

論文の内容の要旨

論文題目 中枢神経胚細胞腫瘍の分子病態解析

氏名 高見 浩数

中枢神経系胚細胞腫(Germ cell tumor: GCT)は他の小児脳腫瘍に比べて病態解析が遅れている。背景には欧米での頻度が少ないこと、また近年は特に欧米諸国において典型的な画像所見と血液中／髄液中のホルモンの値で診断するプロトコールが一般的になり、手術によって組織病理学的診断を行わなくなってきたため、解析に用いることのできる腫瘍検体が不足していることがある。一方で我が国では国立がん研究センターを中心とした頭蓋内胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアムが2011年に設立され、これまでに中枢神経系約180例、性腺約60例の胚細胞腫が集まり、これを基に次世代シーケンス技術を用いた胚細胞腫のゲノム解析が急速に進んでいる。これまでに exome sequence による遺伝子変異解析、450K メチル化アレイによる全ゲノムメチル化解析などが行われ、その成果が発表、投稿されている。この研究はこのコンソーシアムの一翼を担い、主に発現解析とゲノム構造異常解析に貢献するものである。

ホルモン値の代表であるヒト絨毛性ゴナドトロピン(human chorionic gonadotropin: hCG)は絨毛癌(choriocarcinoma)とhCGを産生するgerminoma (hCG-producing germinoma)に特徴的と考えられている。術前検査において血液中、または髄液中にhCGの上昇を認めた場合、日本でも欧米でもより強力な化学療法と放射線治療を行う指針となっている。しかし過去の報告を鑑みると、hCGは必ずしも組織特異的ではないという報告が散見され、またgerminomaにおいてはhCGの産生の有無によって単純に2型に分類できるとは限らないことが示唆されてきている。本研究では全ての組織型を含む94検体の胚細胞腫において、定量的PCRを用いてhCG mRNAの発現解析を行った。その結果、ほとんど全て(93.3%)の胚細胞腫においてhCGが発現していることが確認された(正常脳と比べて $1.09 \times 10^0 - 1.40 \times 10^5$ 倍)。またgerminomaにおいては発現のパターンは様々で($1.09 \times 10^0 - 5.88 \times 10^4$ 倍)、二峰性の分布ではなくだらかに連続的な分布を示した。すなわちhCG発現の有無によってgerminomaを2型に分類することはできなかった。GerminomaにおいてhCG発現と予後との相関は明らかでなかった。このことから、基本的に全ての胚細胞腫はhCGを産生するポテンシャルがあることが示され、臨床の場においてhCGを治療選択の根拠に用いることには慎重になるべきであり、また組織特異的ではないということも認識すべきであると考えられた。

近年次世代シーケンスがより普及し、全身の固形がん、血液がんにおいて遺伝子構造異常が多く報告されてきている。特に小児脳腫瘍においてもpilocytic astrocytomaにおいてBRAF, ependymomaにおいてRELAの遺伝子を伴う融合遺伝子などが報告され、medulloblastomaではenhancer hijackingというメカニズムによりGF11ファミリーの遺伝子の発現が亢進するという構造異

常が報告された。ゲノム構造異常は腫瘍に特異的であることが多く、また同時に病態の大きな原因を担っていることが多いため、診断マーカーや予後予測因子として、また治療標的としても有用な異常として捉えられてきている。一方で中枢神経を含む胚細胞腫瘍ではこれまでに次世代シーケンズ技術を用いたゲノム構造異常の解析や融合遺伝子の報告はない。このために中枢神経胚細胞腫瘍においては標的治療は開発されておらず、一般的に手術・放射線・化学療法が行なわれているのみである。この研究においてはRNAシーケンズとwhole genome sequence (WGS)によりゲノム構造異常を同定して将来的な標的治療のターゲットにつなげることと、胚細胞腫瘍の特徴的な発現プロファイルを明らかにしより胚細胞腫瘍の病態に迫ることを目的とした。様々な組織型を有する62検体の胚細胞腫瘍と正常組織(脳・精巣)についてRNAシーケンズを施行した。発現プロファイルの解析結果としてはgerminomaとnon-germinomaは明確に異なる所見を示し、特にgerminomaは始原生殖細胞(primordial germ cell: PGC)に特徴的な遺伝子 *TCL1A*, *DAZL*, *MAEL*, *UTF1*, *PIWIL2* や、減数分裂のマーカーである *SYCE1* の高発現が見られ、germinomaの起源細胞がPGCであるという仮説を裏付けるものだった。Yolk sac tumorはextracellular matrixに関係する遺伝子の高発現が特徴的だった。またgerminomaは発現レベルで3型に分かれ、それぞれ、Group1:免疫反応、Group2:有糸分裂、Group3:細胞内活動、をそれぞれ特徴とする遺伝子群により特徴づけられた。Group1は病理所見でリンパ球浸潤が多く、最も予後が良好で、また年齢分布は20代以降に偏る傾向があり、臨床的にも特異な所見を呈した。Group2は腫瘍細胞密度が最も高く、また最も予後が悪かった。本研究の胚細胞腫瘍のデータと公共データベース(Gene Expression Omnibus)に登録されているヒト発生初期の細胞とPGC、胎児幹細胞(embryonal stem cell: ESC)の発現データとの主成分解析を行うことにより、germinomaはPGCの系譜、non-germinomaはESCの系譜の発現を示していることがわかり、それぞれの腫瘍型の起源細胞を示唆するものと考えられた。RNA上の融合遺伝子はgerminomaよりもnon-germinomaに有意に多く検出された(1検体あたり25.2 vs 39.6, p=0.0014)。この中で複数の検体にわたって見られる融合遺伝子をさらに解析したところ、Xq13.1に存在し隣り合う遺伝子である *ARR3* と *RAB41* に転写レベルでの融合が検出された。この融合遺伝子は胚細胞腫瘍、特にgerminomaとyolk sac tumorに特異的に検出された。T98G cell lineにプラスミドベクターを用いて導入し、安定クローンを作成して機能解析を行ったところ、この融合遺伝子は細胞の遊走能・浸潤能を亢進させ、一方で増殖能を低下させることが示された。一方でNIH3T3 cell lineにレンチウイルスベクターを用いて導入し、soft-agar colony formation assayを施行したところ、足場非依存性増殖能を与えるという所見はなかった。この融合遺伝子はtranscription-induced gene fusion (TIGF)の1つであると考えられた。遊走能を高める点は、胚細胞腫瘍がPGCの異所性の遊走により生じると考えられていることと何らかの関係があるかもしれないと思われる。さらに機能解析を進めることで、将来的な診断、治療における有用な異常として有望になり得る可能性がある。

またWGSによる構造異常の解析については2症例のgerminomaと2症例のyolk sac tumorの合計4症例について行った。この結果、germinomaではゲノム構造異常は少数(5, 10)であり、yolk sac tumorでは圧倒的に多くの構造異常(78, 105)が検出された。Yolk sac tumorの1例では染色

体 1q21-44 の 95Mb の配列の中に 62 の構造異常が集積しており、chromothripsis を想起させる所見と言えた。複数の症例にわたって見られる構造異常はなく、今後胚細胞腫の病態に深く関わると考えられる構造異常を同定するために、引き続き検証を行う必要がある。

胚細胞腫は未解明の部分が多く残されてきた脳腫瘍の 1 つであった。当研究でのトランスクリプトーム解析と全ゲノムシーケンス解析による発現と構造異常についての新たな知見は胚細胞腫の病態解明につながる大きな進歩である。頭蓋内胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアムにおけるゲノム解析についての多面的で統合的なアプローチにより、この難解な腫瘍の全体像が解明され、近い将来に解決される疾患になることを望む。