carrier activity, early endosome, nuclear hormone receptor binding などの細胞内輸送に代表される細胞内の活動を示す遺伝子群が発現増加していた。Group 1 は前述のようにリンパ球浸潤が多く、Group 2 は少なく、Group 3 は両者の特徴も含有する。表の中にそれらの代表的な HE 染色の病理写真を含めた。

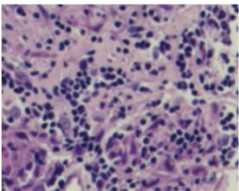
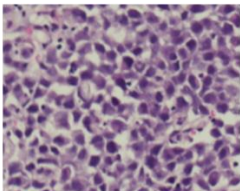
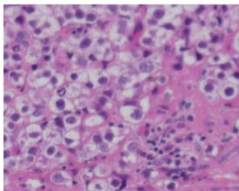
rank	Group 1	Group 2	Group 3
1	POSITIVE_REGULATION_OF_LYMPHOCTYTE_ACTIVATION	CHROMATIN_BINDING	NEGATIVE_REGULATION_OF_TRANSPORT
2	IMMUNE_RESPONSE	SPINDLE_MICROTUBULE	ELECTRON_CARRIER_ACTIVITY
3	CELLULAR_DEFENSE_RESPONSE	MICROTUBULE_CYTOSKELETON_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	EARLY_ENDOSOME
4	POSITIVE_REGULATION_OF_T_CELL_ACTIVATION	MICROTUBULE	TRANSFERASE_ACTIVITY_TRANSFERRING_ACYL_GROUPS
5	POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	RNA_SPLICING	REGULATION_OF_INTRACELLULAR_TRANSPORT
	Immune response	Mitosis	Intracellular activity
代表的な病理写真			

表 10 Germinoma 3 群における発現データの geneset enrichment analysis による解析

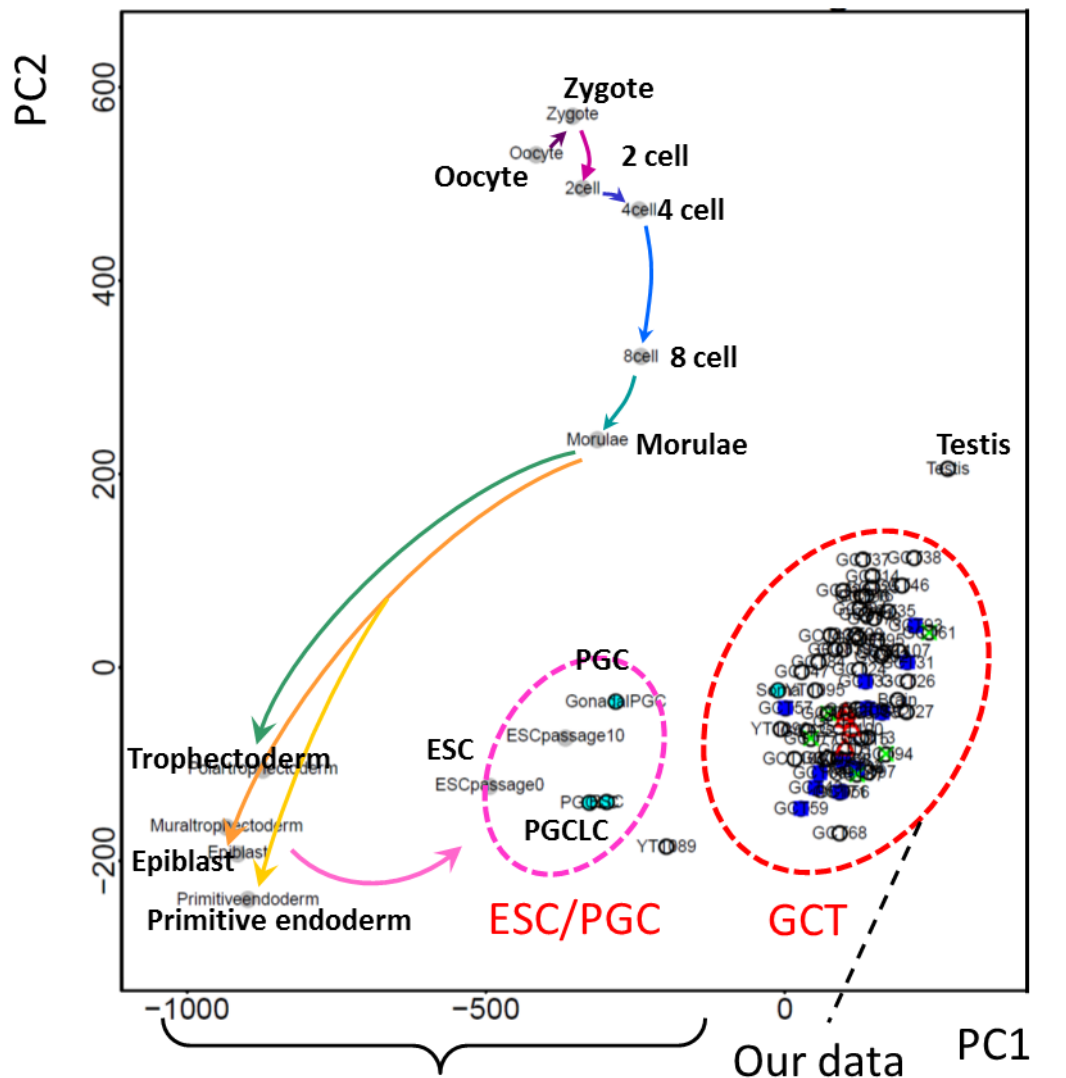
上位 5 つの pathway を記載した。下段にはそれぞれの群での代表的な症例の HE 染色による病理写真を示した。

2.1.3. 発生各段階の細胞との発現プロファイルの比較

RNA シークエンスで得られた胚細胞腫の発現データと、近年報告され public database に登録されたヒト正常発生における受精卵や中絶胎児からの各発達段階の細胞の single-cell RNA-seq のデータを principal component analysis (PCA; 主成分解析)を行うことで胚細胞腫の cell of origin についての考察を行うこととした。

結果を図 18 に示す。PC2 の軸にそって受精卵から胚盤胞を形成する epiblast, primitive endoderm, trophoctoderm までの分化が軸の負の方向に向かって順に並び、epiblast から分化する PGC や、ICM または epiblast から派生して得られると考えられる ESC が PC1 の軸の正の方向に位置していた。ここまでの分布については Guo らの報告にある PCA の図と近似しており⁸⁴、再現性がある結果となった。

胚細胞腫や成人の正常組織(脳・精巣)はさらに PC1 軸の正の方向に位置していた。



Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)
(Accession Code: GSE 60318, 63818)

図 18 Germ cell tumor (GCT) の発現データと正常発生細胞や primordial germ cell (PGC), embryonal stem cell (ESC)の発現データ(Gene Expression Omnibus から取得)との principal component analysis における PC1, PC2 軸での結果

正常発生細胞の発達に従って PC1 の負の方向に進み、PGC/ESC は一転して PC1 の正の軸に沿って進む。胚細胞腫はさらに PC1 の正の軸に沿って位置していた。

PCA は国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野 加藤護先生の協力により作成した。

また胚細胞腫の集簇している部分を拡大し組織型ごとの分布を調べた。図 19 にあるように、それぞれの組織型によって分布が分かれており、特に germinoma では上記の subgroup ごとでも分布が異なっていた。

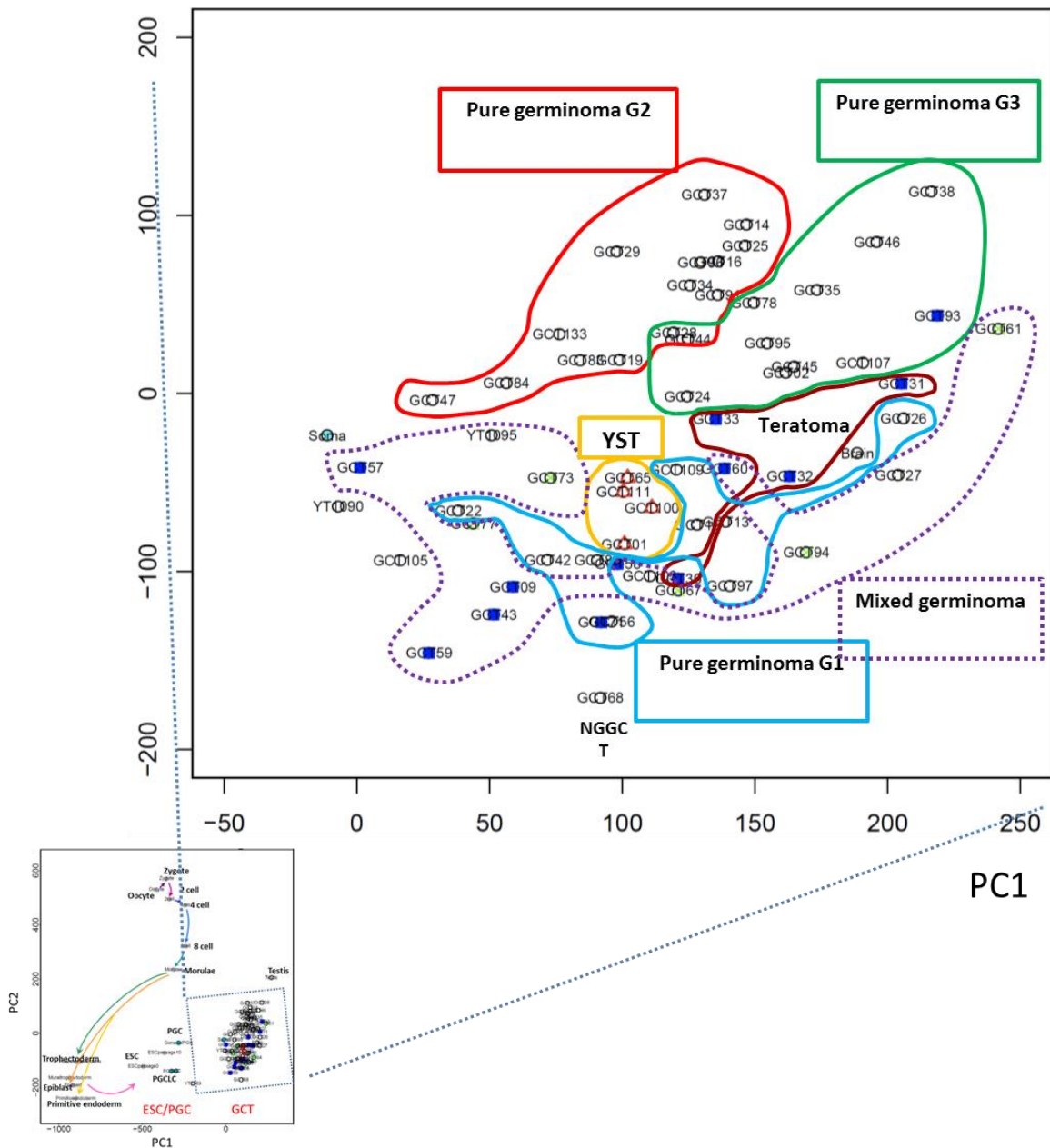


図 19 Germ cell tumor (GCT)と正常発生細胞、embryonal stem cell, primordial germ cell の発現データによる principal component analysis (左)と、胚細胞腫の集簇部分の拡大図(右)
 胚細胞腫は組織型により分布が異なり、germinoma の中でも上記 subgroup により分布を異にしていた。
 PCA は国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野 加藤護先生の協力により作成した。

次に PC1・PC2 の軸と直行する成分である PC3 の軸を設定し、PC2・PC3 の軸で分析を行った。PGC と pure germinoma は負の方向にまとまり、ESC と Non-germinoma や正常組織は正の方向に集簇していた。

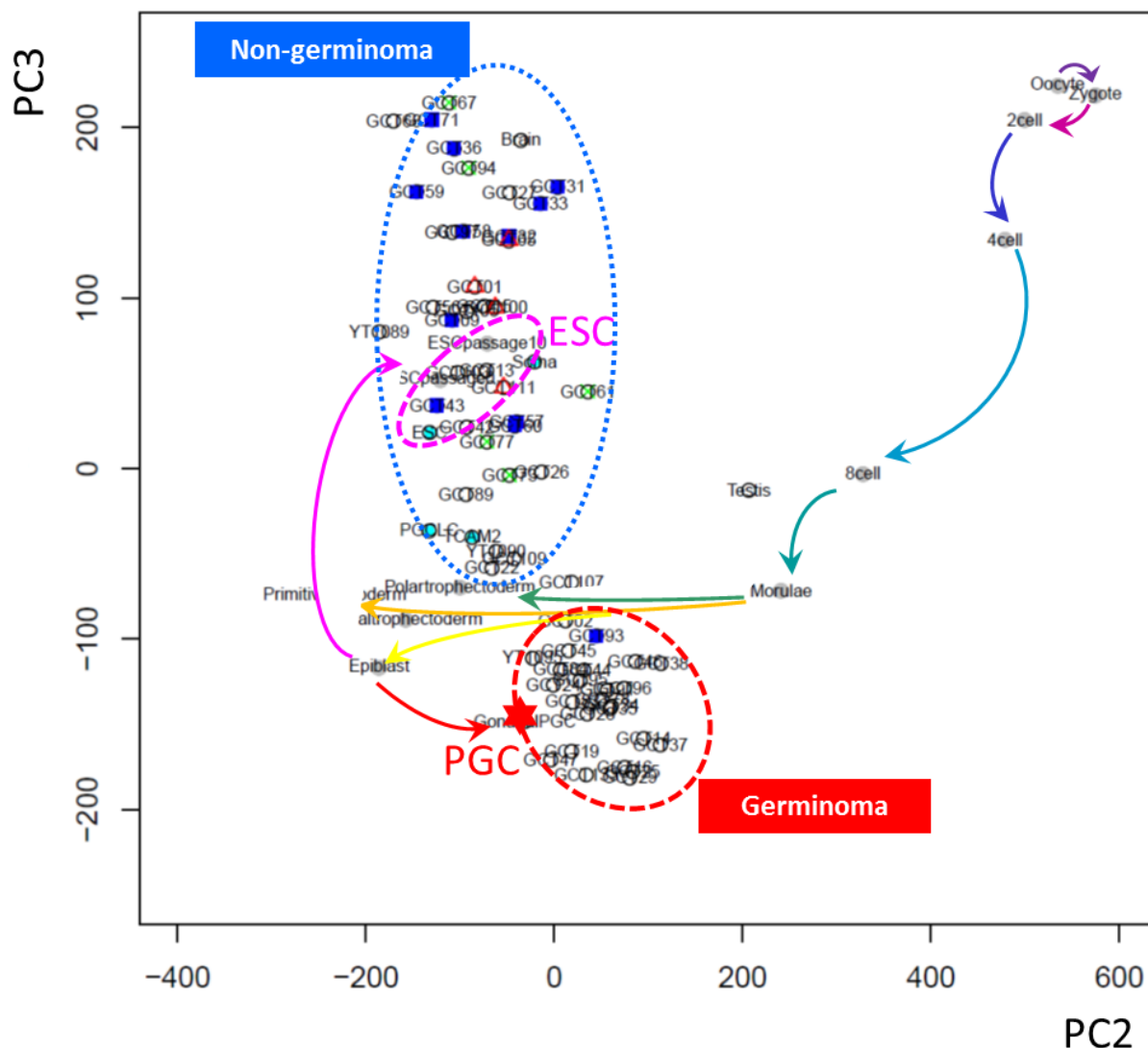


図 20 Germ cell tumor (GCT)と正常発生細胞、embryonal stem cell (ESC), primordial germ cell (PGC)の発現データによる principal component analysis における、PC2, 3 の両軸での解析
 PGC (★)と germinoma、ESC (ピンク色の点線)とそれ以外 (non-germinoma と腫瘍細胞含有率の低い germinoma) が集簇した。
 PCA は国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野 加藤護先生の協力により作成した。

2.2. Fusion Transcript の解析

2.2.1. 全検体における fusion transcript の検索

方法の項で述べたように 50-bp の paired-end read で別々の遺伝子に align するもののうち、「Read 数 \geq 3」「mismatch なしの read \geq 1」「database において 5%以上で検出されていないもの」「in-frame」をフィルターし、artefactと考えられる rearrangement を除外して得られた真の

rearrangement の数は合計 241 を数えた。異なる染色体または同一染色体だが異なる腕をまたがる fusion transcript を interchromosomal、同一染色体の同一の腕に存在するが隣りあわせではない遺伝子の fusion transcript を intrachromosomal、隣り合う遺伝子の間での fusion transcript のうち 5'→3' の方向に転写されているものを readthrough sense-strand、3'→5' の方向に転写されているものを readthrough antisense-strand と定義し、計測した。

結果、interchromosomal fusion transcript は 143、intra chromosomal fusion transcript は 41、readthrough sense-strand は 51、readthrough antisense-strand は 6 を認めた。

最も多くの fusion を認めた症例は GCT58(mature teratoma + germinoma)の症例で 35、一方で 1 つも fusion を認めなかった症例は 14 症例あり、このうち 12 例は germinoma で、他に精巣胚細胞腫(embryonal carcinoma)と teratoma with malignant transformation が 1 例ずつであった。

正常成人精巣のサンプルからは 20 の fusion が検出されたが、全て sense-strand の readthrough であった。

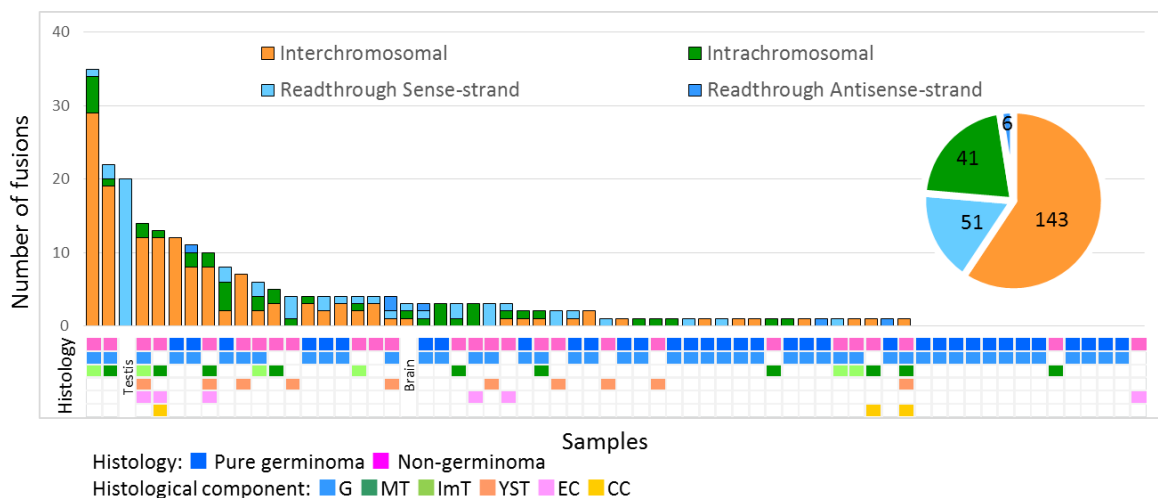


図 21 サンプルごとの fusion の数と fusion の種類の分布

サンプルごとの fusion の数を棒グラフで示す。また fusion のタイプごとに計測し、全体での分布を左の円グラフで示す。組織型は下段の各色の□で示す。

Germinoma と Non-germinoma で分類した場合、全ての rearrangement transcript を対象とした数を比較すると、non-germinoma における rearrangement の方が有意に多かった(平均 25.2 vs 39.6, $p=0.0014$, Wilcoxon's test)。

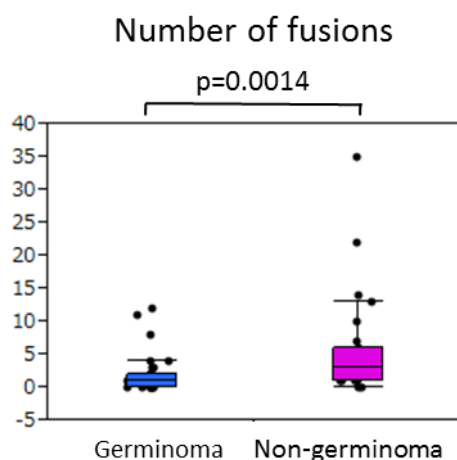


図 22 Germinoma と non-germinoma における fusion の数の比較

Germinoma における fusion の数に比較して non-germinoma の fusion の数は有意に多い(平均 25.2 vs 39.6, $p=0.0014$, Wilcoxon's test)。

次にこれらの多くの fusion の候補の中から、今回 RNA シークエンスの対象にしなかったサンプルへ解析を拡大して validation を行うものを検討した。RNA シークエンスの 64 検体の中で複数の検体において検出された fusion (recurrent fusion) を抽出したところ、以下の 6 つの fusion が候補として考えられた。

Sample	Histology	#read	Gene(5')	Gene(3')	Frame	Type	Validation result
GCT47	Germinoma	4	ARR3 Xq13.1	RAB41 Xq13.1	in_frame	readthrough	正常組織ではほとんどなし
GCT19	Germinoma	8	ARR3 Xq13.1	RAB41 Xq13.1	in_frame	readthrough	
GCT133	Germinoma	8	ARR3 Xq13.1	RAB41 Xq13.1	in_frame	readthrough	
GCT01	Yolk sac tumor	4	ARR3 Xq13.1	RAB41 Xq13.1	in_frame	readthrough	
Testis		4	C11orf70 11q22.1	YAP1 11q13	in_frame	readthrough	Testisの多くで(+)
GCT31	Mature Teratoma	8	C11orf70 11q22.1	YAP1 11q13	in_frame	readthrough	
GCT46	Germinoma	16	C16orf59 16p13.3	CCNF 16p13.3	in_frame	readthrough	Breakpointとexon junctionが1kb離れている
GCT28	Germinoma	6	C16orf59 16p13.3	CCNF 16p13.3	in_frame	readthrough	
GCT61	MT+G	3	CCDC146 7q11.23	RASA4 7q22.1	in_frame	Intrachromosomal	正常検体の多くで(+)
GCT31	Mature Teratoma	5	CCDC146 7q11.23	RASA4 7q22.1	in_frame	Intrachromosomal	
GCT105	Squamous epithelial tumor	3	EF4E1B 5q35.2	TSPAN17 5q35.3	in_frame	readthrough	正常検体の多くで(+)
GCT100	Yolk sac tumor	4	EF4E1B 5q35.2	TSPAN17 5q35.3	in_frame	readthrough	
GCT33	Immature Teratoma	4	NUP205 7q31.32	C7orf73 7q33	in_frame	readthrough	正常検体の多くで(+)
GCT24	Germinoma	3	NUP205 7q31.32	C7orf73 7q33	in_frame	readthrough	

表 11 RNA シークエンスを行った 64 検体の中で複数の検体に見られた recurrent fusion の一覧

これらについて正常組織の RNA (Human Total RNA Master Panel II: 副腎・骨髄・小脳・脳全体・胎児脳・胎児肝・腎・肝・肺・胎盤・前立腺・唾液腺・骨格筋・脾臓・精巣・子宮・大腸・小腸・脊髄、Clontech) から作成した cDNA を用いて、同様の fusion が検出されないかをまず確認した。C16orf59 と CCNF の fusion については、CCNF の遺伝子において breakpoint と exon junction の距離が 1kb 程度離れており、意義のある fusion とは考えにくく、validation の対象から除外した。

その結果、ARR3 と RAB41 の fusion 以外については、正常組織でも多くで fusion が確認され、これ以上の解析を行わないこととした。

ARR3 と RAB41 の fusion はほとんどの正常組織では検出されず、解析の対象とした。

2. 2. 2. ARR3 と RAB41

2 つの遺伝子は Xq13.1 に存在し、その順で 5' 側より並んでいる隣り合う遺伝子である。両者の間は 331bp 離れており、5' から 3' 方向に転写される。

ARR3 は exon 17 個からなり、coding region は exon2~17 上にあつて全長は 1167 bp, 399 個のアミノ酸からなるタンパクをコードする。RAB41 は exon 9 個からなり、coding region は exon 1~9 までで、全長は 669 bp, 223 個のアミノ酸よりなるタンパクをコードする。

2.2.2.1. ARR3-RAB41 fusion transcript

RNA sequence のデータでは 4 症例にこの fusion transcript が指摘された。ARR3 の exon 2~15 と RAB41 の exon 2~8 が癒合する転写産物である。

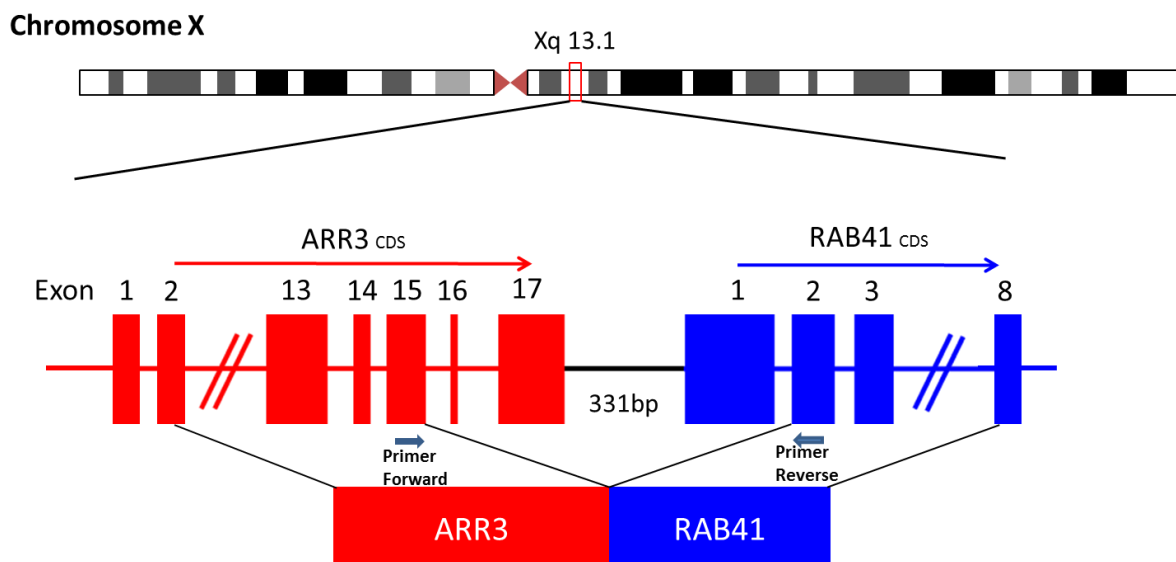


図 23 Chromosome Xq における ARR3, RAB41 の位置と検出された fusion transcript の構造
 2つの遺伝子は Xq13.1 に隣り合って存在し、2つの遺伝子間の距離は 331 bp である。RNA シークエンスによる fusion の検出では ARR3 は exon 17 のうち exon 15 までと、RAB41 の exon 2 からが融合する。Fusion transcript 全長は 1611 bp であり、ARR3 が 1066 bp で RAB41 が 545 bp である。Validation を行うためのプライマーは forward を ARR3 の exon 15 に、reverse を RAB41 の exon 2 に設計した。

胚細胞腫の cDNA にて上記プライマーを用いて PCR を行い、これをクローニングした後に Sanger シークエンスを行うことによって配列の確認を行った。2 種類の PCR プロダクトが確認され、RAB41 exon 2 の先頭の 3 塩基(TAG)が intact のものを FUS 1、3 塩基がないものを FUS 2 とした。両者とも in frame fusion であり、ARR3 と RAB41 のほぼ全長を含むそれぞれ 355aa, 182aa のタンパクをコードすることが予測された。また同一検体の DNA を同じプライマーを用いて PCR を行ったところ、ARR3 の exon 15 から RAB41 の exon 2 までのゲノム領域を増幅することができた。この PCR 産物の塩基配列をシークエンスしたところ、リファレンスと一致し、明らかな DNA レベルでの 2 つの遺伝子間の微小欠失などの再配列は見られなかった。

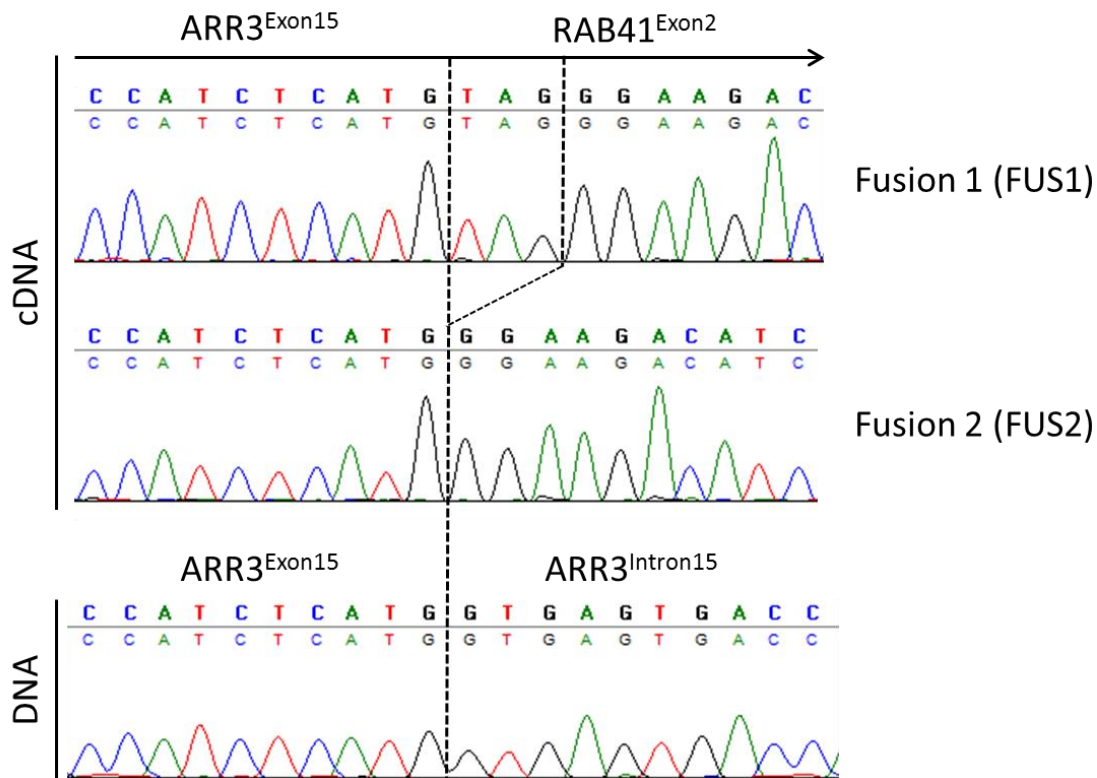


図 24 胚細胞腫の cDNA と DNA における融合部分の塩基配列

cDNA では融合部分の配列について、同一検体から 2 種類が検出された。RAB41 の exon 2 の先頭 3 塩基 (TAG)があるもの (=FUS1)とないもの (=FUS 2)が見られる。また DNA レベルでは明らかな 2 つの遺伝子間の融合は見られなかった。

2.2.2.2. ARR3-RAB41 fusion の他検体での有無の精査

385 例の様々な検体に対して ARR3-RAB41 fusion transcript の有無を探索した。RNA から cDNA を作成し、RT-PCR による product を電気泳動により該当する分子量のバンドが見られるかどうかを確認した。cDNA に対して RT-PCR を行うことにより、fusion がある症例は電気泳動で 139 bp の band が確認された。

385 例の内訳は、中枢神経系胚細胞腫(123 例)、頭蓋外胚細胞腫(64 例)、Glioma (121 例)、頭蓋内転移性腫瘍 (33 例)、GCT cell line(3 例)、中枢性悪性リンパ腫(1 例)、GIST(1 例)、正常検体 (39 例)である。

上記プライマーペアによる PCR 後の電気泳動の代表的な所見を以下に示す。

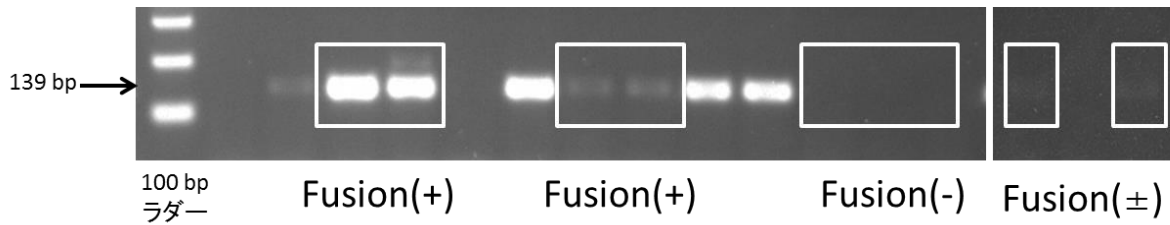


図 25 ARR3-RAB41 fusion についての validation のための電気泳動のゲルの写真

バンドが明確に見えるもの(++), 薄いが存在が確認されるもの(+), 全く見られないもの(-), わずかに見られるもの(±)を示した。

それぞれにおけるバンドの検出の割合のデータは下に示した。

頭蓋内外の胚細胞腫において頻度が高く、40~50%程度に見られる。一方で Glioma や他臓器癌、正常検体では全く見られないわけではないものの、頻度は1~6%程度と極めて低く、また発現の程度も低い傾向にあった。

胚細胞腫の中では pure germinoma やその精巣での counterpart とされる seminoma において60%程度と高頻度であり、特に yolk sac tumor では100%で見られる。その他の腫瘍型(teratoma, choriocarcinoma, embryonal carcinoma)ではほとんど見られない(図26)。

以上から、ARR3-RAB41 は胚細胞腫に特異性が高く、特に germinoma と yolk sac tumor に高頻度に見られる fusion transcript であることがわかる。

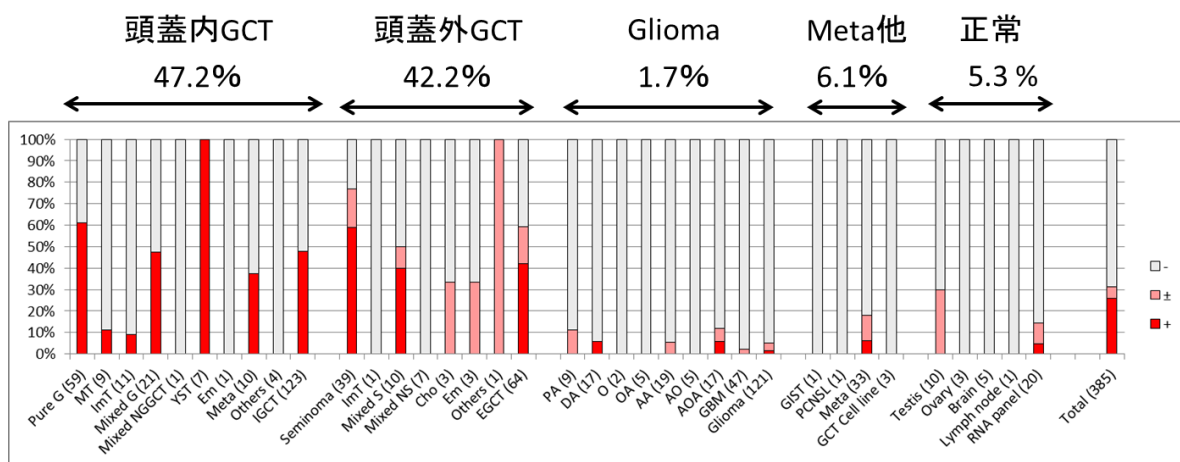


図 26 頭蓋内外 germ cell tumor (GCT)、glioma、他臓器癌の頭蓋内転移、正常組織を含む全 385 検体における ARR3-RAB41 の validation の結果

頭蓋内外胚細胞腫においてはおよそ同じ程度の頻度で fusion が検出された(それぞれ 47.2, 42.2%)。一方で glioma では 1.7%、他臓器癌の頭蓋内転移病変では 6.1%、正常組織では 5.3%と低かった。胚細胞腫の

中では germinoma (60 %)と yolk sac tumor (100 %)で高く、teratoma などの non-germinoma ではほとんど見られなかった。

2.2.2.3. ARR3-RAB41 fusion の機能解析

2.2.2.3.1 ベクターの構築

ARR3-RAB41 fusion transcript coding sequence (CDS)全長を胚細胞腫検体の cDNA より RT-PCR によって増幅し、これをベクターに導入した。ARR3 と RAB41 の接合部は、RAB41 の exon2 の先頭の 3 塩基である TAG が含まれるものと含まれないものの 2 種類の transcript が同定され、両者とも解析の対象とした。それぞれ”FUS1”, “FUS2”と名前を付けた。また ARR3 の CDS については FASMAC (Kanagawa)による人工遺伝子合成サービスにより作成し、RAB41 の CDS は成人正常男性の精巢の RNA より RT-PCR により作成した。PCR 時の変異導入を最大限防ぐために、高い正確性(fidelity)を有する酵素である KOD-Plus-Ver.2 polymerase (TOYOBO, Osaka)を用いて RT-PCR を行った。

ベクターとしては、プラスミドベクターとして p3XFLAG-CMV-14 (Sigma-Aldrich)、レンチウイルスベクターとして pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (SBI, Mountain View, CA)を用いた。

これらは全て FLAG tag が CDS の 3'側に付く recombinant vector として使用した。

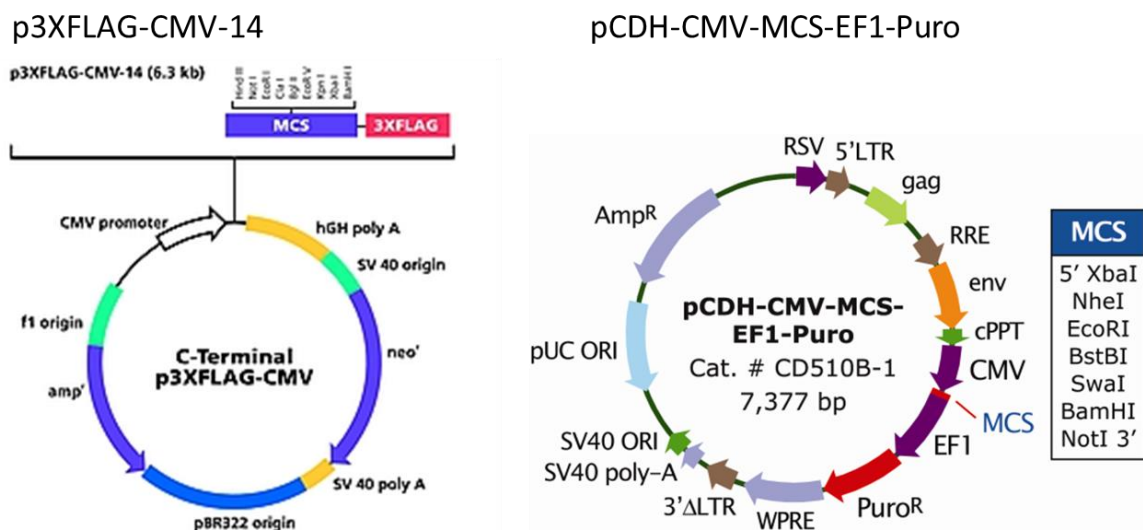


図 27 実験に使用した 2 種類のベクターのマップ

左：プラスミドベクター p3XFLAG-CMV-14 (Sigma-Aldrich のホームページより) 右：レンチウイルスベク

ター pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (SBI のホームページより) Multiple cloning site (MCS)を用いて目的とする coding sequence を導入した。

2.2.2.3.2. 遊走能、浸潤能、増殖能についての実験

方法の項で述べたように、T98G cell line に empty vector (p3XFLAG-CMV-14)または fusion transcript を導入した vector を T98G cell line に transfection し、G418 による選択を行って単一クローンを作成し、それぞれ 2 つのクローンでの解析を行った。

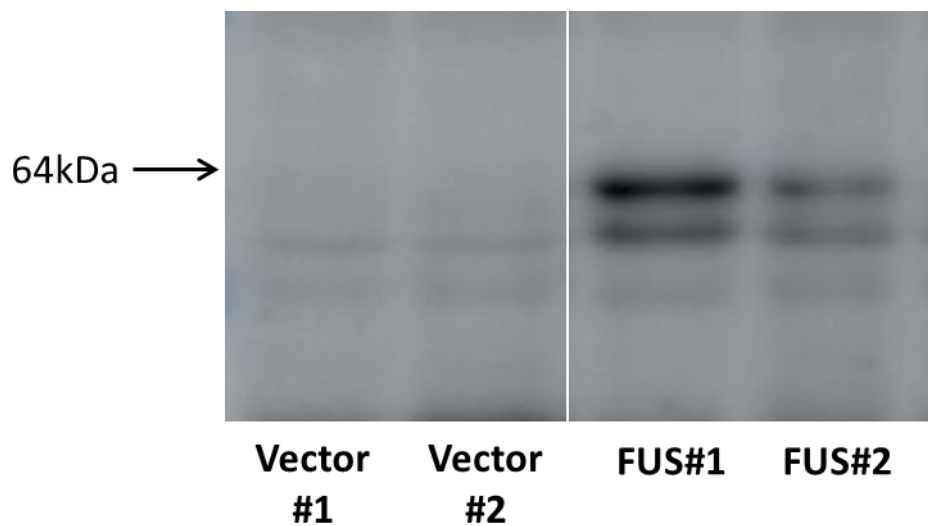


図 28 Western blot による目的の遺伝子の発現の確認

FLAG 抗体により検出。Fusion transcript が導入されている細胞株は 64kDa のタンパク質を発現する(→)。

また ARR3 に対する 2 種類の siRNA と control の siRNA を用いることで fusion transcript を knock down してそれぞれの機能に変化が生じるかを確認した。

図 29 に示すように、増殖能は fusion の存在により低下することが示された。これは siRNA をトランスフェクションすることにより一部回復することも示された (2 種類のクローンにおいてどちらも $p=0.02$)。

Control	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
siRNA: ARR#1	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
ARR#2	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

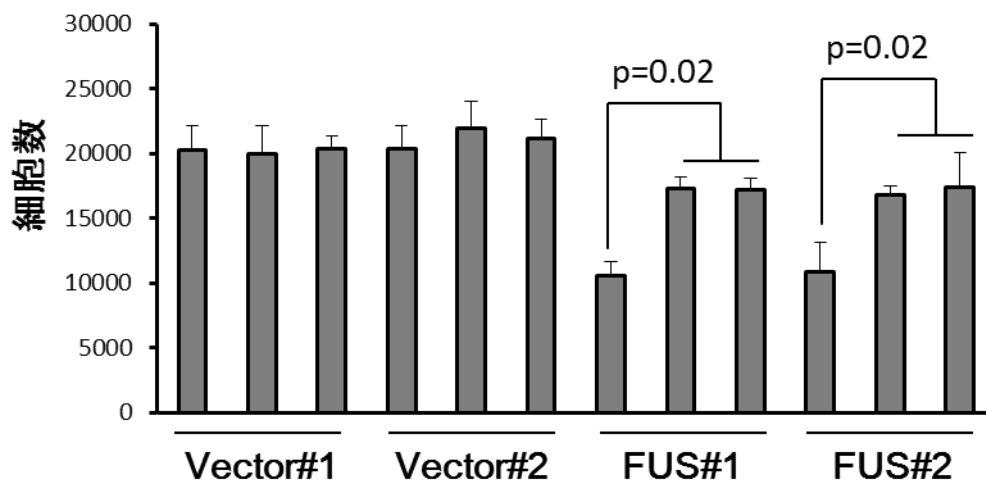


図 29 T98G cell line における fusion による増殖能への影響

Empty vector よりも fusion の導入された vector により transfect された T98G cell にて増殖能が低下し、また siRNA にて fusion を knockdown することにより増殖能が一部回復する(p=0.02, 0.02)。

国立がん研究センター研究所難治進行がん研究分野 富山新太先生の指導の下で行った。

一方で遊走能は T98G cell line では乏しいが、fusion の存在により著明に亢進し、siRNA によりその機能が低下することが示された (2 つのクローン共に p=0.02)。

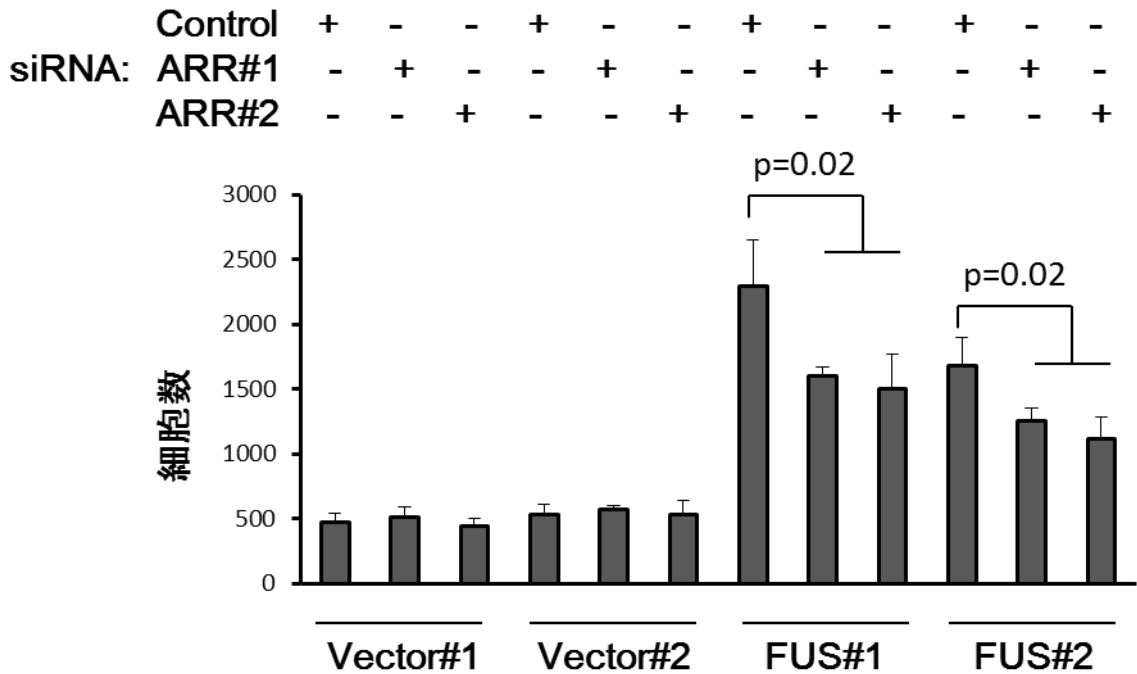


図 30 T98G cell line における fusion による遊走能への影響

Empty vector よりも fusion の導入された vector により transfect された T98G cell にて遊走能が亢進し、また siRNA にて fusion を knockdown することにより遊走能が一部低下する(p=0.02, 0.02)。国立がん研究センター研究所難治進行がん研究分野 富山新太先生の指導の下で行った。

また浸潤能も T98G cell line では乏しい一方、fusion の存在により著明に亢進、siRNA にて低下することが示された(2つのクローンで、p=0.003, 0.002)。

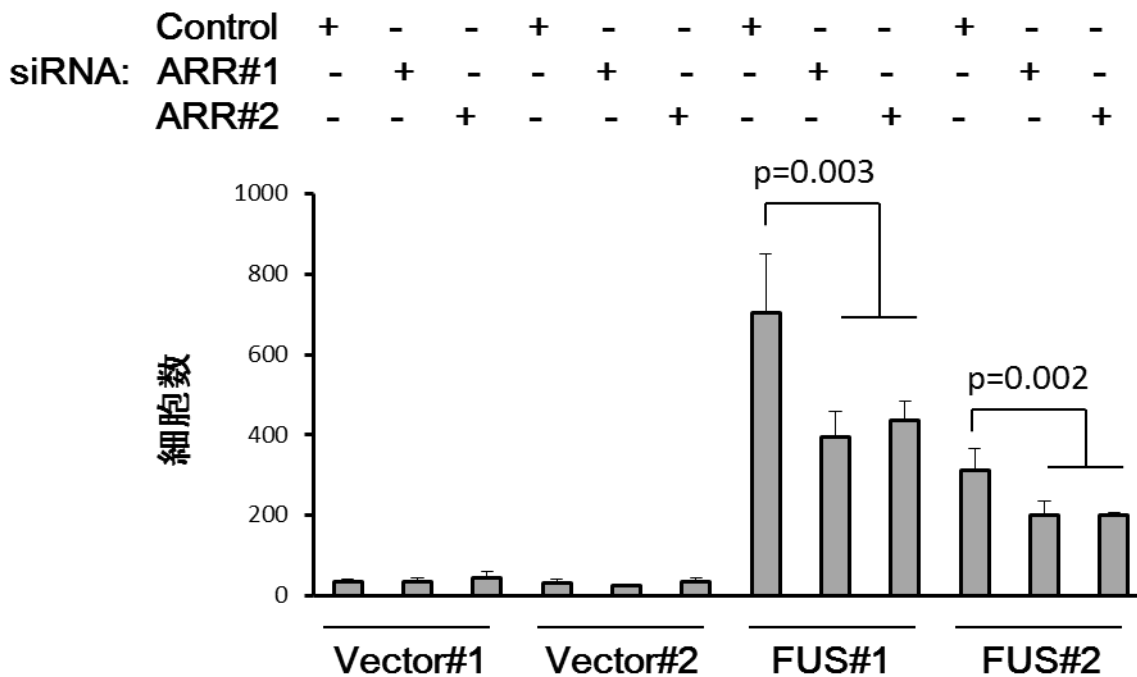


図 31 T98G cell line における fusion による遊走能への影響

Empty vector よりも fusion の導入された vector により transfect された T98G cell にて浸潤能が亢進し、また siRNA にて fusion を knockdown することにより浸潤能が一部低下する(p=0.003, 0.002)。
国立がん研究センター研究所難治進行がん研究分野 富山新太先生の指導の下で行った。

2.2.2.3.3. Colony formation assay

NIH3T3 cell line にレンチウイルスベクター (pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro) とパッケージベクターにより作成したリコンビナントレンチウイルスを感染させることにより、ARR3, RAB41, FUS1, FUS2 を発現する NIH3T3 を作成し、また方法の項で述べたように HRAS G12V を発現する NIH3T3 を positive control として実験を行った。

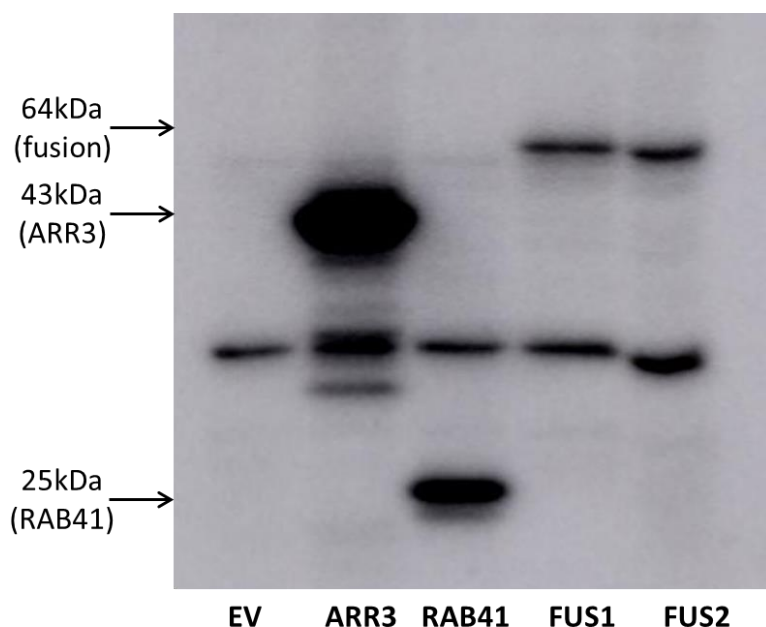


図 32 Western blot による目的の遺伝子の発現の確認

FLAG 抗体により、細胞で強制発現されている各種遺伝子または融合遺伝子のタンパクを検出。ARR3 は 43kDa, RAB41 は 25kDa, ARR3-RAB41 fusion は 64kDa のタンパク質を発現する(→)。

以下は細胞をゲルの中に撒いて 9 日目の写真であり、empty vector (negative control) では colony が全くなく、HRAS G12V (positive control) では顕著なコロニーが形成しているのがわかる。他の NIH3T3 でも明らかなコロニーは観察できないが、RAB41 や FUS1 にて小さなコロニーが形成されていた。

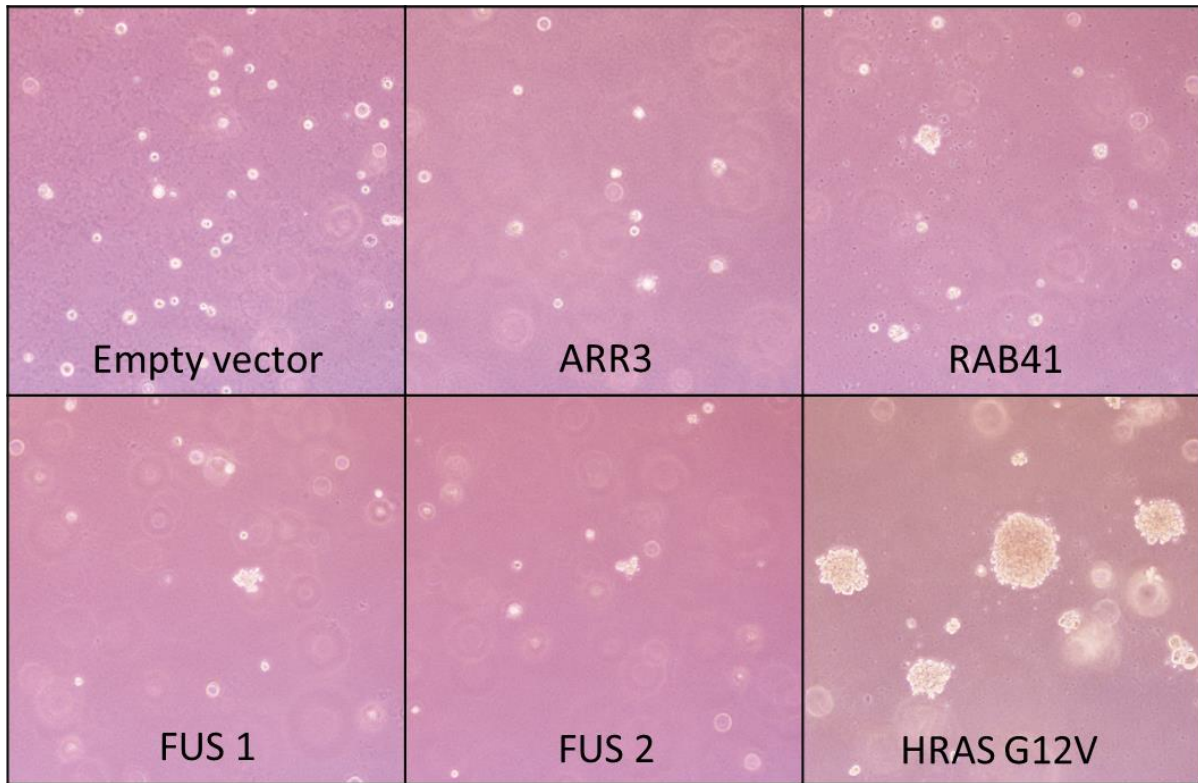


図 33 NIH3T3 細胞による colony formation assay の結果

Empty vector を negative control、HRAS G12V 導入株を positive control として使用し、他の ARR3, RAB41, FUS1, 2 でのコロニー形成能を調べた。どれも明瞭なコロニーの形成は見られなかったが、RAB41 と FUS1 導入株はわずかにコロニーの形成が見られた。

3. Whole genome sequence

RNA シークエンスでは探索できない種類の構造異常を調べるために whole genome sequence を行った。4 つの検体(2 つの germinoma と 2 つの YST)における構造異常の数を計算した。

全体で 198 の構造異常が指摘され、複数検体に存在する構造異常はなく、全て単一の検体で存在した。種類別としては、translocation 40, tandem duplication 52, inversion 47, deletion 59 であった。

Germinoma (5, 10 個) に比べて YST (78, 105 個) は顕著に構造異常が多かった。

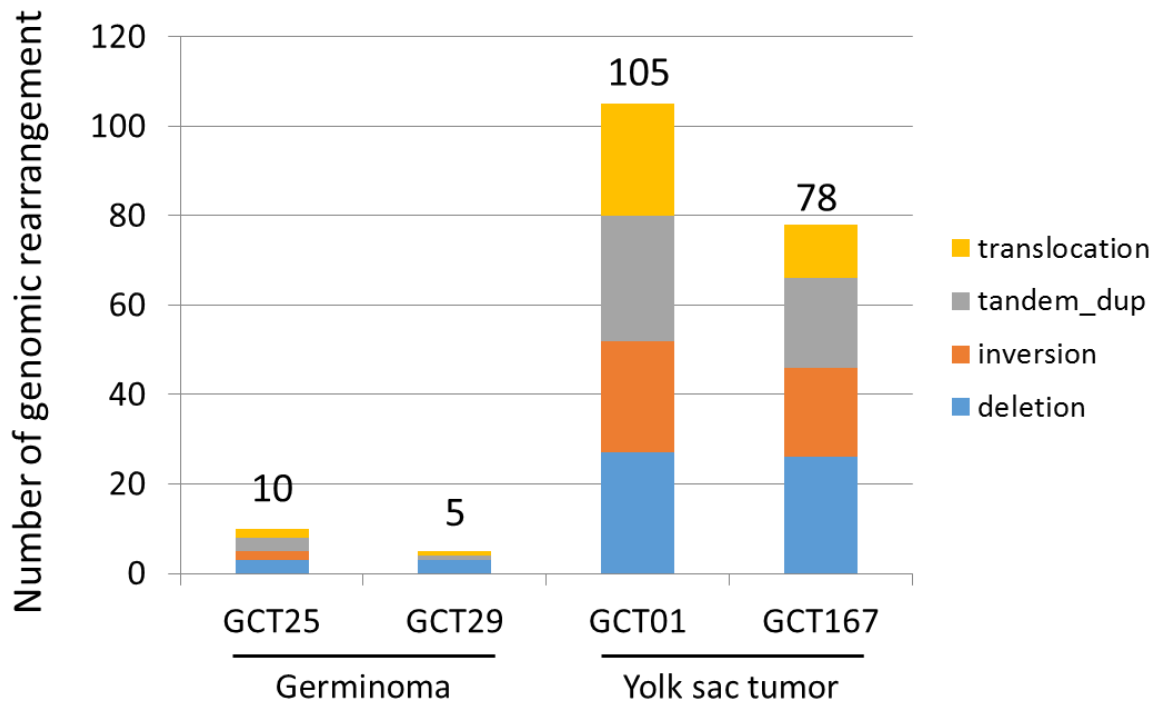


図 34 4つの検体における whole genome sequencing による構造異常の数
Germinoma は構造異常が少なく(5~10)、yolk sac tumor はそれが顕著に多い(78~105)。

また Circos plot により構造異常の位置関係を示した。Circos plot では YST の 2 症例 (GCT01, 167) において全ゲノムにわたって多くの構造異常が存在していることがわかる。特に GCT01 の 1q では 1q21~44 の 95Mb の位置に 62 の構造異常が集積していた。この症例では過去に当研究室において array CGH によるコピー数解析が行なわれており、1q の全体にわたって gain が存在していることがわかっている。さらに構造異常が集積する 1q21-44 の部位においてはコピー数の変化が顕著に見られる。1q 全体の gain が生じた後に多くの構造異常が生じ、コピー数 neutral~1 copy gain の間をとることになったものと推測される。

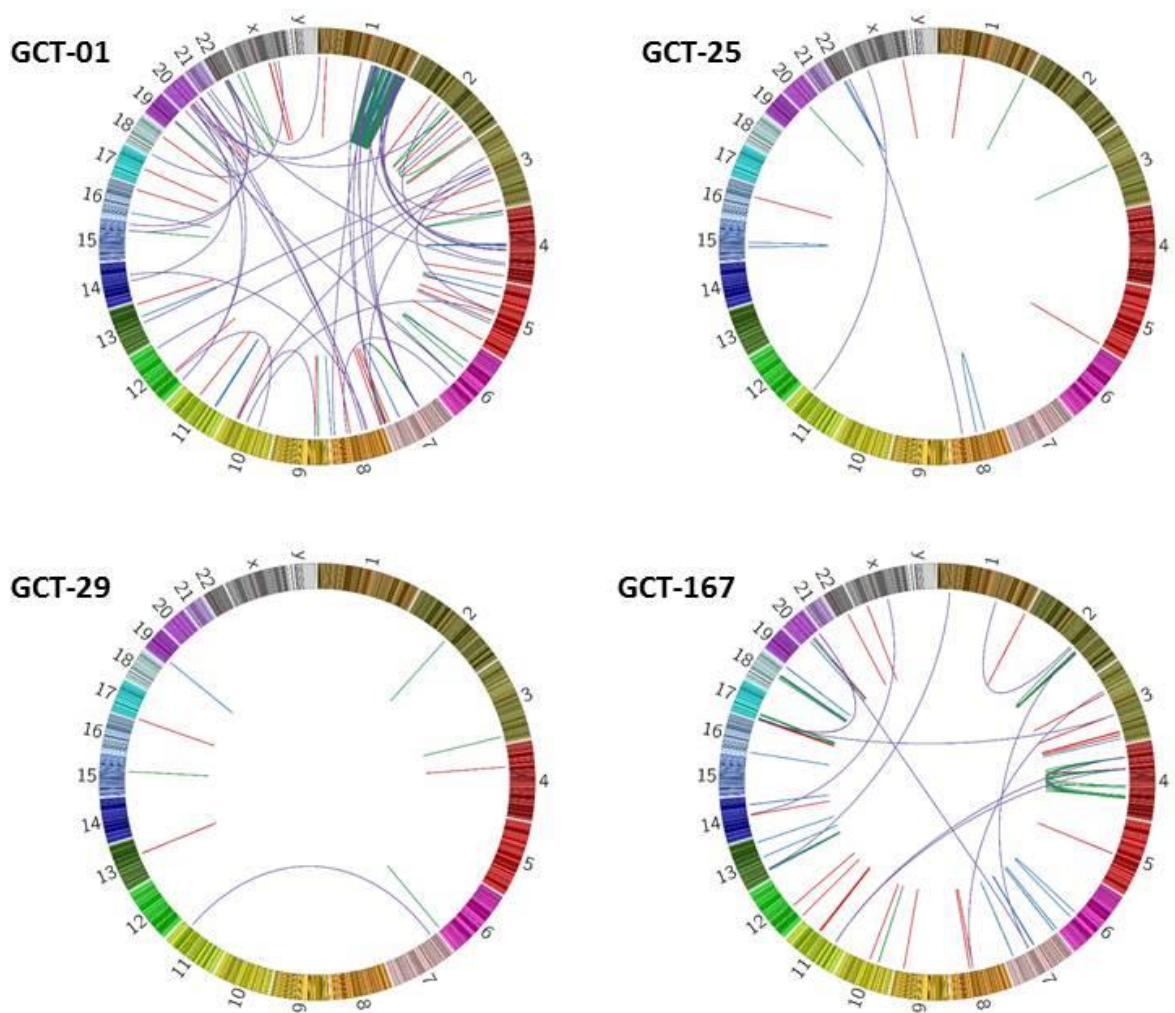


図 35 Genomic rearrangement の Circos plot.

Germinoma (GCT 25, 29)に比べて yolk sac tumor (GCT 01, 167)では構造異常が顕著に多かった。特に GCT01 の検体では 1q の 95Mb: 1q21~44 に 62 の構造異常が集簇していた。

構造異常の種類 赤:deletion, 緑:inversion, 青:tandem duplication, 紫:translocation

Circos plot は国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野 十時泰先生の協力により作成した。

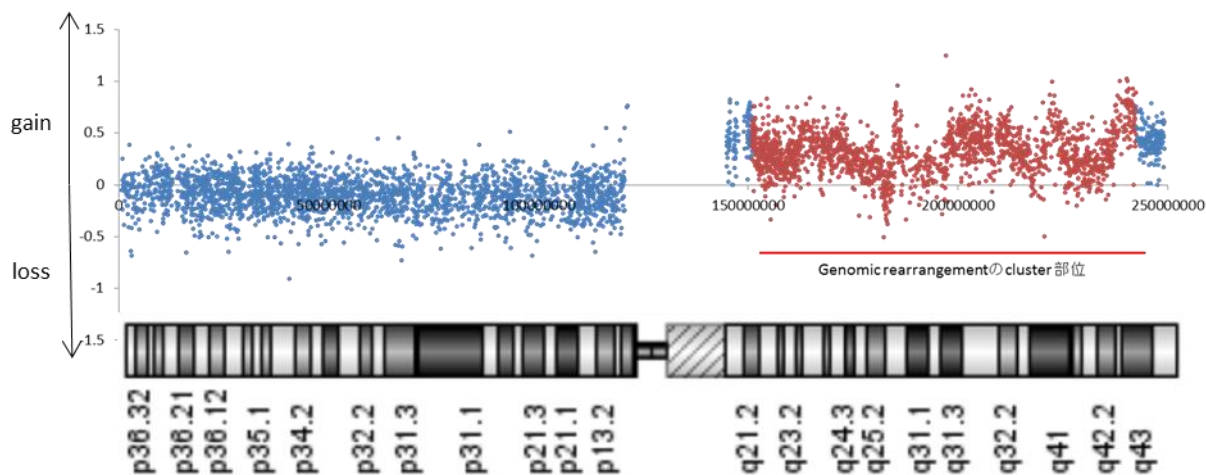


図 36 GCT01 における array CGH による 1 番染色体のコピー数解析

1q 全体の gain が見られ、特に構造異常が集積する部位(1q21-44)はコピー数の変化が顕著である。この症例では他に 20q, X の gain が検出された。

Array CGH のデータは国立がん研究センター研究所脳腫瘍連携研究分野 福島慎太郎先生の解析したものを使用した。

198 の構造異常の中で in-frame の fusion を形成する構造異常は以下の 7 つが挙げられた。

fusion	sample	class	#read	chromosome1	gene1	chromosome2	gene2
TRAPPC9-EIF2C2	GCT01	tandem_dup	13	chr8	TRAPPC9	chr8	EIF2C2
PPP1R12B-C1orf21	GCT01	tandem_dup	12	chr1	C1orf21	chr1	PPP1R12B
GAB4-MAPK1	GCT25	tandem_dup	28	chr22	GAB4	chr22	MAPK1
SMARCA4-C19orf38	GCT29	tandem_dup	8	chr19	C19orf38	chr19	SMARCA4
LYPD6B-STK39	GCT167	inversion	28	chr2	LYPD6B	chr2	STK39
ELF2-CYP2U1	GCT167	inversion	15	chr4	CYP2U1	chr4	ELF2
ARHGAP15-NOS1AP	GCT167	translocation	12	chr2	ARHGAP15	chr1	NOS1AP

表 12 Whole genome sequencing による in-frame fusion の候補

これらについては RNA シークエンスの結果と一致するものは認めなかったが、今後 RT-PCR によって多数検体での検討候補になり得る。今後の検証が必要である。

VI 考察

この研究では頭蓋内胚細胞腫瘍ゲノム解析コンソーシアムによって集められた世界で稀な多数の中樞神経系胚細胞腫瘍に対して、今後の新たな診断や治療につながるための病態解明とゲノム解析を主眼として行ってきた。大きく3つの解析領域において様々な解析結果が生み出されたが、1つずつの領域について考察を加える。

1. HCG 発現解析の結果と臨床的意義

中樞神経系胚細胞腫瘍において血清中／髄液中の hCG 高値は choriocarcinoma と germinoma with STGC の腫瘍マーカーとして使われてきた。SIOP CNS GCT II クリニカルトライアルでは血清中／髄液中の hCG または AFP の上昇は、生検による組織病理学的診断なしでも NGGCT であることの診断に十分であると推奨している (https://www.skion.nl/workspace/uploads/2_siop_cns_gct_ii_final_version_2_15062011_unterschrift_hoppenheit.pdf)。一方でわが国では脳神経外科が中心となって診断、治療を行い、多くの施設では手術による腫瘍検体の採取と病理組織学的診断が最初に行われることが多い。欧米での上記の診断、治療スタンスの背景にある理論としては pure germinoma は hCG を産生しないという考えがある。しかし germinoma で hCG が産生されるといういくつかの evidence も見られる^{77,85-88}。

この問題を解決するために中樞神経系胚細胞腫瘍の様々な組織型において hCG β mRNA の値を求めた。胚細胞腫瘍は全能性を持ち生殖巣に発達する germ cells (PGC) から発生するという仮説が現在主流となっている²⁰。中樞神経系胚細胞腫瘍は発達の段階において異所的に遊走した PGC から生じたものと考えられている^{18,89}。ヒトの PGC は入手困難であったためヒトの正常な成人脳と精巣を発現解析における対照の代用として用いた。今回の研究に

よってほとんどの胚細胞腫の症例では正常脳(93.3%)や正常成人精巣(85.6%)よりも hCG β の高発現が見られた。従って hCG β の発現は choriocarcinoma や germinoma with STGC に限ったものではなく、量的な差はあるものの基本的には全ての組織型の腫瘍に見られるものであることが示された

この研究では、hCG β mRNA 発現はほとんど全ての pure germinoma において正常成人脳や精巣よりも高値が見られた(図 6)。このことは germinoma 細胞が hCG タンパクを産生する少なくとも potential があることを示している。さらに、全ての germinoma における hCG β 発現値の分布が二峰性を示さなかったという事実は、hCG 産生能力によって germinoma を 2 群に分けるという考え方を支持しないものである。むしろこのことは hCG を血清中／髄液中に産生する pure germinoma の存在を報告している多くの過去の研究を支持している。片上らは picogram レベルの感度で血清中／髄液中の hCG を測定する超高感度アッセイ法(EIA 法)を開発し、全ての pure germinoma の症例において髄液中の hCG の上昇があることを検出した^{77,85}。Ikura らは中枢神経系胚細胞腫の剖検 6 例を調べた結果、choriocarcinoma 成分を持たない germinoma 4 例全てにおいて免疫染色上 hCG に陽性に染色される細胞が認められたと報告した⁸⁷。Pure germinoma における hCG の産生は、pure germinoma の嚢胞液において極めて高い hCG β の濃度上昇を報告した Tamaki らによる症例報告でも示唆されている⁸⁸。

hCG β の発現は teratoma, yolk sac tumors and embryonal carcinoma など組織病理学的にはこのような HCG 産生細胞を有さない NGGCTs でも見られた。Teratoma は 3 胚葉成分から生じる組織を有するため腫瘍組織全体の中には hCG 産生細胞が含まれていても理解できる²⁰。Embryonal carcinoma に関しては幾つかの報告が hCG の産生や¹³ または hCG 免疫染色陽性所見^{13,90} を報告しているが、hCG 産生細胞が embryonal carcinoma に存在して

いるかどうかは現時点で不明である。

全ての組織型での胚細胞腫におけるユビキタスな hCG の発現は、部分的には腫瘍の heterogeneity によって説明可能である。本解析のシリーズでは 22 例 (22.9 %) が混合型の組織型であり、その中でも 9 例が 3 つ以上の組織型を有していた。この所見は胚細胞腫の組織的 diversity を反映している。

胚細胞腫は時間的にも heterogeneous であることが知られている。胚細胞腫は時に初発時とは異なる組織型として再発することがあり、この現象は放射線や化学療法とは無関係に時間経過とともに組織型にダイナミックな変化を生じているかもしれないことを示唆している^{40,91}。

Seminoma は頭蓋内の germinoma の精巣における counterpart と考えられているが、これもまた転移すると形態を変化させることが知られている⁹²。このような腫瘍の identity に影響を与えるダイナミズムを考慮すると、全ての胚細胞腫が hCG 産生細胞を内部に有していても何ら驚きはない。Seminoma では血清中の hCG 値が腫瘍内の STGC 量を反映するという報告もある⁹³。従って中枢神経系胚細胞腫でも hCG β 発現の様々な値はそのような hCG 産生細胞の存在を示している可能性がある。組織型に関係なく NGGCT における hCG β の発現が見られることは胚細胞腫の中心的な性質を反映している可能性があるが、まだ証明はされていない。

Pure germinoma は cell of origin と考えられている PGC に病理学的に似ている細胞から構成されている。NGGCT は胎児性組織 (embryonal carcinoma と teratoma) と胎児外組織 (choriocarcinoma と YST) に分類される⁸⁹。胎児期に cytotrophoblast や syncytiotrophoblast で hCG が盛んに産生されることを考慮すると choriocarcinoma で hCG β が極めて高い発現を示すことは容易に理解できるが、胚細胞腫の中でも最も未分化と考えられている germinoma でも上記の様に hCG β が高発現しているということは興味深い所見である。Surani らは最近、

ヒト ESC から由来して作成した PGC 様細胞(PGC-like cells: PGCLC)の RNA シークエンスを行った²³。Public database で入手できる彼らのデータによれば、hCG の発現はこのような PGCLC ではほとんど 0 に近いことを示している。PGC が germinoma の cell of origin であるという仮説を考慮すると、germinoma 細胞そのものが hCG を産生するのではなく、germinoma 組織の中に組織学的には同定していないが hCG を産生する non-germinomatous cell が共存しているのではということが考えられる。しかし germinoma 細胞が hCG を産生する syncytiotrophoblastic 細胞に分化する potential を有している可能性は残る。

hCG β の発現は多分化能を有する幹細胞や germ cell のマーカーと考えられてきた。しかし近年 hCG β の発現は大腸がんや卵巣がんなどの多くの胚細胞腫以外の腫瘍にも見られることが報告されており、hCG β の発現と予後不良の相関も報告されており、hCG β がこれらの悪性腫瘍において重要な役割を担っていることを示唆している^{94,95}。

hCG タンパクには 4 つの isoform があることが知られており、そのすべてが異なる機能を有している。Regular hCG と hyperglycosylated hCG (hCG-H) は胎盤のそれぞれ villous syncytiotrophoblast 細胞と cytotrophoblast 細胞によって、free β subunit は様々な non-trophoblastic tumors によって、下垂体性 hCG は下垂体によってそれぞれ産生される⁹⁶。Regular hCG は黄体からのプロゲステロンの産生促進、血管新生や免疫反応の抑制、胎児臓器の成長などの内分泌機能を有している。hCG-H は内分泌機能よりも autocrine の機能を持ち、妊娠時の胎盤着床を促進し、choriocarcinoma や他の胚細胞腫の成長や浸潤を促す働きがあることが知られる hCG β もまた autocrine の機能があり、悪性腫瘍細胞の成長や浸潤、転移を促進する働きがある。これらの別々の isoform の産生のメカニズムは翻訳後の修飾に基づいており、glycosylation などが知られる⁹⁷。

これらのことから choriocarcinoma は regular hCG を、germinoma 中の STGC は hCG-H

を産生するようと思われるが、精巣胚細胞腫の免疫染色による研究において hCG β は seminoma の中では少数にのみ陽性となり、全ての isoform (hCG, hCG-H, hCG β) が non-seminoma の胚細胞腫に陽性になったという報告がある⁹⁸。本研究の mRNA 発現による解析ではそれぞれの isoform を区別することはできず、血液や髄液中の hCG isoform の独立した解析を行うことは興味深いものと思われる。

胚細胞腫の全ての検体を対象とした際の hCG β の発現と血液・髄液中の total hCG の値の相関は弱かったが、pure germinoma や YST、embryonal carcinoma などの単一組織型の検体のみを対象とすると相関が強くなった。これは RNA レベルでの hCG β の発現はそのタンパクの産生量を反映していることを示唆している。

ほとんどすべての胚細胞腫は縦隔、精巣、卵巣などの正中構造物にできる⁷。それは中枢神経系胚細胞腫でも同じことである⁹⁹。神経下垂体部や松果体などの中心構造物外に生じる pure germinoma は中心構造物に生じるものよりも hCG β の発現が高かった。この結果は 103 例の pure germinoma の解析で血清中の hCG 濃度が高い症例は基底核に生じていることが多いとする Ogino らの報告を支持しているが、彼らの報告は交絡因子としての腫瘍の大きさについては考慮されていない¹⁰⁰。典型的な場所以外に生じる pure germinoma において hCG β の mRNA 発現が高いことは腫瘍発生部位によって発生機序が異なる可能性を示唆していると言える。

Germinoma において hCG 産生が予後を規定するかどうかについては議論がある。今回の解析では、局所放射線療法を受けた 3 例を除いた症例での再発の有無による hCG β 発現の比較では再発のあった症例においてより高い発現が見られたが、有意差はなかった ($p=0.16$)。mRNA 発現が再発に与える影響については今回の研究ではどちらともとれる結果のみであり、すなわち hCG 産生能の有無によって germinoma を予後良好群、予後中間

群に分けることが適切かどうかについての確かな結論には至っていない¹³。Germinoma の予後としては化学療法の有無とは別に適切な放射線療法を受ければ一般的に良いと言える。再発は多くはなく、そのために再発の有無の比較研究を行うための症例は限られたものにならざるを得ない。予後に与える hCG 発現の意義を調べるにはより多くの症例でより長い観察期間で行われることが必要と言える。

本研究には、中枢神経系胚細胞腫の宿命ともいべき幾つかの制限がある。胚細胞腫は病理組織的に heterogeneous であることが多く、またリンパ球や肉芽組織などの非腫瘍組織と混ざり合っていることも多い。そのような要素は発現解析において腫瘍細胞本来の発現を見る妨げになる。マイクロダイセクションはサンプリングの正確性を高めることが期待されるが、そのような手技は mRNA 発現解析にとって適切でないかもしれない。腫瘍組織は生検という方法で採取されていることしばしばであり、小さな生検組織が腫瘍組織全体を反映しているとは限らない。さらに髄液の採取は症例によって脳室からと腰椎穿刺からと異なり、これも mRNA 発現との関係を解析する際の交絡因子になりうる。前述のように発現部位によって mRNA 発現は様々な isoform のタンパクに翻訳されうる。これらの制限因子は本研究の結果に影響を与えている可能性は否定できないが、こういった要素を差し引いても、本研究はこの希少な脳腫瘍の全ての組織型を含む 93 症例という過去最大の腫瘍コホートを対象としたものであり、同様な研究の中でもっとも信頼性の高いものと言うことができる。

結論として、hCG β mRNA は全ての組織型の胚細胞腫で発現していることが示され、すなわち全ての胚細胞腫は hCG β を発現する能力があることが示唆された。腫瘍組織での mRNA 発現の上昇がどのように血液中・髄液中の hCG の検出につながるのかは現時点では不明である。Germinoma において hCG 発現が予後に与える影響はより大きなコホートでさらに解析を行う必要がある。血液中・髄液中での hCG の上昇が choriocarcinoma の診断に

において価値があるということについては不変である。しかしながら本研究の結果は、中枢神経系胚細胞腫の術前診断において hCG のデータを解釈する際には注意を要することを示唆している。ジェネティック・エピゲネティック・組織病理的なデータの統合によりこの極めて解釈の難しい腫瘍のよりよい理解につながることを期待する。

2. トランスクリプトーム解析

2.1. トランスクリプトーム解析にもとづく中枢神経系胚細胞腫の病態と起源に関する考察

中枢神経系胚細胞腫における発現解析は組織型を絞って僅かな症例数で行われた報告はあったものの⁶¹、多数検体における解析は行われてこなかった。

今回 59 症例の RNA シークエンスによる発現解析の結果、germinoma と NGGCT は明確に発現のパターンが異なることが、unsupervised hierarchical clustering によって示された。これは病理組織が大きく異なることや、現在投稿中である胚細胞腫瘍ゲノム解析コンソーシアム内でのメチル化解析にて両者が明瞭に異なるメチル化パターンを示すことから、予想された結果であると言える。

NGGCT の中では YST が明確な 1 つのクラスターを形成した。YST は比較的単一の組織型で発生することが多く、その特徴を反映していると考えられる。Heatmap 上で YST において高発現している遺伝子を DAVID で解析したものと、全遺伝子の発現データから YST に特徴的な pathway を GSEA にて解析したものの両者において、extracellular matrix に関係する遺伝子の高発現が YST の特徴であることが判明した。細胞外組織を盛んに産生するような性質を持つものと考えられるが、病態的の解釈や今後の治療への反映という観点からはより

考察が必要になる。一方で、精巣胚細胞腫において seminoma (n=9)と YST (n=18)のマイクロアレイによる発現解析の報告において seminoma に 12 つの遺伝子が有意に発現の亢進が見られたと報告されているが、このうち 2 つの遺伝子 (*APOA1*: apolipoprotein A-1, *PDZK1*: PDZ domain containing 1)¹⁰¹ が、今回の本解析の MSigDB や DAVID による解析にて抽出された遺伝子にも見られたことは、発生部位の違いがあっても組織型が同一であれば発現も似通うことを意味している。臨床的観点から考えると、組織型に特異的な遺伝子発現を同定することは今後胚細胞腫の鑑別診断に有用になり得る可能性がある。また予後との関連をさらに探索していく必要がある。

Teratoma と正常脳、精巣が heatmap 上で近い位置関係にあることが示された。これは teratoma が特に mature teratoma の場合、比較的正常に近い構造を保ちつつ分化した腫瘍であり、脳や精巣などの分化した組織に近い発現パターンを示すことを反映していると考えられる。

Pure germinoma に特徴的な遺伝子としては、内分泌に関する遺伝子群、homeobox 遺伝子群、発達に関わる遺伝子群などが同定され、特に PGC を特徴とする遺伝子である *TCLIA*, *DAZL*, *MAEL*, *UTF1*, *PIWIL2* や、減数分裂のマーカである *SYCE1* の高発現が見られた。*TCLIA* は seminoma でも上昇することが報告されている¹⁰¹。PGC などの高度に未分化な細胞由来であることを支持する結果となっていると考えられる。また 7 例の germinoma での発現解析の報告⁶¹ で亢進しているとされた遺伝子のうち、本解析のデータと共通するものは *DAZL*, *MAEL*, *UTF1*, *TCLIA*, *TCLIB*, *BNC1*, *GIP*, *SPATA22*, *STK31* であり、このうち前 4 つの遺伝子は上記の PGC を特徴とする遺伝子であり、データの再現性があることを示している。

また heatmap にて germinoma group2, 3 を特徴とする遺伝子、すなわち germinoma の特

徴を成す遺伝子 142 個のうち、6 個は *TSPY*(testis specific Y-linked)ファミリーであることも特筆すべき所見であり、これは germinoma が生殖細胞へ運命づけられた PGC を cell of origin として持つことを指示するもう 1 つの根拠と考えられる。

Germinoma が発現プロファイルにより 3 群に分けられることは過去に報告がなく、今回が初めての知見である。それぞれの群にて高発現している遺伝子は特徴があり、Group 1 は腫瘍免疫に関わるもの、Group 2 は有糸分裂に関わるもの、Group 3 は細胞内小器官の働きに関わるものにより特徴づけられた。臨床的背景においては Group 1 において全症例が病理切片において腫瘍細胞が少なく周囲にリンパ球浸潤の多い、いわゆる”2-cell pattern”を示す症例であった。Gene Ontology や GSEA での結果でも免疫反応に関わる遺伝子の高発現が見られていることより、一致する所見である。年齢分布は Group 2 と 3 はほぼ同様であり 10 代での発症が多い結果であったが、Group 1 は 20 代以降に多く、リンパ球浸潤が多いことと並んで大きな特徴と言える。性別や腫瘍発生部位の違いは有意な所見は見られなかった。

予後の違いに関しては、他臓器癌も含め一般的にリンパ球浸潤の多い症例は予後が比較的良いことが知られている¹⁰²。中枢神経系胚細胞腫においてリンパ球浸潤の程度と予後の相関についての報告はまだないが、seminoma ではリンパ球浸潤の程度が少ないものは予後が悪い傾向があるとする報告があり¹⁰³、今回の中枢神経系胚細胞腫でも同様な所見を示していると言える。すなわち強いリンパ球浸潤を特徴とする Group 1 が最も良い予後を示した。予後解析における解析は p 値が 0.18 と有意差があるレベルではなく、これは germinoma が全体的に再発の少ない腫瘍であることも原因の 1 つと考えられる。今後さらに症例を集積して解析を行う意味があると思われる。発現解析の解釈における注意点としては、Group 1 の症例は特にリンパ球の浸潤が強い症例が多く、特徴的な発現パターンは腫瘍浸潤リンパ球の発現を強く反映したものになっており、germinoma の発現を示しているものでは必ずしもな

いということがある。

Germinoma は現在、生検術後に放射線・化学療法を画一的に行っており、予後の違う群が同定されれば治療をさらに適切化できる可能性を示唆している。

PCA において、胎児発生段階における正常細胞の位置関係は PC2 の軸に沿って並んだ。ESC や PGC は ICM や epiblast からそれぞれ分化するものと考えられているが、これらは PC1 の軸に沿っての位置関係を示した。PCA は今回使用した public data を提供した Guo らのグループの論文内でも行われており、ここまでは同様な所見を呈している⁸⁴。このことは本解析の解析の正しさを支持するもの(external validation)と考えられる。そして胚細胞腫は頭蓋内・精巣原発に関わらず、PC1 の正方向にクラスターしており、頭蓋内・精巣に関わらず、胚細胞腫は概ね似たような発現パターン持つと考えられる。またこの位置関係からは、胚細胞腫は ESC や PGC がより分化したものということを示唆していると言える。

PC3 の軸において、pure germinoma が gonadal PGC と、non-germinoma や正常組織(脳・精巣)が ESC とクラスターしたことは興味深い。PC2/3 の軸での解釈では、pure germinoma が PGC に、non-germinoma が ESC に近い発現プロファイルを示している。Pure germinoma の精巣における counterpart である seminoma が PGC 由来であり、non-seminoma が PGC が re-programming された多能性幹細胞(ESC)由来であるとの「PGC 仮説」を想起させる結果である。ただし non-germinoma の cell of origin が ESC などの多能性幹細胞だとしても、これが PGC 由来なのかまたはより発生初期の ICM や epiblast 由来なのかは発現プロファイルからは推定できない。NGGCT や non-seminoma の発生母地として考えられている embryonal carcinoma が ESC と同様な発現プロファイルを示すことは報告されており^{61,104}、NGGCT が ESC と同様な所見を示すことは容易に理解できるものと考えられる。

2.2. 胚細胞腫特異的に発現される新たな融合遺伝子(ARR3-RAB41 fusion)の意義

2.2.1 融合遺伝子の構造について

融合遺伝子は次世代シーケンサーが用いられる時代になる前から特に血液腫瘍や肉腫において特定されてきた。これらのうち多くはそれぞれの腫瘍亜型に極めて特異的であり、しばしば診断のマーカーまたは治療の標的として捉えられてきた¹⁰⁵。次世代シーケンサーの普及により他の固形がんにおいても融合遺伝子の発見は加速し、その多くが腫瘍の病態に強く関与することが解明された。さらには *ALK*, *BRAF*, *RELA*, *RET*, *NOTCH* などの遺伝子を含む融合遺伝子が診断マーカー、予後予測因子または治療標的としての意義があることが明らかになった。これまで同定されてきた融合遺伝子は染色体の転座に起因するものが多かった^{5,106}。しかし RNA シーケンスにより染色体レベルの構造異常を伴わない遺伝子の融合も同定されるようになってきている¹⁰⁷。

今回同定された ARR3-RAB41 fusion transcript は DNA の Sanger sequence や whole genome sequence、array comparative genomic hybridization による copy number analysis などにて 2 つの遺伝子の間に deletion が存在するなどの DNA レベルでの構造異常が検出されなかったことより、fusion は転写レベルで発生している可能性が最も疑われる。

ARR3 と RAB41 の 2 つの遺伝子は Xq13.1 に隣り合って並んで配列しており、同じ方向に転写され、2 つの遺伝子の間の距離は 331 bp である。このような隣り合う遺伝子の間において、DNA レベルでの変化はなく転写産物のレベルで融合するものは、下等生物では高頻度で見られる現象だが¹⁰⁸、最近になってヒトでも知られるようになってきた¹⁰⁹。これらは“transcription-induced gene fusion (TIGF)”、特に“cis-TIGF”と呼ばれる。対照的に離れた遺伝子間での fusion は“trans-TIGF”として区別される¹¹⁰。別の呼称もあり、“read-through”, “noncanonical chimera”¹⁰⁹, “transcription-induced chimera”¹¹¹, “cis-splicing of adjacent

genes (cis-SAGe)”とも記載される¹。

このような隣り合う遺伝子同士が転写産物のレベルで融合することが正常でも見られるという事は、例えば今回の RNA シークエンスにおいても正常成人精巣のシークエンスの結果として 20 種類のこのような cis-TIGF または readthrough が同定されたことから確認されている。実際にヒトのゲノムデータの分析では、200 以上の TIGF が検出され少なくともその半分はヒトの組織で発現しているとする報告¹¹²や、隣り合う2つの遺伝子のうち少なくとも4~5%はキメラタンパクに翻訳される1つの RNA に転写されうるとする報告¹¹³がある。

今回の study における精巣の例のように、TIGF の中には正常組織に見られるものが多いと考えられ、腫瘍において高発現をしているものは少ないと考えられている¹¹⁴。これまでに腫瘍特異的な TIGF としては、前立腺癌における SLC45A3-ELK4 が知られている^{115,116}。この TIGF の生成メカニズムとして、2つの遺伝子の間にある insulator 配列への CTCF の結合の有無が調節しており、アンドロゲンホルモンの存在下でこの CTCF の結合が弱められるということが報告されている。またこの TIGF は細胞に増殖能を与え、TIGF を knock-down すると G1 arrest を生じることが示されている。また転移を生じた前立腺癌はこの TIGF を高度に発現していることも示されている¹¹⁶。

2.2.2. ARR3 および RAB41 の機能について

ARR3 はアレスチンと呼ばれるタンパクファミリーの一つであり、ヒトでは網膜と松果体に高発現していることが知られている。アレスチンには4つのサブタイプがあり、ARR3 はアレスチン4と分類され、錐体アレスチンまたは X アレスチンの別称を持つ¹¹⁷。一般的にアレスチンタンパクは、G タンパク共役受容体 (G-protein-coupled receptor: GPCR) のシグナル伝達を細胞内において抑制する働きがあるとされる。具体的には GPCR の細胞質側 (C 末端) に結

合することで、C 末端へ G タンパク質が結合するのを防ぎ、受容体から細胞内へシグナルが伝わるのを防ぐ。同時に GPCR の細胞質への内在化機構(エンドサイトーシス)も有し、この際にアレスチンの C 末端を AP2、クラスリンタンパクが認識するが、この C 末端の配列が今回の融合によって欠落しているのが特徴である。他にも、細胞膜受容体との相互作用や様々な種類の可溶性シグナルタンパクとの相互作用が知られ、細胞内タンパクの足場として働き、特定のシグナル伝達を亢進させる働きがあることも知られている¹¹⁷⁻¹²⁰。

RAB41 は精巢に高発現する。RAB には 60 以上の isoform が存在し、Ras ファミリーの 1 つである^{121,122}。RAB タンパクは低分子量 G タンパク質であり、細胞内の膜タンパク質や分泌タンパク質の輸送において中心的な役割を担い、エキソサイトーシス/エンドサイトーシスに必須の役割を有する。その結果としてシグナル伝達や細胞増殖・分化を制御する¹²³。RAB41 は RAB VI サブファミリーに属する。RAB41 の働きとしても細胞内のゴルジ体の構築や小胞体からゴルジ体への輸送や細胞増殖に関わると報告されている。ヒトの悪性腫瘍においてその発現レベルが変化しているという報告が徐々に増加している^{ENREF_122}。今回発見された融合遺伝子において欠落している配列部分は guanosine triphosphate (GTP) 結合部位の 1 つ目の部位であり、GTP 結合の活性型と guanosine diphosphate (GDP) 結合の不活性型のスイッチに影響している可能性が考えられる。

2.2.3. 機能解析の結果についての解釈

ARR3-RAB41 融合遺伝子の機能については、現在までの解析において、細胞の遊走能と浸潤能を亢進させ、一方で増殖能を抑制する働きがあることがわかった。一方で悪性腫瘍の特性である足場非依存性増殖能に関しては明確なデータは得られなかった。

Germinoma は PGC 由来であると考えられていることは前述のとおりである。発生初期には

PGC は epiblast 後端に出現し、一旦 yolk sac の中に遊走した後、腸間膜の間を遊走して両側の生殖隆起に到達すると考えられている。ARR3-RAB41 fusion が in vitro の実験において細胞の遊走や浸潤を亢進させることがわかり、発生初期のこのダイナミックな細胞の動きに関わっている可能性も考えられる。

この融合遺伝子の存在と他の既知の遺伝子変異(序文参照)などとの相関は見られなかった。またこの fusion は胚細胞腫、特に germinoma と YST にほぼ特異的ではあったが、glioma や正常組織(精巣、胸腺、大腸・小腸)などにも少数ながら見られた。また NIH3T3 において fusion を強制発現した場合における soft-agar colony formation assay にてコロニー形成があまり認められなかったことから、この fusion transcript が発現していることだけで悪性形質に転化するには不十分であり、様々な他の遺伝子上の要素や他の因子(ホルモンなどの影響など)が病態発生に必要であることが考えられる。

本解析にて同定された、胚細胞腫に極めて特異性の高い ARR3-RAB41 fusion が、前立腺癌で同定され臨床的な価値も報告されている TIGF と同様、今後の解析により診断的、予後予測的価値が見出される可能性があり、探索を続ける必要がある。

3. Whole genome sequence

Germinoma と YST それぞれ 2 例ずつの解析ではあるが、circos plot と棒グラフで示されているように、germinoma に比べて YST では顕著に genomic rearrangement が多く見られる。これは RNA シークエンスにおける fusion の数において、germinoma にくらべ non-germinoma が有意に多くを有している($p=0.014$, 図 23)ことと合致する結果である。

当研究室の福島らによる中枢神経系胚細胞腫のメチル化解析の報告(投稿中、序文参照)では、germinoma は全ゲノムレベルでの極端な低メチル化を特徴とし、non-germinoma は他

の腫瘍や正常組織と同程度のメチル化レベルを有することが示されている。この観点から考えると、germinoma は低メチル化と過去に報告されている RAS/MAPK 経路の遺伝子変異が病態の主体を成しているが、non-germinoma は遺伝子変異の他にゲノム構造変化が大きな原因になっている可能性が強く疑われる。今回の少数の WGS においても多数の構造異常の候補が検出されているが、この少数例の中では recurrent なものは検出されなかった。今後より多くの症例での解析や、YST 以外の NGGCT における WGS による解析により、他の小児脳腫瘍をはじめとする多くの悪性腫瘍で主因となっているゲノム構造異常を特定することが課題であり、WGS のデータのさらなる解析により胚細胞腫の病態の解明につながる可能性がある。

VII 結論

中枢神経系胚細胞腫において、ホルモンの1つである hCG は臨床における意義が大きく、診断と治療の強度を決める重要な因子である。この研究における hCG mRNA 発現解析により、ほとんど全ての胚細胞腫において hCG が発現していること、また germinoma においては発現の有無によって2型に分類されず予後との相関がなかったことが判明した。今後の治療分類における hCG の役割を見直す必要性を強く示唆した。

中枢神経系胚細胞腫において、多数の臨床検体に対して transcriptome と whole genome の網羅的解析を行った研究はこれが世界で初めてである。これまでに当研究室で行われてきたメチル化解析から推測されているように、germinoma は PGC と似た発現パターンを示し、本研究の結果は cell of origin が PGC であることのもう1つの傍証になると考えられる。一方で non-germinoma はむしろ ESC の発現パターンに近い結果となり、必ずしも胚細胞腫全体が PGC 由来ではない可能性も示唆している。

Germinoma は発現パターンにより3群に分かれることが示され、これらは予後に差があることが示唆された。更に多くの症例での検証が必要だが、将来的に治療内容を適切に分ける基準の1つとなる可能性を示している。

胚細胞腫に高頻度に見られ、特に germinoma と YST に特異性が高い fusion transcript の存在が示された。ARR3-RAB41 fusion は細胞に遊走能、浸潤能を与えることが示され、発生初期のダイナミックな細胞運動に寄与、さらには中枢神経系胚細胞腫の機序として考えられている PGC の異所性の遊走と関連している可能性がある。融合遺伝子は DNA レベルではなく転写レベルで形成されている可能性が高く、TIGF の1つと考えられる。TIGF の意義については過去に機能解析などで精査された報告は希少であり、この報告が今後、これまであまり注目されてこなかった TIGF の働きに注目が集まる契機になる可能性がある。ま

た DNA レベルでの融合遺伝子が診断マーカーや治療標的になってきたように、TIGF の 1 つである ARR3-RAB41 fusion が新しいバイオマーカーや治療標的になり得るとも考えられる。

WGS では少数例の解析ではあるが、germinoma よりも non-germinoma の 1 つである YST の方が圧倒的に多くの構造異常を有することが示された。特に YST の 1 例では 1q に chromothripsis を疑わせるような高頻度の構造異常が集積している部位が認められた。現時点で胚細胞腫に特徴的な特定の構造異常は同定できていないが、他の小児脳腫瘍では構造異常が driver になっていることが報告されており、今後検証を続けることで新たな治療標的を同定することにつなげたい。

これまで中枢神経系胚細胞腫のゲノム解析は小児脳腫瘍を含む他の腫瘍に比べて大きく遅れており、病態については未知の領域が多かった。今回の一連の研究により germinoma を含む GCT の病態解明が進んだと言える。この研究では GCT に特徴的な hCG を含む全ての遺伝子の網羅的な発現と、RNA と DNA レベルでの構造異常を明らかにした。近日明らかにされる予定の遺伝子変異解析とメチル化解析の結果と併せて GCT の全体像が明確になると考えられ、根本的な治療開発につながる可能性がある。

VIII 謝辞

本研究に関しまして多大なるご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学講座 齊藤延人教授に深く感謝申し上げます。研究の推進に関しまして多くのご指導をいただきました東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学講座 武笠晃丈講師に深く感謝申し上げます。また研究のテーマ、実験計画、実験内容など総合的にご指導いただきました国立がん研究センター研究所脳腫瘍連携研究分野 市村幸一先生に深く感謝申し上げます。国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科の成田善孝先生、国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野の柴田龍弘先生先生、十時泰先生、濱奈津子先生、足立美保子先生、バイオインフォマティクス部門の加藤護先生、エルザワハリアスマ先生、難治進行がん研究分野の堺隆一先生、富山新太先生、脳腫瘍連携研究分野の福島慎太郎先生、埼玉医科大学国際医療センター脳脊髄腫瘍科の松谷雅生先生、西川亮先生には多大なご指導をいただきました。頭蓋内胚細胞腫瘍ゲノム解析コンソーシアムのメンバーの皆様には貴重な凍結検体のご提供をいただき感謝申し上げます。

この研究は文部科学省の Project for Development of Innovative Research on Cancer Therapeutics (P-Direct)による研究資金により行われました。

IX 研究期間中の出版論文

Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Narita Y, Ichimura K.

Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry-A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas.

Brain Pathol. 2015 May;25(3):256-65.

Takami H, Fukushima S, Fukuoka K, Suzuki T, Yanagisawa T, Matsushita Y, Nakamura T, Arita H, Mukasa A, Saito N, Kanamori M, Kumabe T, Tominaga T, Kobayashi K, Nagane M, Iuchi T, Tamura K, Maehara T, Sugiyama K, Nakada M, Kanemura Y, Nonaka M, Yokogami K, Takeshima H, Narita Y, Shibui S, Nakazato Y, Nishikawa R, Ichimura K, Matsutani M on behalf of the Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium (the iGCT Consortium)

Human Chorionic Gonadotropin is Expressed Virtually in All Intracranial Germ Cell Tumors.

J Neurooncol. 2015 Aug;124(1):23-32.

Ichimura K, Fukushima S, Totoki Y, Matsushita Y, Otsuka A, Tomiyama A, Niwa T,

Takami H, Nakamura T, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Mishima K, Nakazato Y, Hosoda F, Narita Y, Shibui S, Yoshida A, Mukasa A, Saito N, Kumabe T, Kanamori M, Tominaga T, Kobayashi K, Shimizu S, Nagane M, Iuchi T, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Tamura K, Maehara T, Sugiyama K, Nakada M, Sakai K, Kanemura Y, Nonaka M, Yokogami K, Takeshima H, Kawahara N, Takayama T, Yao M, Kato M, Nakamura H, Hama N, Sakai R, Ushijima T, Matsutani M, Shibata T, Nishikawa R. Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium

Recurrent neomorphic mutations of MTOR in central nervous system and testicular germ cell tumors may be targeted for therapy

submitted

Fukushima S, Yamashita S, Kobayashi H, **Takami H**, Fukuoka K, Nakamura T, Yamasaki K, Matsushita Y, Nakamura H, Totoki Y, Kato M, Suzuki T, Mishima K, Yanagisawa T, Mukasa A, Saito N, Kanamori M, Kumabe T, Tominaga T, Nagane M, Iuchi T, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Tamura K, Sakai K, Sugiyama K, Nakada M, Yokogami K, Takeshima H, Kanemura Y, Matsuda M, Matsumura A, Kurozumi K, Ueki K, Nonaka M, Asai A, Kawahara N, Hirose Y, Takayama T, Nakazato Y, Narita Y, Shibata T, Matsutani M, Ushijima T, Nishikawa R, Ichimura K on behalf of the Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium (iGCT Consortium).

Genome-wide methylation profiles in primary intracranial germ cell tumors indicate primordial germ cell origin of germinoma

submitted

Nakamura T, Tateishi K, Niwa T, Matsushita Y, Tamura K, Kinoshita M, Tanaka K, Fukushima S, **Takami H**, Arita H, Kubo A, Shuto T, Ohno M, Miyakita Y, Kocialkowski S, Sasayama T, Hashimoto N, Maehara T, Shibui S, Ushijima T, Kawahara N, Narita Y, Ichimura K.

Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas.

Neuropathol Appl Neurobiol. 2015 [Epub ahead of print]

RNA シークエンスと whole genome シークエンスに用いた 63 症例の胚細胞腫瘍の臨床データ一覧

Supplementary Table: Clinical data of 63 GCTs and 2 normal testes for RNA sequence and whole genome sequence										
SampleID	Diagnosis	Components	Location	Primary(P) or Recurrent(R)	Age	Sex	PFS (m)	OS (m)	Follow-up (m)	Recurrence (yes=1, no=0)
GCT01	Yolk sac tumor		P	R	24	M	108.4	114.4	112.9	0
GCT02	Germinoma		ND	ND	17	M	ND	ND	ND	0
GCT04	Mixed germ cell tumor	YST, Em, ImT, G	P	P	10	M	129.6	129.6	129.6	1
GCT09	Mixed germ cell tumor	ImT, G	N	P	5	F	99.6	99.6	99.6	0
GCT13	Germinoma		N,P	P	8	M	15.5	15.5	15.5	1
GCT14	Germinoma		N,P	P	25	M	41.3	81.5	81.5	0
GCT15	Germinoma		N	P	25	M	10.5	10.5	10.5	1
GCT16	Germinoma		P	P	10	M	71.9	71.9	71.9	1
GCT19	Germinoma		B	P	40	M	18.9	60.8	60.8	0
GCT22	Germinoma		N	P	26	M	50.2	50.2	50.2	0
GCT24	Germinoma		B	P	7	M	49.9	49.9	49.9	0
GCT25	Germinoma		N	P	34	F	43.1	43.1	43.1	0
GCT26	Germinoma		P	P	38	M	41.8	41.8	41.8	0
GCT27	Germinoma		P	P	15	M	75.0	75.0	75.0	1
GCT28	Germinoma		V	R	22	M	74.9	99.0	99.0	0
GCT29	Germinoma		Temporal	P	16	M	30.1	30.1	30.1	0
GCT31	mature teratoma		Temporal	P	25	F	25.4	25.4	25.4	0
GCT32	immature teratoma		P	P	16	M	5.3	12.1	12.1	0
GCT33	immature teratoma		P	P	10	M	28.5	28.5	28.5	0
GCT34	Germinoma		N,P	P	45	M	27.7	27.7	27.7	0
GCT35	Germinoma		N,P,V	P	15	M	25.9	25.9	25.9	1
GCT36	immature teratoma		P	P	11	M	22.9	22.9	22.9	0
GCT37	Germinoma		V	R	19	M	30.6	52.0	52.0	0
GCT38	Germinoma		Medulla	R	37	M	231.4	252.3	252.3	0
GCT42	Embryonal carcinoma		P	P	14	M	17.6	17.6	17.6	0
GCT43	Mixed germ cell tumor	G, ImT, Ch, Em	B	P	10	M	16.3	16.3	16.3	0
GCT44	Germinoma		N	P	8	F	11.0	11.0	11.0	0
GCT45	Germinoma		V	R	20	M	95.2	97.4	97.4	0
GCT46	Germinoma		P	P	14	M	151.3	151.3	151.3	0
GCT47	Germinoma		P	P	14	M	146.9	146.9	146.9	1
GCT56	Germinoma		P	P	21	M	66.3	66.3	66.3	0
GCT57	Mixed germ cell tumor	MT, YST, Em, G	P	P	20	M	29.7	29.7	29.7	0
GCT58	Mixed germ cell tumor	MT, G	B	P	11	M	169.8	169.8	169.8	1
GCT59	Mixed germ cell tumor	ImT, G	N	R	24	M	40.0	163.2	163.2	1
GCT60	Mixed germ cell tumor	G, Em	P	P	16	M	151.8	151.8	151.8	0
GCT61	Mixed germ cell tumor	MT, G	P	P	9	M	84.4	90.8	90.8	0
GCT65	Yolk sac tumor		Cerebellum	P	2	M	5.5	22.8	22.8	0
GCT67	Mixed germ cell tumor	MT, G	P	P	12	M	49.9	49.9	49.9	0
GCT68	Mixed germ cell tumor	MT, HGT	P	P	15	M	37.5	37.5	37.5	0
GCT71	Teratoma with somatic-type malignancy (rhabdomyosarcoma)		P	P	24	M	2.7	2.7	2.7	1
GCT73	Mixed germ cell tumor	Ch, G, ImT	B	P	10	M	0.5	0.5	0.5	0
GCT77	Mixed germ cell tumor	G, YST	P	P	27	M	6.3	26.1	26.1	0
GCT78	Germinoma		B	P	11	M	21.2	21.2	21.2	0
GCT83	Germinoma		Medulla	P	22	F	32.0	50.7	50.7	1
GCT84	Germinoma		N	P	12	M	52.2	168.6	168.6	0
GCT89	Germinoma		P	P	33	M	106.3	106.3	106.3	0
GCT91	Germinoma		P	P	17	M	120.8	120.8	120.8	0
GCT93	Germinoma with STGC		P	P	14	M	29.5	29.5	29.5	0
GCT94	Mixed germ cell tumor	G, YST	V	R	20	M	9.4	79.8	79.8	1
GCT95	Germinoma		NBG	P	15	M	230.4	230.4	230.4	0
GCT96	Germinoma		P	P	16	M	228.3	228.3	228.3	0
GCT97	Germinoma		P	P	16	M	209.2	209.2	209.2	0
GCT100	Yolk sac tumor		P	P	12	M	0.9	5.8	5.8	0
GCT103	Germinoma		SP	R	21	F	78.5	283.0	283.0	0
GCT105	Squamous epithelial tumor (desmoplastic trichoepithelioma-like)	Meta		R (meta)	38	M	4.8	197.3	197.3	0
GCT107	Germinoma		P	P	24	M	155.7	155.7	155.7	0
GCT109	Germinoma		N	P	38	F	135.5	135.5	135.5	0
GCT111	Yolk sac tumor		P	P	19	M	127.4	127.4	127.4	0
GCT133	Germinoma		N, P	P	15	M	10.0	10.0	10.0	0
GCT167	Yolk sac tumor		Cerebellum	P	2	M	12.6	12.6	12.6	0
YT1089	Embryonal carcinoma		Testis	ND	ND	ND				0
YT1090	Embryonal carcinoma		Testis	ND	ND	ND				0
YT1095	Mixed seminoma	S, Ch, YST, ImT	Testis	ND	ND	ND				0
Brain										
Testis										

Abbreviations: GCT:Germ Cell Tumour, G:Germinoma, MT:Mature Teratoma, ImT:Immature Teratoma, YST:Yolk Sac Tumour, Ch:Choriocarcinoma, Em:Embryonal Carcinoma, N:Neurohypophysis, P:Pineal gland, B:Basal ganglia, V:Ventricle, M:Male, F:Female, OS:Overall survival, PFS:Progression free survival, m: month, ND: no data

XI 引用文献

1. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature*. Mar 5 2009;458(7234):97-101.
2. Jones DT, Kocalkowski S, Liu L, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer research*. Nov 1 2008;68(21):8673-8677.
3. Northcott PA, Lee C, Zichner T, et al. Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma. *Nature*. Jul 24 2014;511(7510):428-434.
4. Kleinman CL, Gerges N, Papillon-Cavanagh S, et al. Fusion of TTYH1 with the C19MC microRNA cluster drives expression of a brain-specific DNMT3B isoform in the embryonal brain tumor ETMR. *Nature genetics*. Jan 2014;46(1):39-44.
5. Parker M, Mohankumar KM, Punchihewa C, et al. C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-kappaB signalling in ependymoma. *Nature*. Feb 27 2014;506(7489):451-455.
6. Goss PE, Schwertfeger L, Blackstein ME, et al. Extragonadal germ cell tumors. A 14-year Toronto experience. *Cancer*. Apr 1 1994;73(7):1971-1979.
7. Oosterhuis JW, Stoop H, Honecker F, Looijenga LH. Why human extragonadal germ cell tumours occur in the midline of the body: old concepts, new perspectives. *International journal of andrology*. Aug 2007;30(4):256-263; discussion 263-254.
8. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*. Aug 2007;114(2):97-109.
9. Shibui S. Report of brain tumor registry of Japan (2001–2004). *Neurologia medico-chirurgica*. 2013;54.
10. Shibui S. REPORT OF THE BRAIN TUMOR REGISTRY OF JAPAN, 2001-2004. 2014.
11. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology*. Oct 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
12. Wang L, Yamaguchi S, Burstein MD, et al. Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours. *Nature*. Jul 10 2014;511(7508):241-245.
13. Matsutani M, Sano K, Takakura K, et al. Primary intracranial germ cell tumors: a clinical analysis of 153 histologically verified cases. *Journal of neurosurgery*. Mar 1997;86(3):446-455.
14. Bromberg JE, Baumert BG, de Vos F, et al. Primary intracranial germ-cell tumors in adults: a practical review. *Journal of neuro-oncology*. Jun 2013;113(2):175-183.
15. Bujan L, Walschaerts M, Moinard N, et al. Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertility and sterility*. Sep 2013;100(3):673-680.
16. de Haas EC, Altena R, Boezen HM, et al. Early development of the metabolic syndrome

- after chemotherapy for testicular cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. Mar 2013;24(3):749-755.
17. Rusner C, Streller B, Stegmaier C, et al. Risk of second primary cancers after testicular cancer in East and West Germany: a focus on contralateral testicular cancers. *Asian journal of andrology*. Mar-Apr 2014;16(2):285-289.
 18. Gobel U, Schneider DT, Calaminus G, Haas RJ, Schmidt P, Harms D. Germ-cell tumors in childhood and adolescence. GPOH MAKEI and the MAHO study groups. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. Mar 2000;11(3):263-271.
 19. Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature reviews. Cancer*. Mar 2005;5(3):210-222.
 20. Teilum G. Classification of endodermal sinus tumour (mesoblastoma vitellinum) and so-called "embryonal carcinoma" of the ovary. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1965;64(4):407-429.
 21. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, et al. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. Jan 1998;106(1):3-11; discussion 12.
 22. McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Developmental biology*. Oct 1 2003;262(1):1-15.
 23. Irie N, Weinberger L, Tang WW, et al. SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate. *Cell*. Jan 15 2015;160(1-2):253-268.
 24. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature genetics*. Sep 1996;14(1):62-68.
 25. Uhlenhaut NH, Treier M. Foxl2 function in ovarian development. *Molecular genetics and metabolism*. Jul 2006;88(3):225-234.
 26. Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani A, Wylie C. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development*. Apr 2009;136(8):1295-1303.
 27. Laird DJ, Altshuler-Keylin S, Kissner MD, Zhou X, Anderson KV. Ror2 enhances polarity and directional migration of primordial germ cells. *PLoS genetics*. Dec 2011;7(12):e1002428.
 28. Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Bio*. Jan 2010;11(1):37-49.
 29. Gilbert DC, Chandler I, McIntyre A, et al. Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents. *Journal of Pathology*. Jan 2009;217(1):94-102.
 30. Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C. Steel factor controls

- midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development*. Dec 2006;133(24):4861-4869.
31. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Muller J. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *International journal of andrology*. Feb 1987;10(1):19-28.
 32. Almstrup K, Hoei-Hansen CE, Wirkner U, et al. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer research*. Jul 15 2004;64(14):4736-4743.
 33. Nettersheim D, Jostes S, Sharma R, et al. BMP Inhibition in Seminomas Initiates Acquisition of Pluripotency via NODAL Signaling Resulting in Reprogramming to an Embryonal Carcinoma. *PLoS genetics*. Jul 2015;11(7):e1005415.
 34. Rijlaarsdam MA, Tax DM, Gillis AJ, et al. Genome wide DNA methylation profiles provide clues to the origin and pathogenesis of germ cell tumors. *PloS one*. 2015;10(4):e0122146.
 35. Bussey KJ, Lawce HJ, Himoe E, et al. SNRPN methylation patterns in germ cell tumors as a reflection of primordial germ cell development. *Genes, chromosomes & cancer*. Dec 2001;32(4):342-352.
 36. Sievers S, Alemazkour K, Zahn S, et al. IGF2/H19 imprinting analysis of human germ cell tumors (GCTs) using the methylation-sensitive single-nucleotide primer extension method reflects the origin of GCTs in different stages of primordial germ cell development. *Genes, chromosomes & cancer*. Nov 2005;44(3):256-264.
 37. Sano K. Intracranial dysembryogenetic tumors: pathogenesis and their order of malignancy. *Neurosurgical review*. Dec 2001;24(4):162-167; discussion 168-170.
 38. Sano K, Matsutani M, Seto T. So-called intracranial germ cell tumours: personal experiences and a theory of their pathogenesis. *Neurological research*. Jun 1989;11(2):118-126.
 39. Lee SH, Appleby V, Jeyapalan JN, et al. Variable methylation of the imprinted gene, SNRPN, supports a relationship between intracranial germ cell tumours and neural stem cells. *Journal of neuro-oncology*. Feb 2011;101(3):419-428.
 40. Tan C, Scotting PJ. Stem cell research points the way to the cell of origin for intracranial germ cell tumours. *The Journal of pathology*. Jan 2013;229(1):4-11.
 41. Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Satoh M, Hironaka M, Saito K. c-kit gene mutations in intracranial germinomas. *Cancer science*. Sep 2004;95(9):716-720.
 42. Kamakura Y, Hasegawa M, Minamoto T, Yamashita J, Fujisawa H. C-kit gene mutation: common and widely distributed in intracranial germinomas. *Journal of neurosurgery*. Mar 2006;104(3 Suppl):173-180.
 43. Fukushima S, Otsuka A, Suzuki T, et al. Mutually exclusive mutations of KIT and RAS are associated with KIT mRNA expression and chromosomal instability in primary intracranial pure germinomas. *Acta neuropathologica*. 2014;127(6):911-925.

44. Litchfield K, Summersgill B, Yost S, et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. *Nature communications*. 2015;6:5973.
45. Cutcutache I, Suzuki Y, Tan IB, et al. Exome-wide Sequencing Shows Low Mutation Rates and Identifies Novel Mutated Genes in Seminomas. *European urology*. Jan 14 2015.
46. Rodriguez S, Jafer O, Goker H, et al. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene*. Mar 27 2003;22(12):1880-1891.
47. Summersgill B, Goker H, Weber-Hall S, Huddart R, Horwich A, Shipley J. Molecular cytogenetic analysis of adult testicular germ cell tumours and identification of regions of consensus copy number change. *British journal of cancer*. 1998;77(2):305-313.
48. Roelofs H, Mostert MC, Pompe K, et al. Restricted 12p amplification and RAS mutation in human germ cell tumors of the adult testis. *The American journal of pathology*. Oct 2000;157(4):1155-1166.
49. Zafarana G, Grygalewicz B, Gillis AJ, et al. 12p-amplicon structure analysis in testicular germ cell tumors of adolescents and adults by array CGH. *Oncogene*. Oct 23 2003;22(48):7695-7701.
50. Giuliano CJ, Kerley-Hamilton JS, Bee T, et al. Retinoic acid represses a cassette of candidate pluripotency chromosome 12p genes during induced loss of human embryonal carcinoma tumorigenicity. *Biochimica et biophysica acta*. Oct 15 2005;1731(1):48-56.
51. Gilbert D, Rapley E, Shipley J. Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. *Nature reviews. Cancer*. Apr 2011;11(4):278-288.
52. Looijenga LH, Hersmus R, Gillis AJ, et al. Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene. *Cancer research*. Jan 1 2006;66(1):290-302.
53. Okada Y, Nishikawa R, Matsutani M, Louis DN. Hypomethylated X chromosome gain and rare isochromosome 12p in diverse intracranial germ cell tumors. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. Jun 2002;61(6):531-538.
54. Cadieux B, Ching TT, VandenBerg SR, Costello JF. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer research*. Sep 1 2006;66(17):8469-8476.
55. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. Sep 2 2004;431(7004):96-99.
56. De La Fuente R, Baumann C, Fan T, Schmidtman A, Dobrinski I, Muegge K. Lsh is required for meiotic chromosome synapsis and retrotransposon silencing in female germ cells. *Nature cell biology*. Dec 2006;8(12):1448-1454.
57. Queipo G, Aguirre D, Nieto K, et al. Intracranial germ cell tumors: association with Klinefelter syndrome and sex chromosome aneuploidies. *Cytogenet Genome Res*.

- 2008;121(3-4):211-214.
58. Hasle H, Mellemegaard A, Nielsen J, Hansen J. Cancer incidence in men with Klinefelter syndrome. *British journal of cancer*. Feb 1995;71(2):416-420.
 59. Hoei-Hansen CE, Sehested A, Juhler M, et al. New evidence for the origin of intracranial germ cell tumours from primordial germ cells: expression of pluripotency and cell differentiation markers. *The Journal of pathology*. May 2006;209(1):25-33.
 60. Looijenga LH, Gillis AJ, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW. Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Dec 2007;1120:187-214.
 61. Wang HW, Wu YH, Hsieh JY, et al. Pediatric primary central nervous system germ cell tumors of different prognosis groups show characteristic miRNome traits and chromosome copy number variations. *BMC genomics*. 2010;11:132.
 62. Palmer RD, Barbosa-Morais NL, Gooding EL, et al. Pediatric malignant germ cell tumors show characteristic transcriptome profiles. *Cancer research*. Jun 1 2008;68(11):4239-4247.
 63. van der Zwan YG, Rijlaarsdam MA, Rossello FJ, et al. Seminoma and embryonal carcinoma footprints identified by analysis of integrated genome-wide epigenetic and expression profiles of germ cell cancer cell lines. *PloS one*. 2014;9(6):e98330.
 64. Smiraglia DJ, Szymanska J, Kraggerud SM, Lothe RA, Peltomaki P, Plass C. Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene*. May 30 2002;21(24):3909-3916.
 65. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer*. Nov 2006;6(11):857-866.
 66. Spiekermann M, Belge G, Winter N, et al. MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker. *Andrology*. Jan 2015;3(1):78-84.
 67. Gillis AJ, Rijlaarsdam MA, Eini R, et al. Targeted serum miRNA (TSmiR) test for diagnosis and follow-up of (testicular) germ cell cancer patients: a proof of principle. *Molecular oncology*. Dec 2013;7(6):1083-1092.
 68. Belge G, Dieckmann KP, Spiekermann M, Balks T, Bullerdiek J. Serum levels of microRNAs miR-371-3: a novel class of serum biomarkers for testicular germ cell tumors? *European urology*. May 2012;61(5):1068-1069.
 69. Murray MJ, Halsall DJ, Hook CE, Williams DM, Nicholson JC, Coleman N. Identification of microRNAs From the miR-371~373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors. *American journal of clinical pathology*. Jan 2011;135(1):119-125.
 70. Litchfield K, Shipley J, Turnbull C. Common variants identified in genome-wide association studies of testicular germ cell tumour: an update, biological insights and clinical application. *Andrology*. Jan 2015;3(1):34-46.

71. Koster R, Mitra N, D'Andrea K, et al. Pathway-based analysis of GWAs data identifies association of sex determination genes with susceptibility to testicular germ cell tumors. *Human molecular genetics*. Nov 15 2014;23(22):6061-6068.
72. Ogino H, Shibamoto Y, Takanaka T, et al. CNS germinoma with elevated serum human chorionic gonadotropin level: clinical characteristics and treatment outcome. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2005;62(3):803-808.
73. Utsuki S, Kawano N, Oka H, Tanaka T, Suwa T, Fujii K. Cerebral germinoma with syncytiotrophoblastic giant cells: feasibility of predicting prognosis using the serum hCG level. *Acta neurochirurgica*. 1999;141(9):975-978.
74. Inamura T, Nishio S, Ikezaki K, Fukui M. Human chorionic gonadotrophin in CSF, not serum, predicts outcome in germinoma. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1999;66(5):654-657.
75. Shibamoto Y, Takahashi M, Sasai K. Prognosis of intracranial germinoma with syncytiotrophoblastic giant cells treated by radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 1997;37(3):505-510.
76. Fujimaki T, Matsutani M, Nishikawa R, Mishima K, Suzuki T, Katakami H. All germinomas are capable of producing hCG-beta and might be treated in the same protocol. Paper presented at: Neuro Oncol2011.
77. Katakami H, Hashida S, Yamaguchi H, et al. Diagnosis and follow-up of CNS germ cell tumors using an ultrasensitive assay of HCG-beta. *Horm Clin*. 2003;51:196-206.
78. Takami H, Fukushima S, Fukuoka K, et al. Human chorionic gonadotropin is expressed virtually in all intracranial germ cell tumors. *Journal of neuro-oncology*. Aug 2015;124(1):23-32.
79. Zeng N, Liu L, McCabe MG, Jones DT, Ichimura K, Collins VP. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes reveals differential expression of the four ERBB4 juxtamembrane region variants between medulloblastoma and pilocytic astrocytoma. *Neuropathology and applied neurobiology*. Aug 2009;35(4):353-366.
80. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. Feb 1998;11(2):155-168.
81. Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. Dec 2004;17(12):1545-1554.
82. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009;4(1):44-57.
83. Utsuki S, Oka H, Tanizaki Y, Kondo K, Kawano N, Fujii K. Pathological features of

- intracranial germinomas with reference to fibrous tissue and granulomatous change. *Brain tumor pathology*. 2005;22(1):9-13.
84. Guo F, Yan L, Guo H, et al. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell*. Jun 4 2015;161(6):1437-1452.
 85. Fujimaki T, Matsutani M, Nishikawa R, Mishima K, Suzuki T, Katakami H. All germinomas are capable of producing hCG-beta and might be treated in the same protocol. *Neuro-oncology*. 2011;13:I13-I13.
 86. Bjornsson J, Scheithauer BW, Okazaki H, Leech RW. Intracranial germ cell tumors: pathobiological and immunohistochemical aspects of 70 cases. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. Jan 1985;44(1):32-46.
 87. Ikura Y, Sasaki M, Ohgami M, et al. Mixed germ-cell tumor of the brain. Pathologic study of six autopsy cases. *Pathology, research and practice*. Jun 1996;192(6):595-603.
 88. Tamaki N, Lin T, Shirataki K, et al. Germ cell tumors of the thalamus and the basal ganglia. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. Jan 1990;6(1):3-7.
 89. Sano K. Pathogenesis of intracranial germ cell tumors reconsidered. *Journal of neurosurgery*. Feb 1999;90(2):258-264.
 90. Yamagami T, Handa H, Yamashita J, et al. An immunohistochemical study of intracranial germ cell tumours. *Acta neurochirurgica*. 1987;86(1-2):33-41.
 91. Wong JM, Chi SN, Marcus KJ, et al. Germinoma with malignant transformation to nongerminomatous germ cell tumor. *Journal of neurosurgery. Pediatrics*. Sep 2010;6(3):295-298.
 92. Mostofi FK. *Tumors of the male genital system*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology; 1973.
 93. Madersbacher S, Kratzik C, Gerth R, Dirnhofer S, Berger P. Human chorionic gonadotropin (hCG) and its free subunits in hydrocele fluids and neoplastic tissue of testicular cancer patients: insights into the in vivo hCG-secretion pattern. *Cancer research*. Oct 1 1994;54(19):5096-5100.
 94. Louhimo J, Carpelan-Holmstrom M, Alfthan H, Stenman UH, Jarvinen HJ, Haglund C. Serum HCG beta, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. Oct 20 2002;101(6):545-548.
 95. Vartiainen J, Lassus H, Lehtovirta P, et al. Combination of serum hCG beta and p53 tissue expression defines distinct subgroups of serous ovarian carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. May 1 2008;122(9):2125-2129.
 96. Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2010;8:102.
 97. Cole LA, Butler S. Hyperglycosylated hCG, hCGbeta and Hyperglycosylated hCGbeta:

- interchangeable cancer promoters. *Molecular and cellular endocrinology*. Feb 26 2012;349(2):232-238.
98. Lempiainen A, Sankila A, Hotakainen K, Haglund C, Blomqvist C, Stenman UH. Expression of human chorionic gonadotropin in testicular germ cell tumors. *Urologic oncology*. Jul 2014;32(5):727-734.
 99. Jennings MT, Gelman R, Hochberg F. Intracranial germ-cell tumors: natural history and pathogenesis. *Journal of neurosurgery*. Aug 1985;63(2):155-167.
 100. Ogino H, Shibamoto Y, Takanaka T, et al. CNS germinoma with elevated serum human chorionic gonadotropin level: clinical characteristics and treatment outcome. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. Jul 1 2005;62(3):803-808.
 101. Palmer RD, Barbosa-Morais NL, Gooding EL, et al. Pediatric malignant germ cell tumors show characteristic transcriptome profiles. *Cancer research*. 2008;68(11):4239-4247.
 102. Wormann SM, Diakopoulos KN, Lesina M, Algul H. The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene*. Jun 5 2014;33(23):2956-2967.
 103. Parker C, Milosevic M, Panzarella T, et al. The prognostic significance of the tumour infiltrating lymphocyte count in stage I testicular seminoma managed by surveillance. *European Journal of Cancer*. 2002;38(15):2014-2019.
 104. Sperger JM, Chen X, Draper JS, et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nov 11 2003;100(23):13350-13355.
 105. Heim S, Mitelman F. Molecular screening for new fusion genes in cancer. *Nature genetics*. Jun 2008;40(6):685-686.
 106. Rabbitts TH. Commonality but diversity in cancer gene fusions. *Cell*. May 1 2009;137(3):391-395.
 107. Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews. Genetics*. Feb 2011;12(2):87-98.
 108. Kim E, Magen A, Ast G. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic acids research*. 2007;35(1):125-131.
 109. Jividen K, Li H. Chimeric RNAs generated by intergenic splicing in normal and cancer cells. *Genes, chromosomes & cancer*. Dec 2014;53(12):963-971.
 110. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nature reviews. Cancer*. May 22 2015;15(6):371-381.
 111. Nacu S, Yuan W, Kan Z, et al. Deep RNA sequencing analysis of readthrough gene fusions in human prostate adenocarcinoma and reference samples. *BMC medical genomics*. 2011;4:11.
 112. Akiva P, Toporik A, Edelheit S, et al. Transcription-mediated gene fusion in the human genome. *Genome research*. Jan 2006;16(1):30-36.
 113. Parra G, Reymond A, Dabbouseh N, et al. Tandem chimerism as a means to increase

- protein complexity in the human genome. *Genome research*. 2006;16(1):37-44.
114. Kumar-Sinha C, Kalyana-Sundaram S, Chinnaiyan AM. SLC45A3-ELK4 chimera in prostate cancer: spotlight on cis-splicing. *Cancer discovery*. Jul 2012;2(7):582-585.
 115. Rickman DS, Pflueger D, Moss B, et al. SLC45A3-ELK4 is a novel and frequent erythroblast transformation-specific fusion transcript in prostate cancer. *Cancer research*. Apr 1 2009;69(7):2734-2738.
 116. Zhang Y, Gong M, Yuan H, Park HG, Frierson HF, Li H. Chimeric transcript generated by cis-splicing of adjacent genes regulates prostate cancer cell proliferation. *Cancer discovery*. Jul 2012;2(7):598-607.
 117. Gurevich EV, Gurevich VV. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome biology*. 2006;7(9):236.
 118. Gurevich VV, Gurevich EV. The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends in pharmacological sciences*. Feb 2004;25(2):105-111.
 119. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science*. Feb 1 2002;115(Pt 3):455-465.
 120. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology*. 2007;69:483-510.
 121. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*. Mar 1 2005;118(Pt 5):843-846.
 122. Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A. Rab GTPases at a glance. *Journal of cell science*. 2007;120(22):3905-3910.
 123. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2009;10(8):513-525.