

博士論文

論文題目 小児難治性固形腫瘍における
統合的ゲノム解析

氏名 関 正史

目次

代表的な略語一覧	3
要旨	4
序文	5
方法と材料	8
検体	8
エクソーム解析	8
ターゲットディープシーケンス解析	10
miRNA シーケンス解析	11
SNP アレイによるコピー数異常およびアレル不均衡の解析	12
トランスクリプトーム解析	13
DNA メチル化アレイ解析	13
定量 RT-PCR	15
SANGER シーケンス	15
統計解析	16
パスウェイ解析	16
結果	17
1. PPB における解析	17
エクソーム解析	17
ターゲットディープシーケンス解析	18
<i>DICER1</i> 以外の異常	24
2. RMS における解析	27
エクソーム解析	27
候補遺伝子のターゲットディープシーケンス	27
コピー数異常解析	31
トランスクリプトーム解析	31
DNA メチル化アレイ解析	35
DNA メチル化プロファイルによる分類と遺伝子変異、コピー数異常	40
考察	43
1. PPB	43
2. RMS	46
結論	50
謝辞	51
引用文献	52

代表的な略語一覧

PPB, pleuropulmonary blastoma 胸膜肺芽腫

RMS, rhabdomyosarcoma 横紋筋肉腫

ARMS, alveolar rhabdomyosarcoma 胞巣型横紋筋肉腫

ERMS, embryonal rhabdomyosarcoma 胎児型横紋筋肉腫

要旨

難治性小児固形腫瘍の分子病態を解明するために散発性胸膜肺芽腫(PPB)と横紋筋肉腫(RMS)につき統合的ゲノム解析を行った。PPB では、11/12 例が *DICER1* 変異を有し、その約 70%は *DICER1* の両アレル異常を伴っていた。*DICER1* の機能異常による microRNA の不均衡が散発性 PPB の腫瘍発症に関与していると考えられた。RMS においては、組織型、遺伝子異常と相関する DNA メチル化情報に基づいた新規病型分類を見出した。この分類により胞巣型に比し予後良好とされる胎児型の中で、極めて予後不良の一群を抽出した。この新規病型分類を臨床に応用することで、RMS の予後の改善が期待される。

序文

小児における固形腫瘍の治療成績は集学的治療法の進歩により改善されているものの、特に発生頻度の低い疾患においては、いまだ標準治療が確立されておらず、依然予後の改善はみられていない。一方、近年の分子遺伝学的な解析による新規治療薬の開発は目覚ましく、例えば *EML-ALK* 転座陽性例の非小細胞肺癌では、*EML4-ALK* 変異が報告されてから(1)、わずか4年後に ALK 阻害剤であるクリゾチニブが承認され、劇的な効果が報告されている(2)。このように網羅的なゲノム解析技術を用いて、腫瘍発症の原因となるゲノム異常を発見することは新規治療薬の開発に直接結びつくことが期待される。しかしながら、このような解析は症例数の多い疾患で行われ、稀な小児腫瘍性疾患においては解析が十分に進められていないのが現状である。また、小児腫瘍は成人腫瘍に比し、発症年齢が低いことから多段階発がんではなく、少数の遺伝子変異から構成される共通の遺伝学的基盤をもとに発症していることが予想され、解析を行う意義は深い。さらに小児では治療成績の向上により、長期生存が得られた場合、特に成長障害、臓器機能障害、不妊など、晩期障害が重要な課題であり、分子病態に立脚した治療の最適化は、小児腫瘍患者の治癒率改善と重篤な副作用や晩期障害の回避に重要といえる。そこで、本研究においては小児腫瘍の中でも稀であり、かつ難治性である胸膜肺芽腫 (Pleuropulmonary blastoma; PPB) と横紋筋肉腫(Rhabdomyosarcoma; RMS)に着目し、分子病態の解明を試みた。

PPB は5歳以下の乳幼児に好発する極めて稀な小児肺腫瘍であり、進行性の経過を辿り全摘不能であった症例の予後は極めて不良である(3)。腫瘍性疾患の家族歴を持つことがあり、同胞での PPB 発症例も知られている(4)。また、家族

性の PPB 家系におけるゲノム解析では、その原因として RNA リボヌクレアーゼ III である *DICER1* の生殖細胞変異が報告された(5)。生殖細胞系列に *DICER1* 変異を有する症例は *DICER1* 症候群とも呼ばれ、PPB 以外にも家族性に腫瘍性疾患を発症する事が知られている(6)。miRNA は遺伝子の転写後発現調整に関わっており、その産生においては *DICER1* が必須となる(7)。*DICER1* には重要な機能ドメインとして、RNase IIIa ドメインと IIIb ドメインが存在し、miRNA 前駆体を切断し、成熟 miRNA を産生する機能をもつ(8)。過去に PPB において報告されていた *DICER1* 変異は、ほぼすべてナンセンス変異もしくは挿入欠失変異であり、*DICER1* のハプロ不全が原因として考えられている(5, 6)。しかし、*DICER1* の片アレルを喪失させたマウスモデルでは PPB やその他の腫瘍を発生しないと報告されており(6, 9)、*DICER1* のハプロ不全のみでは腫瘍発生に不十分であることが示唆される。また、家族歴のない散発性 PPB においてはゲノム解析の報告はなく、家族性 PPB との分子遺伝学的な病態の違いは十分に解明されていない。

RMS は未分化間葉系細胞から発生する悪性腫瘍であり、軟部肉腫の中では最も頻度が高いが(10)、小児悪性腫瘍全体のわずか 3%程度である(11, 12)。RMS は組織型として胎児型(Embryonal RMS; ERMS)と胞巣型(Alveolar RMS; ARMS)に大別されるが、60%が ERMS、25%が ARMS であり、それ以外は混合型や分類不能型が含まれる(13, 14)。近年の化学療法の進歩により、転移を認めない症例では 75%以上の生存が得られるが(15)、転移もしくは再発例では 5 年生存率は 30%未満となる(16)。ARMS は ERMS に比べ予後は悪く、約 70%に *PAX3-FOXO1* もしくは *PAX7-FOXO1* 融合遺伝子が検出される(17, 18)。ERMS は比較的予後はよいことが知られ、分子遺伝学的な

異常としては、11p15 領域のヘテロ接合性喪失が多いとされるが(10, 19)、それ以外の異常は十分に知られていない。また遺伝子変異としては、*TP53* 変異(20)、*RAS* 関連の変異(21)、*PIK3CA* 変異や *CTNNB1* 変異(22)などが報告されていたが、次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析により、*FGFR4* 経路の異常も報告された(23)。しかし、これらの遺伝子異常を認めない例も存在し、**RMS** における分子病態の全貌は解明されてない。一方、腫瘍発生にはエピゲノム異常の関与も重要であると考えられているが、**RMS** におけるエピゲノム異常は、少数例での検討のみである(24, 25)。

これらの難治性小児固形腫瘍の分子病態を解明するため、**PPB** と **RMS** に対し、エクソーム解析、ターゲットディープシーケンス解析、SNP アレイ解析、DNA メチル化アレイ解析を組み合わせた統合的ゲノム解析を行った。

方法と材料

検体

PPB 患者 7 例と RMS 患者 16 例に対し(表 1)、腫瘍検体と骨髄血または末梢血から採取した対象となる正常 DNA 検体をペアで用いてエクソーム解析を行い、腫瘍特異的な体細胞変異の抽出を行った。PPB 患者 2 例(PPB_001、PPB_002)においては、再発時検体も同時に解析を行った。エクソーム解析にて抽出された候補遺伝子や異常が知られている既知の遺伝子に対し、PPB 患者合計 12 例 15 検体(再発検体の PPB_001R、PPB_002R、PPB_004R を含む)と RMS 患者合計 60 例に対し、ターゲットディープシーケンス解析を行った (エクソーム解析施行症例数を含む)。また凍結腫瘍検体が得られた症例に対しては SNP アレイによるコピー数異常およびアレル不均衡の解析を行った。RMS においては DNA の異常メチル化を評価するために DNA メチル化アレイを 50 例に対し施行した。RMS における診断名は病理組織診断に基づいて記載した。本研究は患者もしくは保護者より同意を取得し、東京大学倫理委員会の承認を受けて施行された (承認番号 : 1598)。

エクソーム解析

Agilent 社の SureSelect All Human Exon Kit 50Mb、V3、V5 を用い、断片化した患者 DNA からエクソン領域の濃縮を行い、ライブラリーの作成を行った。精製されたライブラリーは Illumina 社の HiSeq 2000 を用い、ペアエンド法による大量並列シーケンスを行った。シーケンスデータは東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピューター Shirokane を用いて解析を行った。

表 1 エクソーム解析を施行した 23 例の臨床所見

検体 ID	性別	診断	融合遺伝子	解析検体	診断時年齢	原発部位
PPB_001P/R	男	PPB	-	P, R	3	肺
PPB_002P/R	男	PPB	-	P, R	不明	肺
PPB_004P	男	PPB	-	P	不明	肺
PPB_007P	女	PPB	-	P	2	肺
PPB_009P	女	PPB	-	P	3	肺
PPB_010P	男	PPB	-	P	4	肺
PPB_012P	男	PPB	-	P	1	肺
RMS_002P/R	女	ARMS	<i>PAX3-FOXO1</i>	P, R	14	肛門
RMS_003P/R	女	ARMS	<i>PAX3-FOXO1</i>	P, R	7	左足
RMS_016M	男	ARMS	<i>PAX3-FOXO1</i>	M	10	不明 (多発転移)
RMS_004R	女	ARMS	<i>PAX7-FOXO1</i>	R	12	左腕
RMS_005P	女	ARMS	<i>PAX7-FOXO1</i>	P	2	後腹膜
RMS_007P	女	ARMS	<i>PAX7-FOXO1</i>	P	不明	不明
RMS_001P/M	女	ARMS	陰性	P, M	9	膣
RMS_006P	男	ARMS	不明	P	11	膀胱
RMS_008R	男	ERMS	陰性	R	0	肛門
RMS_009R	男	ERMS	陰性	R	0	膀胱
RMS_011M	男	ERMS	陰性	M	5	骨盤内
RMS_013P	女	ERMS	陰性	P	2	膣
RMS_014P	女	ERMS	陰性	P	2	子宮
RMS_015P	女	ERMS	陰性	P	1	膣
RMS_017P	男	RMS 混合型	陰性	P	9	左眼窩
RMS_012P	男	RMS 分類不能型	陰性	P	2	後腹膜

P, 初発検体; R, 再発検体; M, 転移検体

京都大学小川研と東京大学医科学研究所宮野研による共同開発の解析パイプライン Genomon-exome (<http://genomon.hgc.jp/exome/index.html>)を用いて体細胞変異の抽出を行った。まず、得られたシーケンスリードを、それぞれの検体に塩基配列によってつけられているインデックスごとにシーケンスデータを振り分けた後、BWA (Burrows-Wheeler Aligner)(26)を用いてヒトゲノムのリファレンス配列(NCBI Human Reference Genome Build 37)に対してマッピングを行った。クオリティの低いリードを除外した後、リファレンス配列とは異なる塩基を同定し、腫瘍検体において総リード数の 7%以上の頻度で認められる一塩基置換もしくは

は挿入欠失を変異候補として抽出した。抽出された変異候補に対し、ANNOVA(27)により変異候補の位置情報、アミノ酸変化、SNP データベース登録の有無などの情報を付加し、解析結果として出力した。さらに、NCBI dbSNP database Build 131 および京都大学小川研の in-house SNP データベースに登録がある変異候補とアミノ酸置換を伴わない変異候補を除外した。ただし、COSMIC (cancer.sanger.ac.uk/cosmic)に登録のあるものは変異候補として残した。PPB 検体においては、さらに腫瘍検体での変異アレルと正常アレルのリード数、対象正常検体での変異アレルと正常アレルのリード数を用いて Fisher 検定を行い、P 値が 0.001 以下であるものを変異候補として確定をした。これらの変異候補に対して、個々にプライマー設計を行い、腫瘍検体と正常検体においてディープシーケンス解析を行い、腫瘍検体においてのみ変異が再度確認されたものを体細胞変異として確定した。ディープシーケンス解析の手法は下記のターゲットディープシーケンス解析の項で詳細を示す。また RMS 検体においては、より偽陰性、偽陽性を除外できる Empirical bayesian 法(EB call)(28)による変異候補の抽出を行い、EB call での P 値が 1.0×10^{-6} 以下であるものを変異候補として確定し、同様にディープシーケンス解析による確認を行った。

ターゲットディープシーケンス解析

PPB に対しては家族性 PPB にて報告されていた *DICER1* を、RMS に対しては *FGFR4* 経路に関連する遺伝子を初めとする文献報告(23)のある遺伝子(*FGFR4*、*PTPN11*、*GAB1*、*PIK3CA*、*PTEN*、*HRAS*、*NRAS*、*KRAS*、*NF1*、*TP53*、*FBXW7*)を、またエクソーム解析で重複して変異が認められた遺伝子(PPB に対し *TP53*、*GPR182*、*CTNNB1*、と RMS に対し *ARID1A*、*BCOR*、*ROBO1*)のコーディング領

域に対してディープシーケンス解析を行った。上記遺伝子のコーディング領域に対してプライマー設計を行い、NotI 配列を付加したプライマーにて PCR アンプリコンを作成した。次世代シーケンサーによる大量並列シーケンスにおいては多様性の少ないリードに対してはシーケンスエラーが増加する懸念があるため、NotI 配列を付加したプライマーで PCR アンプリコンを作成することにより、NotI 酵素による両端の切断と T4 ligase によりランダムに PCR アンプリコンを接続させ、さらに断片化を行うことにより、多様性をもたせたリードを作成した。このような前処置を行った PCR アンプリコンをインプットとして、NEB 社の NEB Next DNA Ultra Library kit もしくは NEB Next DNA Library Kit を用いてライブラリー作成を行った。作成されたライブラリーは Illumina 社の HiSeq 2000 もしくは Miseq にてシーケンスを行った。得られたシーケンスデータはエクソーム解析と同様の手法でリファレンス配列に対してマッピングを行い、リファレンス配列とは異なる塩基を有するリード数を計算し、変異として抽出した。エクソーム解析と同様に dbSNP に登録のある変異、アミノ酸置換の生じない変異を除外し、変異のアレル頻度が 2%以上であるものを変異として確定した。

miRNA シーケンス解析

DICER1 変異による miRNA 産生の影響を調べるため、PPB 症例において miRNA シーケンス解析を行った。正常対照として、市販されている正常胎児肺から抽出した RNA を用いた(BioChain 社 Total RNA, Lot No. B505185, Human Normal Fetal lung, Male, 38 weeks old, Pool of 1 donor)。RNA 抽出には QIAGEN 社の miRNeasy kit を用い、Agilent 社の Bioanalyzer により RNA の質を確認した。質のよい RNA が得られた PPB 4 例と正常胎児肺検体に対し、ライブラリー作成

に Illumina 社の TruSeq small RNA Sample Preparation Kit を使用し、Illumina 社の Miseq によりシーケンスを行った。Illumina 社の Miseq reporter v2.3 を用い、miRBase (release 16) にマッピングを行い、pre-miRNA、5p-miRNA、3p-miRNA のリード数をカウントした。DICER1 の機能は RNase IIIa と RNase IIIb の 2 つのドメインにより pre-miRNA 切断がなされており、RNase IIIa ドメインにより、pre-miRNA の 3p 側、RNase IIIb ドメインにより pre-miRNA の 5p 側が切断されるため、両ドメインの機能を比較するため、pre-miRNA の 3p 側、5p 側の切断率として、それぞれ下記のように定義し、以降の統計解析に用いた。正常胎児肺を対照とし、Wilcoxon 順位和検定にて比較した。

$$\text{5p 側 pre miRNA 切断率} = \frac{\text{5p miRNA の総リード数}}{\text{5p miRNA の総リード数} + \text{pre miRNA の総リード数}}$$

$$\text{3p 側 pre miRNA 切断率} = \frac{\text{3p miRNA の総リード数}}{\text{3p miRNA の総リード数} + \text{pre miRNA の総リード数}}$$

SNP アレイによるコピー数異常およびアレル不均衡の解析

Affymetrix 社の Affymetrix GeneChip 250K array を用いて網羅的なゲノムコピー数およびアレル不均衡の解析を行った。実験は Affymetrix 社のプロトコールに準じて行い、スキャンされたアレイ情報を Affymetrix 社の GTYPE ソフトウェアによって SNP タイピングを行い、CNAG/AsCNAR アルゴリズム(29, 30)を用いてコピー数およびアレル不均衡の解析を行った。凍結腫瘍検体が得られた PPB 11 例 14 検体(3 例の再発検体を含む)と RMS 63 例 65 検体(2 例の再発検体を含む)に対して施行した。RMS においては GISTIC(31)による解析を行い、有意に変動しているコピー数異常の領域を抽出した。

トランスクリプトーム解析

質のよい RNA が得られた RMS 8 例 (ARMS 3 例、そのうち *PAX3-FOXO1* 陽性 2 例、ERMS 5 例) に対し、トランスクリプトーム解析を行った。RNA の質の評価は Agilent 社の Bioanalyzer にて行い、RNA integrity number が 6.0 以上のものを採用した。Illumina 社の Truseq RNA sample Preparation kit を用いてサンプルの調整を行い、Illumina 社 HiSeq2000 にてシーケンスを行った。融合遺伝子の検出には、京都大学小川研と東京大学医科学研究所宮野研による共同開発の解析パイプライン Genomon-fusion (<http://genomon.hgc.jp/rna/>) を用いた。抽出した 200ng の RNA から ThermoFisher 社の SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix を用い、cDNA を作成し、RT-PCR と Sanger シーケンスにて検出された融合遺伝子の確認を行った。

DNA メチル化アレイ解析

RMS においては DNA メチル化プロファイルを調べるため、Illumina 社の Infinium HumanMethylation450 BeadChip を再発検体 3 例を含む RMS 50 症例 53 検体に対して解析を行った。得られた β 値を一度 M 値に変換し (32)、bioconductor R パッケージの `pcaMethods` を用いて欠損値の補間を行ったのち、 β 値に再変換した。補間された β 値のリストから、まず X 染色体と Y 染色体上のプローブを除外した。さらにそれぞれのプローブに対し、サンプル間の分散を計算し、分散の大きい上位 1% のプローブを選択し、以下の解析に使用した。最終的に 4708 プローブのデータを用い、ユークリッド距離と Ward 法によるラベルなしの階層的クラスタリングを施行した。クラスタリングされた群間で有意に変動しているプローブを抽出するため、Wilcoxon 順位和検定にて比較を行った。個々の遺

伝子に対してメチル化の有無を検定するため、DNA メチル化データに対する乗法型分解モデル (Multiplicative Decomposition Model) を考え、本研究では、正常コントロールサンプルとして、若年成人 48 検体の正常骨格筋の公開データを使用した(33)。以下に示す過程で解析を行った。

RMS サンプル i の、遺伝子 k の転写開始点から 1500 bp 上流までに含まれるプローブ j におけるメチル化量 (β 値) を x_{ijk} 、遺伝子 k におけるプローブ j における正常骨格筋 48 サンプルの平均メチル化量 (β 値) を c_{jk} とする。また、サンプル数を n 、遺伝子の数を g 、遺伝子 k における転写開始点から 1500 bp 上流までに含まれるプローブ数を p_k とする。このとき、各遺伝子 k に対する DNA メチル化は、以下の 2 元分割乗法型分解モデルによって表現できると仮定する。

$$x_{ijk} = a_{ik} \times b_{jk} + c_{jk} + e_{ijk}$$

ここで、 e_{ijk} は観察誤差、 a_{ik} はサンプルに依存するメチル化のパターン、 b_{jk} はプローブの位置に依存するメチル化のパターンとする。パラメーター a_{ik} および b_{jk} に対する推定をベイズ主成分分析により推定を行った(34)。また、 a_{ik} の $i = 1, \dots, n$ に対しては、遺伝子 k における p_k のプローブの平均 β 値に比例するものを選択した。次に、 a_{ik} が正常骨格筋と比較し有意にメチル化されているか、もしくは脱メチル化しているかを調べるための z スコアを下記のように算出した。

$$z_{ik} = \frac{a_{ik} - \overline{a_k^N}}{\sigma_k^N}$$

$\overline{a_k^N}$ と σ_k^N はそれぞれ、遺伝子 k における正常骨格筋の DNA メチル化量の平均と分散とする。しきい値 T に対し、サンプル i における遺伝子 k の DNA メチル化と

して、 $|z_{ik}| > T$ である場合に異常メチル化と判定した。また、それぞれの遺伝子に対して下記の仮説検定を考える場合の多重性の問題を考える。

$$H_0(i, k) = \text{no aberration of gene } k \text{ for sample } i.$$

しきい値 T に対する false discovery rate (FDR) の推定値は以下より算出することができる。

$$\widehat{FDR}(T) = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^g I(|z_{ik}| > T) I(H_0(i, k) \text{ is true})}{\sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^g I(|z_{ik}| > T)}$$

本研究では、 $FDR < 0.001$ を満たす最大のしきい値 T を採用した。

定量 RT-PCR

PTEN の発現量を評価するため、RMS 19 検体に対して定量 RT-PCR を行った。抽出した 200ng の RNA から ThermoFisher 社の SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix を用い、cDNA を作成し、QIAGEN 社の QuantiTect SYBR Green PCR kit と Biolad 社の iCycler iQ real-time PCR detection system を使用した。正規化のために、GAPDH をコントロールとして使用した(35, 36)。

Sanger シーケンス

Amplitaq Gold 360 Master Mix を用い PCR 反応を行い、電気泳動による確認と PCR 産物の精製の後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit にてシーケンス PCR を行った。BigDye X Terminator 精製キットにて精製し、3500 Genetic Analyzer にてシーケンスを行った。Sanger シーケンスはいずれも Thermo Fisher 社の試薬・機材を使用した。

統計解析

統計解析はソフトウェア R を用いて行った。生存時間解析は Kaplan-Meier 法を用い、Log-rank 法にて群間の差を検定した。DNA メチル化アレイで分類された E1 群と E2 群、A1 群と A2 群で差の大きいプローブを複数有する遺伝子を抽出するため、横軸に 2 群間の個々のプローブにおける β 値の fold change、縦軸に Wilcoxon 順位和検定による P 値を取り、volcano plot で描画した。上位 100 前後のプローブを抽出するため、fold change を 2 倍以上、P 値を 10^{-3} 未満(E1 群と E2 群の比較)、 10^{-6} 未満(A1 群と A2 群の比較)として絞り込みを行った。そのうち、1 つの遺伝子に対し 2 プローブ以上有するものを DNA メチル化の差の大きい遺伝子として決定した。

パスウェイ解析

IPA (Integrated Pathway Analysis, <http://www.ingenuity.com/products/ipa>)を用いて、DNA メチル化アレイで分類された E1 群と E2 群、A1 群と A2 群において DNA メチル化の差が大きい遺伝子に対し、パスウェイ解析と機能アノテーション解析を行った。

結果

1. PPB における解析

エクソーム解析

エクソーム解析によるシーケンスは、20 回以上の深度で標的領域を読めた割合(カバレッジ)が全検体を平均して 93%であり、また腫瘍検体においては平均 126 回、正常検体においては平均 128 回の深度が得られ、十分な深度で解析がなされていることが確認された(図 1a)。217 個のアミノ酸変化を伴う一塩基変異と 12 個の挿入欠失変異が抽出され、そのうち 191 個のアミノ酸変化を伴う一塩基変異(88%)と 12 個の挿入欠失変異(100%)がディープシーケンスにより確認された。初発時の検体で平均 17 個の変異が確定された(図 1b)。これは報告されている成人の固形腫瘍に比べて少数であるが(37-39)、神経芽腫や髄芽腫といった小

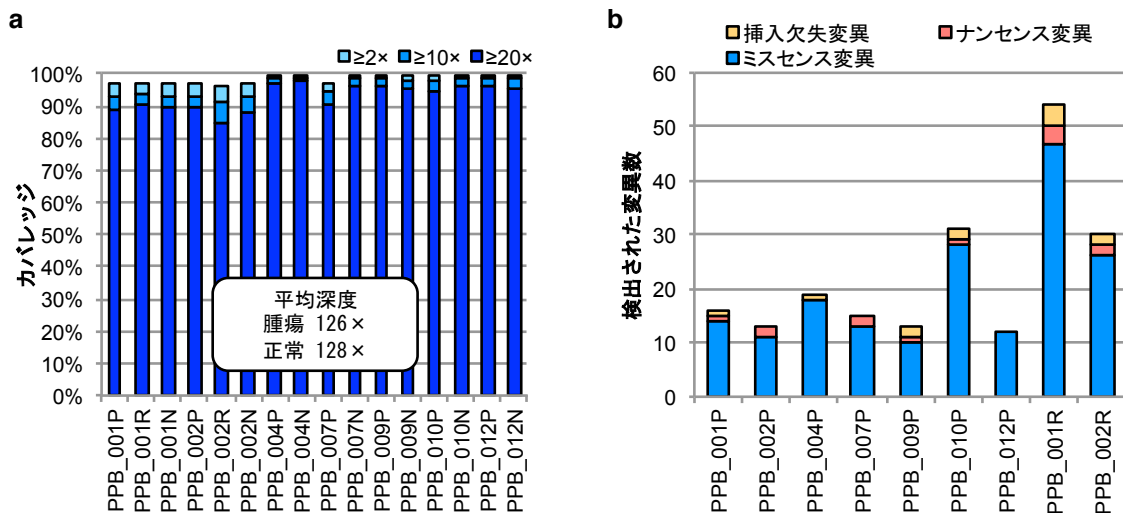


図 1 PPB 7 症例におけるエクソーム解析

a. エクソーム解析のカバレッジと深度。≥20x、≥10x、≥2x、それぞれの深度で読めているターゲット領域の割合をそれぞれ対応する色で示した b. エクソーム解析により検出された変異数。初発検体の平均として 17 個の変異が同定された。同定された変異の種類を色分けして示した。

P, 初発検体; R, 再発検体; N, 正常検体

児固形腫瘍と比べて同等であった(40, 41)。初発・再発検体に対して解析を行った PPB_001 と PPB_002 において、初発時と再発時に検出されている遺伝子変異の包含関係を比較した(図 2a)。2 例とも初発時と再発時に共有する変異を持つ一方で、初発時のみで検出される変異や再発時のみで検出される変異が認められた。これをディープシーケンスにより得られたアレル頻度で初発時の値を横軸に、再発時の値を縦軸にプロットを行った(図 2b)。これにより、PPB_001 では赤でプロットされたような再発時に出現する新たな変異において、メジャークローンに比し低いアレル頻度を持つ、マイナークローンと考えられる集団が存在することが示された。また PPB_002 においては緑で示したような初発時にも再発時にもメジャークローンに比し低いアレル頻度を持つ集団があり、初発から再発を通じてさまざまなクローンが存在することが示されている。エクソーム解析を行った 7 症例のうち、PPB_002 を除く 6 症例において *DICER1* 変異が検出された。再発例を解析していない 5 症例においてもディープシーケンスにより得られた変異のアレル頻度をプロットすると、いずれの症例においてもオレンジで示した *DICER1* 変異はアレル頻度の高い集団に含まれ、メジャークローンとして *DICER1* 変異が存在していることが示された(図 2c)。

ターゲットディープシーケンス解析

エクソーム解析施行例を含む PPB 12 例において、*DICER1* の全コーディング領域に対して、ディープシーケンス解析を行った。これにより 12 例中 11 例(92%)と高率に *DICER1* 変異を有することが確認された(図 3a)。エクソーム解析では *DICER1* 変異が検出されなかった PPB_002 の症例はディープシーケンスにおいても *DICER1* 変異は検出されなかった。

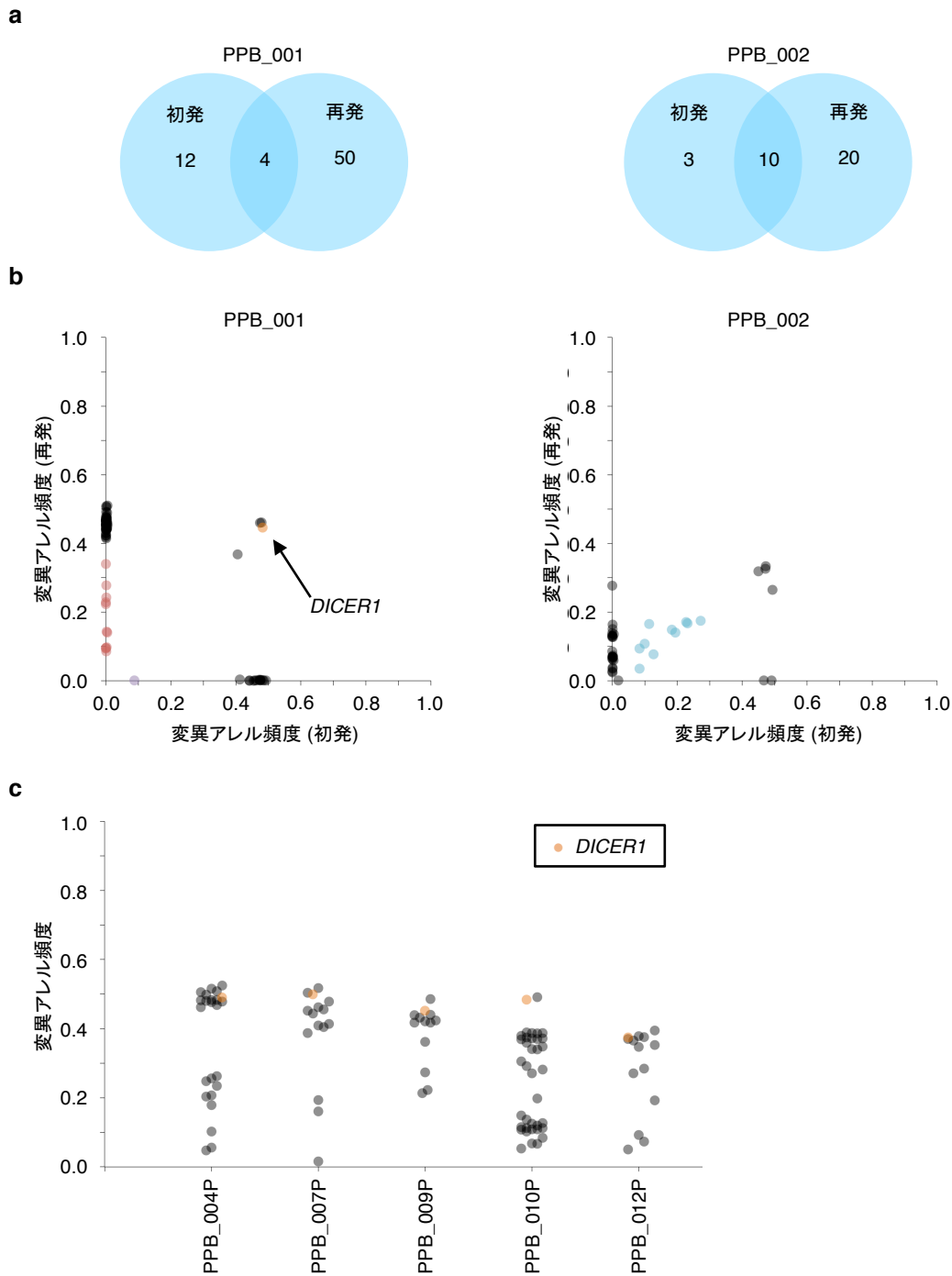


図 2 エクソーム解析により検出された変異とそのアレル頻度

a, b. 初発検体と再発検体を解析した 2 例における変異の包含関係とアレル頻度。PPB_002 では *DICER1* 変異を認めなかった。PPB_001 において再発特異的な変異のうち、アレル頻度の低いマイナークローンの変異を赤で示した。b では初発再発共有する変異であるが、マイナークローンに思われる変異を緑で示した。c. 初発検体を解析した 5 例における変異のアレル頻度。b, c においては *DICER1* の変異をオレンジで示した。コピー数異常を伴うアレル頻度に関しては補正した値で示した。

これら *DICER1* 変異の種類の内訳は、ヘテロ変異 3 例(25%)、ホモ変異 2 例(17%)、コンパウンドヘテロ変異 6 例(50%)であった(図 3a)。ホモ変異の 2 例(PPB_009、PPB_010)においては、SNP アレイにより *DICER1* が位置している 14 番染色体長腕のヘテロ接合生喪失(LOH)を生じていることが確認された(図 3b)。興味深いことに、すべての 9 つのミスセンス変異は *DICER1* の RNase IIIb ドメイン内に含まれ、G1809 に変異が集中して認められた(図 3c)。以上の結果により、*DICER1* 変異を有していた 11 例のうち、8 例(73%)は *DICER1* の両アレル変異を生じており、正常機能を持つ *DICER1* が腫瘍内においては存在していないことが示唆された。*DICER1* 変異を有する症例のうち、8 例は正常検体が得られ、体細胞変異もしくは生殖細胞変異であるかの確認を行った。コンパウンドヘテロ変異の症例においては 4 例で正常検体が得られ、いずれの症例も体細胞のミスセンス変異と生殖細胞の挿入欠失変異もしくはナンセンス変異であることが示された(PPB_004、PPB_007、PPB_008、PPB_012)。ホモ変異の 2 例はいずれも体細胞変異であり(PPB_009、PPB_010)、残りはヘテロ変異の 2 例が体細胞のミスセンス変異(PPB_001)と生殖細胞の挿入欠失変異(PPB_005)であった(表 2)。正常組織検体が得られなかった 4 例に対しては、ディープシーケンス解析によって算出されたアレル頻度により体細胞変異であるか生殖細胞変異であるかの推定を行った。このうちコンパウンドヘテロ変異であった PPB_006 におけるミスセンス変異はアレル頻度 0.38 であり、生殖細胞変異の場合に予想されるアレル頻度 0.50 より低く、体細胞変異であると推定した。

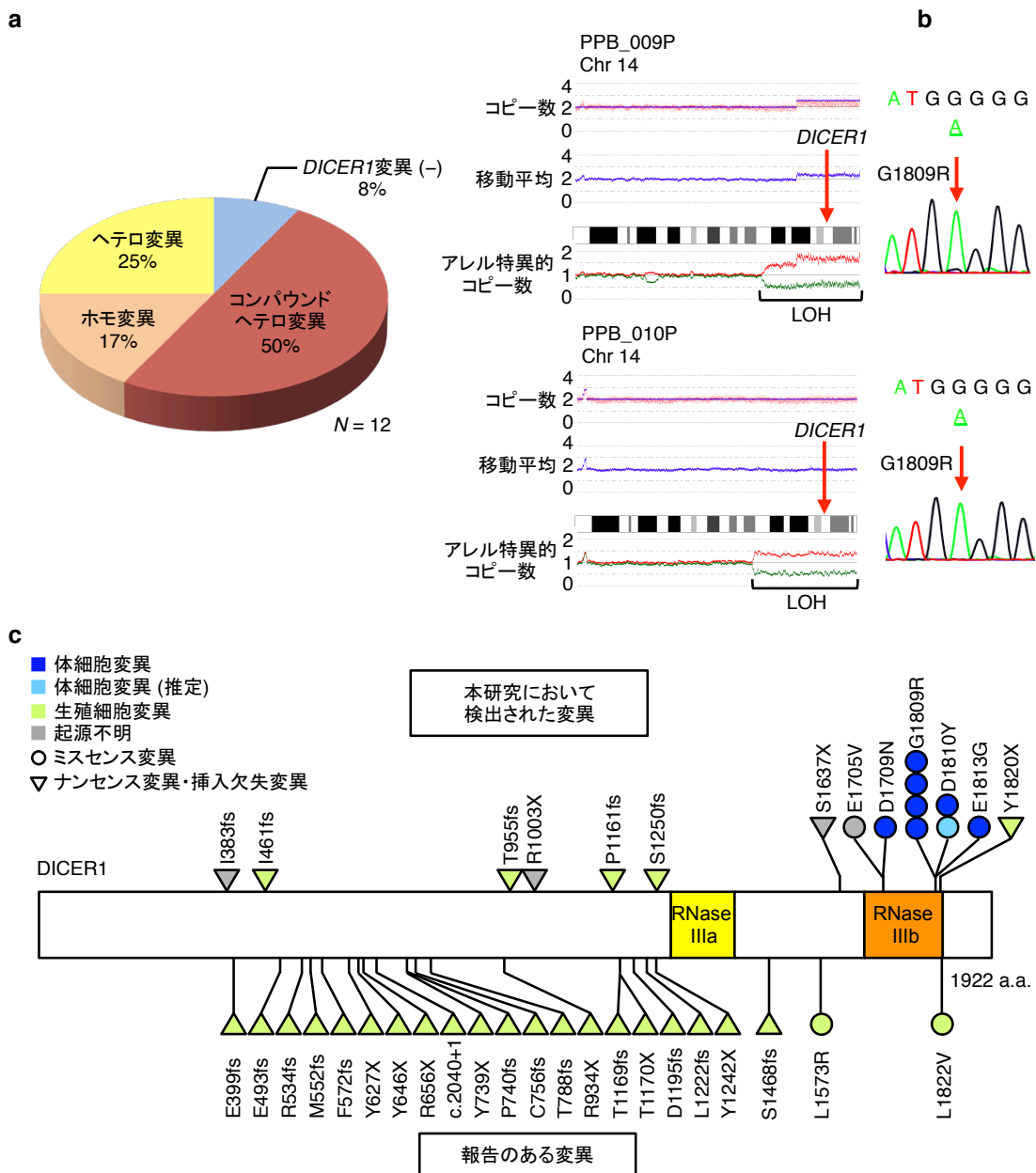


図 3 ターゲットディープシーケンス解析により検出された *DICER1* 変異
 a. 検出された *DICER1* 変異の種類と頻度。12 例中 11 例に *DICER1* 変異が検出され、半数は 2 つの *DICER1* 変異を有するコンパウンドヘテロ変異であった。b. *DICER1* ホモ変異例における 14 番染色体長腕のヘテロ接合生喪失(LOH)と Sanger シーケンスの波形。*DICER1* 領域に LOH を生じており、Sanger シーケンスでホモ変異の波形となっていることが確認できた。c. 検出された *DICER1* 変異(上側)と家族性 PPB において報告のある *DICER1* 変異(下側)。ミスセンス変異を○印、ナンセンス変異・挿入欠失変異を▽印で示した。また体細胞変異を青、体細胞変異と推定された変異を水色、生殖細胞変異を黄緑色、起源不明のものを灰色で示した。RNase IIIb ドメイン内に集中してミスセンス変異を認め、特に G1809 は変異のホットスポットであると考えられた。

次に、DICER1 は RNase IIIa ドメインが 3p 側、RNase IIIb ドメインが 5'側の pre-miRNA を切断することにより、成熟 miRNA を産生しているため、RNase IIIb ドメインにおけるミスセンス変異の影響を miRNA シーケンス解析によって評価した。その結果、*DICER1* 変異を有する 4 例はいずれも胎児肺検体と比べ、5p-miRNA の産生が有意に低いことが確認され($P < 7.1 \times 10^{-7}$)、RNase IIIb ドメインにおけるミスセンス変異の影響が確認された(図 4a)。それに対し、3p-miRNA は胎児肺検体と比べむしろ産生は有意に高い結果が得られた($P < 1.4 \times 10^{-3}$) (図 4b)。

表 2 PPB において検出された *DICER1* 変異とその起源

	エクソン	塩基置換	アミノ酸置換	起源
PPB_001	25	c.5428G>T	p.D1810Y	体細胞
PPB_002		正常		
PPB_003	23	c.4910C>A	p.S1637X	不明
	24	c.5114A>T	p.E1705V	不明
PPB_004	21	c.3482delC	p.P1161fs	生殖細胞
	24	c.5125G>A	p.D1709N	体細胞
PPB_005	9	c.1383delAAAG	p.I461fs	生殖細胞
PPB_006	19	c.3007C>T	p.R1003X	不明
	25	c.5428G>T	p.D1810Y	体細胞 (推定)
PPB_007	18	c.2863insA	p.T955fs	生殖細胞
	25	c.5425G>A	p.G1809R	体細胞
PPB_008	21	c.3748delC	p.S1250fs	生殖細胞
	25	c.5425G>A	p.G1809R	体細胞
PPB_009	25	c.5425G>A (ホモ変異)	p.G1809R	体細胞
PPB_010	25	c.5425G>A (ホモ変異)	p.G1809R	体細胞
PPB_011	8	c.1148dupAGGGT	p.I383fs	不明
PPB_012	25	c.5460C>G	p.Y1820X	生殖細胞
	25	c.5438A>G	p.E1813G	体細胞

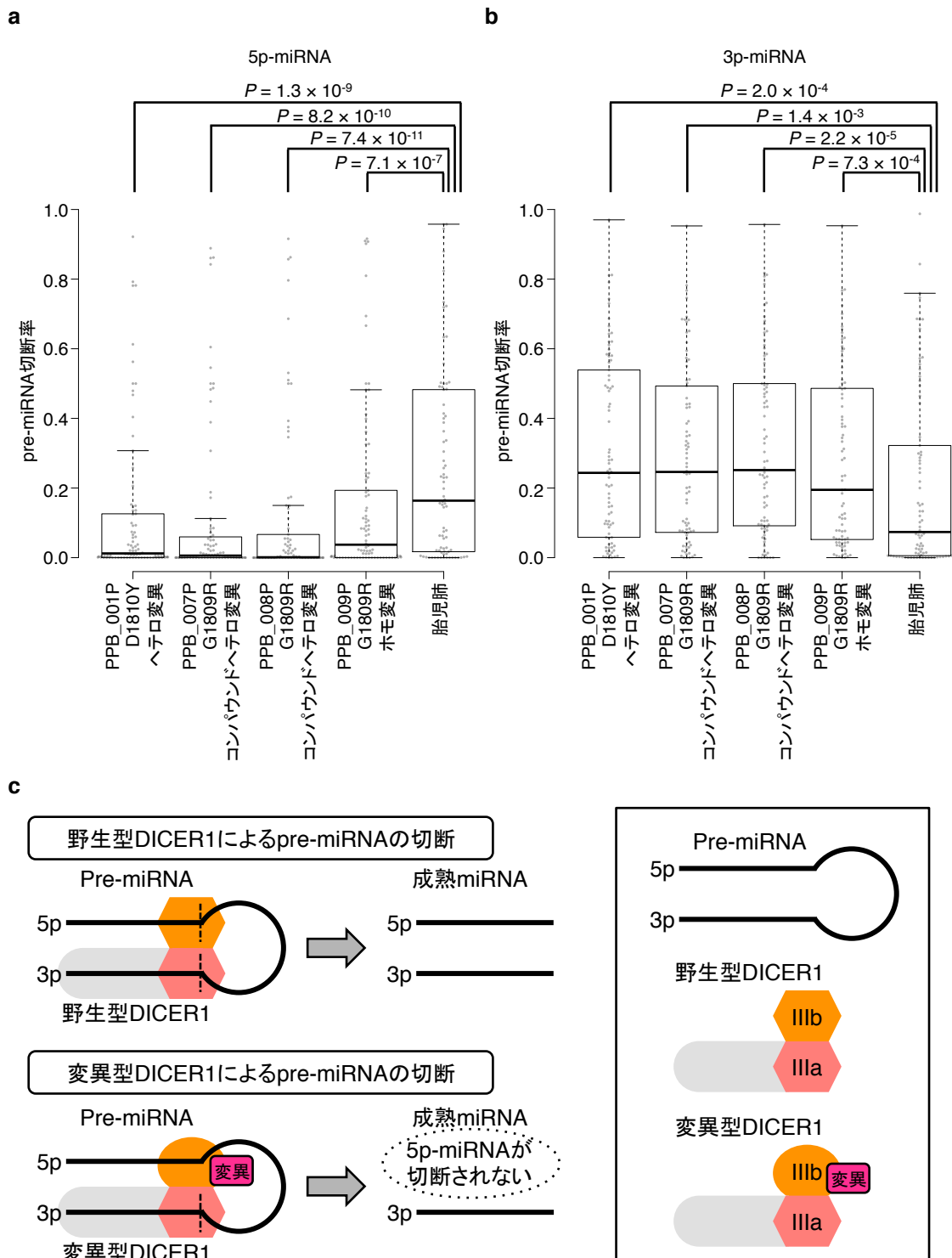


図 4 miRNA シーケンス解析による pre-miRNA 切断率の比較

a, b. miRNA シーケンス解析により pre-miRNA と 5p-miRNA、3p-miRNA のリード数から pre-miRNA の切断率から 5p-miRNA (a) と 3p-miRNA (b) の産生を比較した。c. 野生型 DICER1 の機能と予想される変異型 DICER1 の機能。RNase IIIb ドメインに変異を有する変異型 DICER1 においては 5p-miRNA の産生に影響が生じることが推定される。

DICER1 以外の異常

エクソーム解析により、*DICER1* 以外の遺伝子異常として、*TP53* に 3 例、*CTNNB1*、*GPR182*、*MYH8*、*PDE2A*、*TMX3* に 2 例で重複して変異が検出された。*TP53*、*CTNNB1*、*GPR182* に対しては、*DICER1* 同様に全 12 症例に対して全コーディング領域につきターゲットディープシーケンスを用いて変異の検索を行った。*CTNNB1* と *GPR182* に対しては新たな変異は検出されなかったが、*TP53* は合計 5 症例(42%)において変異が検出された(表 3)。

表 3 エクソーム解析とターゲットディープシーケンスにより同定された重複する遺伝子変異

遺伝子	サンプル	変異の種類	塩基置換	アミノ酸置換
<i>TP53</i>	PPB_003P	欠失変異	c.332_333delITG	p.L111fs
	PPB_004P	ミスセンス変異	c.G527T	p.C176F
	PPB_004R	ミスセンス変異	c.G313A	p.G105S
	PPB_007P	欠失変異	c.891_903del CGAGCTGCCCCA	p.H297fs
	PPB_008P	欠失変異	c.762_764delACAT	p.I254fs
	PPB_010P	ミスセンス変異	c.C817T	p.D273C
<i>CTNNB1</i>	PPB_001R	挿入変異	c.131_133delCTT	p.P45del
	PPB_010P	ミスセンス変異	c.A1003C	p.K335Q
<i>GPR182</i>	PPB_002P/R	ミスセンス変異	c.C1205A	p.T402K
	PPB_010 P	欠失変異	c.594delT	p.P198fs
<i>MYH8</i>	PPB_001P	ミスセンス変異	c.A4814G	p.D1605G
	PPB_005P	ミスセンス変異	c.T1475C	p.F492S
<i>PDE2A</i>	PPB_001R	ミスセンス変異	c.G1447C	p.G483R
	PPB_004P	ミスセンス変異	c.T160A	p.S54T
<i>TMX3</i>	PPB_004P	ミスセンス変異	c.C724T	p.L242F
	PPB_007P	ミスセンス変異	c.C8T	p.A3V

SNP アレイによるコピー数異常の解析では、8 番染色体長腕(8q)の増幅、17 番染色体短腕(17p)の欠失、19q13.11 領域の高度増幅が重複して認められた(図 5a, b, c)。17p の欠失は 11 例中 8 例に認められ、すべての欠失領域には *TP53* が含まれていた。17p の欠失が検出された症例のうち 5 例は、*TP53* のホモ変異を認め、*TP53* の両アレル異常が認められた(図 5d)。19q13.11 領域の高度増幅は約 400 kb の微小な領域であり、この範囲に含まれる遺伝子は *LSM14A*、*KIAA0355*、*GPI*、*UBA2*、*PDCD2L* のみであった。これらの遺伝子に対してコーディング領域を Sanger シーケンスにて解析を行ったが、変異は検出されず高度増幅領域の標的は同定されなかった。

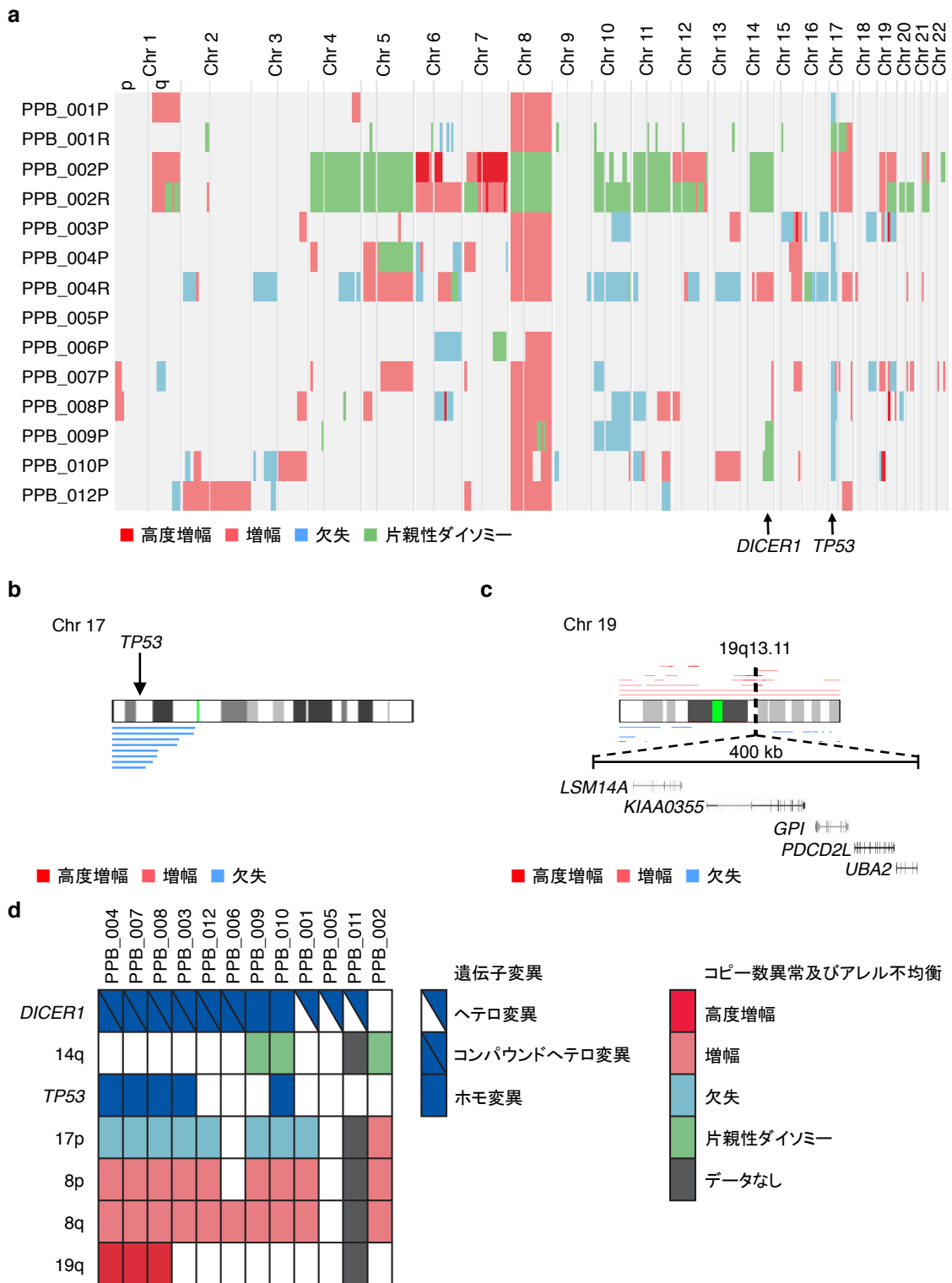


図 5 PPB におけるコピー数異常と *DICER1*・*TP53* 変異

a. 全染色体におけるコピー数異常の全体像、b. 17 番染色体短腕の欠失、c. 19 番染色体長腕における高度増幅領域と領域内に含まれる遺伝子、d. コピー数異常と *DICER1*・*TP53* 変異の関係

2. RMS における解析

エクソーム解析

エクソーム解析によるシーケンスは、20 回以上の深度で標的領域を読めた割合(カバレッジ)が全検体を平均して 88%であり、また腫瘍検体においては平均 119 回、正常検体においては平均 127 回の深度が得られ、十分な深度で解析がなされていることが確認された(図 6a)。検出された 690 個の塩基置換のうち、88%にあたる 604 個が、ディープシーケンスにより体細胞変異として確定された。検体あたりの平均変異数は初発検体で、24.0 個、転移検体で 43.3 個、再発検体で 42.0 個、中央値は初発検体 8 個、転移検体 37 個、再発検体 48 個であった(図 6b)。初発検体と転移・再発検体の変異数に有意差は認められなかった($P = 0.20$)。RMS_001 において極めて多くの変異が検出されたが、DNA 修復遺伝子の一つである *MBD4* 変異(42)を伴っていたことが原因と考えられた。塩基置換は C > T が最も多く、変異の前後 1 塩基も含めたシグネチャーは、その他の多くの腫瘍で認められるシグネチャーと同様の傾向であった(図 6c, d) (43)。検出された変異のうち、3 例以上で重複するものはなく、2 例で重複して認められた遺伝子は 18 個であった(表 4)。TP53、BCOR、KRAS、FGFR4 経路の遺伝子はすでに RMS において異常が知られているものであるが、新規に検出された変異として *ROBO1* 変異、また *FGFR4* 経路に含まれる遺伝子でも新規のものとして、*GABI* と *PTEN* 変異が検出された。

候補遺伝子のターゲットディープシーケンス

以上のエクソーム解析の結果をもとに、エクソーム解析で重複して変異が検出された遺伝子のうち、RMS を含め腫瘍との関連が知られている 7 遺伝子と、

RMS において異常が報告されている 7 遺伝子を候補遺伝子とし、エクソーム解析施行例を含む合計 60 例の RMS において、ターゲットディープシーケンスを行った。解析した 14 遺伝子に合計 56 個の変異が検出された(図 7)。FGFR4 経路の遺伝子変異を合計すると 24 例で認められ、40%と高頻度であった(表 5)。

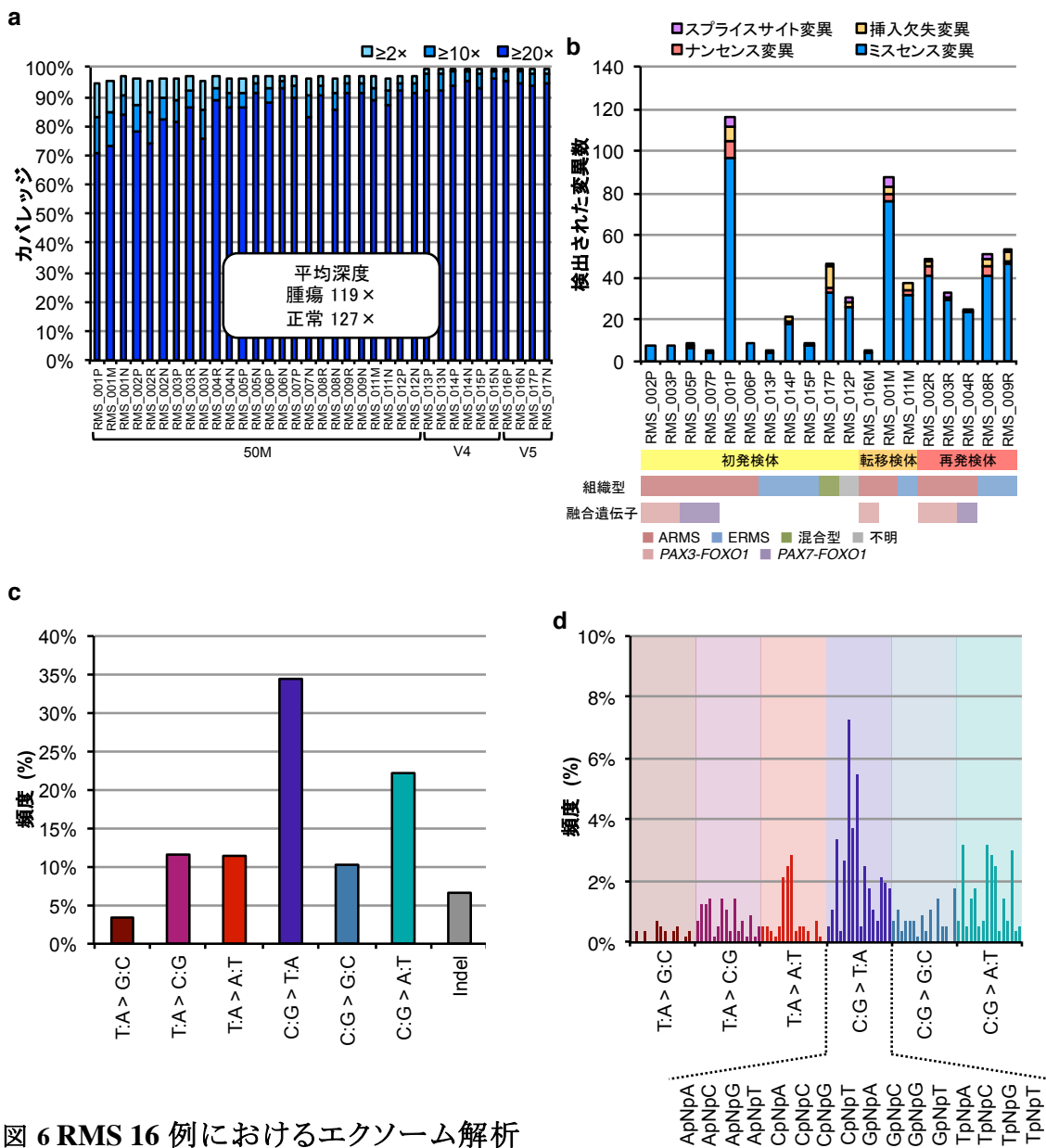


図 6 RMS 16 例におけるエクソーム解析

a. エクソーム解析のカバレッジと深度。グラフ下段にベイトのバージョンを示した。b. エクソーム解析により検出された変異数。グラフ下段に検体の種類、組織型、融合遺伝子を示した。c. 一塩基置換の種類別の頻度。C > T が最も多く観察された。d. RMS における一塩基変異のシグネチャー。変異の前後塩基まで含めて細分化させた一塩基変異の頻度。P, 初発検体; R, 再発検体; N, 正常検体

表 4 エクソーム解析により重複して認められた遺伝子変異

遺伝子	染色体	アミノ酸置換	組織型	Sample ID
<i>TP53</i>	17p	p.G245S	ERMS	RMS_011M
		p.C176G	分類不能型	RMS_012P
<i>GABI</i>	4q	p.S614R	ARMS	RMS_004R
		p.N233I	ARMS	RMS_006P
<i>KRAS</i>	12p	p.K117N	ERMS	RMS_014P
		p.A146T	ERMS	RMS_015P
<i>PTEN</i>	10q	p.G129R	ARMS	RMS_001P
		p.A120P	ERMS	RMS_009R
<i>ARID1A</i>	1p	p.G1847fs	ARMS	RMS_003R
		p.K1007_I1008fs	ARMS	RMS_011M
<i>BCOR</i>	Xp	p.S1243fs	ERMS	RMS_014P
		p.E712fs	混合型	RMS_017P
<i>ROBO1</i>	3p	p.E1113Q	ARMS	RMS_005P
		p.Y777C	ARMS	RMS_007P
<i>AKAP9</i>	7q	p.G2652V	ARMS	RMS_001M
		p.K2673N	ERMS	RMS_009R
<i>DNAH5</i>	5p	p.S2920I	ERMS	RMS_011M
		p.R3096Q, D3271N	ERMS	RMS_008R
<i>FREM2</i>	13q	p.R1515H	混合型	RMS_017P
		p.Q1574L	ERMS	RMS_008R
<i>C15orf2</i>	15q	p.G917A	ARMS	RMS_003P
		p.V1147L	ERMS	RMS_009R
<i>KIF21A</i>	12q	p.E766V	Mixed	RMS_017P
		p.L956P	ERMS	RMS_009R
<i>NEB</i>	2q	p.E637Q	ARMS	RMS_001P
		p.D1595Y	ARMS	RMS_003P
<i>PTPRO</i>	12p	p.R67T	ARMS	RMS_002R
		p.N644S	混合型	RMS_017P
<i>COL5A2</i>	2q	p.G203V	ARMS	RMS_001P
		p.G756S	ARMS	RMS_002P
<i>PXDNL</i>	8q	p.T877M	ARMS	RMS_004R
		p.R1225Q	ARMS	RMS_016M
<i>NLRC5</i>	16q	p.R341W	ARMS	RMS_003P
		p.Q1169H	ARMS	RMS_001P
<i>TTN</i>	2q	p.L18955Q, p.L18955I	ARMS	RMS_001M
		p.G17007A	ARMS	RMS_004R
		p.E5800A	ERMS	RMS_009P
		Q9568K	ARMS	RMS_017P

FGFR4 変異の 6 変異中 5 変異は kinase ドメイン内に含まれ、かつ 4 変異は機能獲得型変異として既知の N535K と V550L であった(図 7a)(44)。*GABI* 変異は 3 変異認められたが、報告のないミスセンス変異であった(図 7b)。*PTPN11* の遺伝子変異は 1 つのみであるが、既知のホットスポット変異の機能獲得型変異であった(図 7c)。*PIK3CA* 変異はその他の腫瘍においても多く報告されているものであり、機能獲得型変異と報告されている(図 7d)(45-47)。*PTEN* 変異はエクソーム

解析でも同定された 2 変異のみであった(図 7e)。RAS 経路の遺伝子変異(*NRAS*、*KRAS*、*HRAS*)は 15 例と多く認められ、これらの変異も既知の活性型変異であった(図 7f-h)。*NF1* の 4 変異中 3 変異は挿入欠失変異による機能喪失変異であった。単一の遺伝子としては最も高頻度であったのは *TP53* で 15% (9/60) に変異が認められた(図 7j)。*FBXW7* は 5% で認められたとの報告があるが(23)、今回の検討では 1 変異のみと頻度は少なかった(図 7k)。また *ARID1A* と *BCOR* においてはターゲットディープシーケンスで変異例が増え、*ARID1A* が 6 例、*BCOR* が 5 例で認められた。*BCOR* 変異はコンパウンドヘテロ変異の症例も 1 例認められた。5 例の *BCOR* 変異と 6 例中 4 例の *ARID1A* 変異は挿入欠失、もしくはナンセンス変異であり、機能喪失が RMS の病態に関与していると想定された(図 7l, m)。*ROBO1* 変異は新たに検出されず、2 例であった(図 7n)。

表 5 RMS 60 例のターゲットディープシーケンスにて検出された遺伝子変異

	全例 (%) n=60	組織型				融合遺伝子				DNA メチル化クラスター				
		ERMS (%) n=35	ARMS (%) n=22	Mixed (%) n=1	NOS (%) n=1	U (%) n=1	FP (%) n=19	FN (%) n=41	E1 (%) n=11	E2 (%) n=11	A1 (%) n=18	A2 (%) n=10	NA (%) n=10	
<i>FGFR4</i> 経路合計	24* (40)	16 (46)	7 (32)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (16)	21 (51)	6 (55)	9 (82)	3 (17)	2 (20)	4 (40)	
<i>FGFR4</i>	5 (8.3)	5 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (12)	0 (0)	4 (36)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	
<i>PTPN11</i>	2 (3.3)	2 (5.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (4.9)	0 (0)	2 (18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<i>GAB1</i>	3 (5.0)	1 (2.9)	2 (9.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.3)	2 (4.9)	0 (0)	0 (0)	2 (11)	0 (0)	1 (10)	
<i>PIK3CA</i>	3 (5.0)	2 (5.7)	1 (4.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.3)	2 (4.9)	0 (0)	2 (18)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	
<i>PTEN</i>	2 (3.3)	1 (2.9)	1 (4.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (4.9)	0 (0)	1 (9.1)	1 (5.6)	0 (0)	0 (0)	
<i>HRAS</i>	1 (1.7)	0 (0)	1 (4.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	
<i>KRAS</i>	2 (3.3)	2 (5.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (4.9)	2 (18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<i>NRAS</i>	7 (12)	5 (14)	2 (9.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.3)	6 (15)	2 (18)	2 (18)	1 (5.6)	0 (0)	2 (20)	
<i>NF1</i>	3 (5.0)	2 (5.7)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (7.3)	1 (9.1)	2 (18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<i>TP53</i>	9 (15)	6 (17)	1 (4.5)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	1 (5.3)	8 (20)	0 (0)	5 (45)	2 (11)	1 (10)	1 (10)	
<i>FBXW7</i>	1 (1.7)	1 (2.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2.4)	0 (0)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<i>BCOR</i>	5 (8.3)	4 (11)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (5.3)	4 (9.8)	3 (27)	1 (9.1)	1 (5.6)	0 (0)	1 (10)	
<i>ARID1A</i>	6 (10)	4 (11)	2 (9.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.3)	5 (12)	0 (0)	3 (27)	1 (5.6)	0 (0)	2 (20)	
<i>ROBO1</i>	2 (3.3)	0 (0)	2 (9.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.6)	0 (0)	1 (10)	

コピー数異常解析

SNP アレイにより同定されたコピー数異常の領域(図 8)を、GISTIC 解析(31)にて有意に変動している領域を抽出した(図 9a-f)。ARMS において既知の融合遺伝子に関わる *PAX3*、*PAX7*、*FOXO1* は過去に報告のある通り高度増幅が認められた(図 9b, 9d, 9f)(17, 48)。頻度の高いコピー数異常として *MYNC* が含まれる 2p24.4 領域の高度増幅が 7.9%(図 9b)、*CDKN2A/B* が含まれる 9p21 領域の欠失が 20%(図 9g)、*TP53* が含まれる 17p13.2 欠失が 17%(図 9h)で抽出された。*FGFR4* 経路に関連するコピー数異常として *FRS2* が含まれる 12q15 の高度増幅が 12%で認められた(図 9e)。以上で認められた遺伝子変異とコピー数異常を統合すると、*FGFR4* から下流の *PIK3CA*、*RAS* に至る経路に重複して異常が認められたことがわかる(図 10a)。また、細胞周期やアポトーシスに関連する *TP53*、*CDKN2A* の異常も高頻度であった。GISTIC 解析では有意な領域には含まれていないものの、細胞周期に関連する *MDM2* が含まれる 12q15 領域の高度増幅が 10%、*CDK4* が含まれる 12q14 領域の高度増幅が 8.3%で認められた(図 10b)。

トランスクリプトーム解析

ERMS 5 例と ARMS 3 例に対し、トランスクリプトーム解析による融合遺伝子の検出を行った。合計 12 個の融合遺伝子が確定されたが、インフレームの融合遺伝子はわずか 2 個であり、ARMS 症例の *PAX3-FOXO1* 融合遺伝子であった。ERMS において *NDS1-ZNF346* 融合遺伝子が 1 例に検出されたが、報告されているものは in-frame であるものの、本症例では out of frame であり、病態への影響は不明であった(25)。

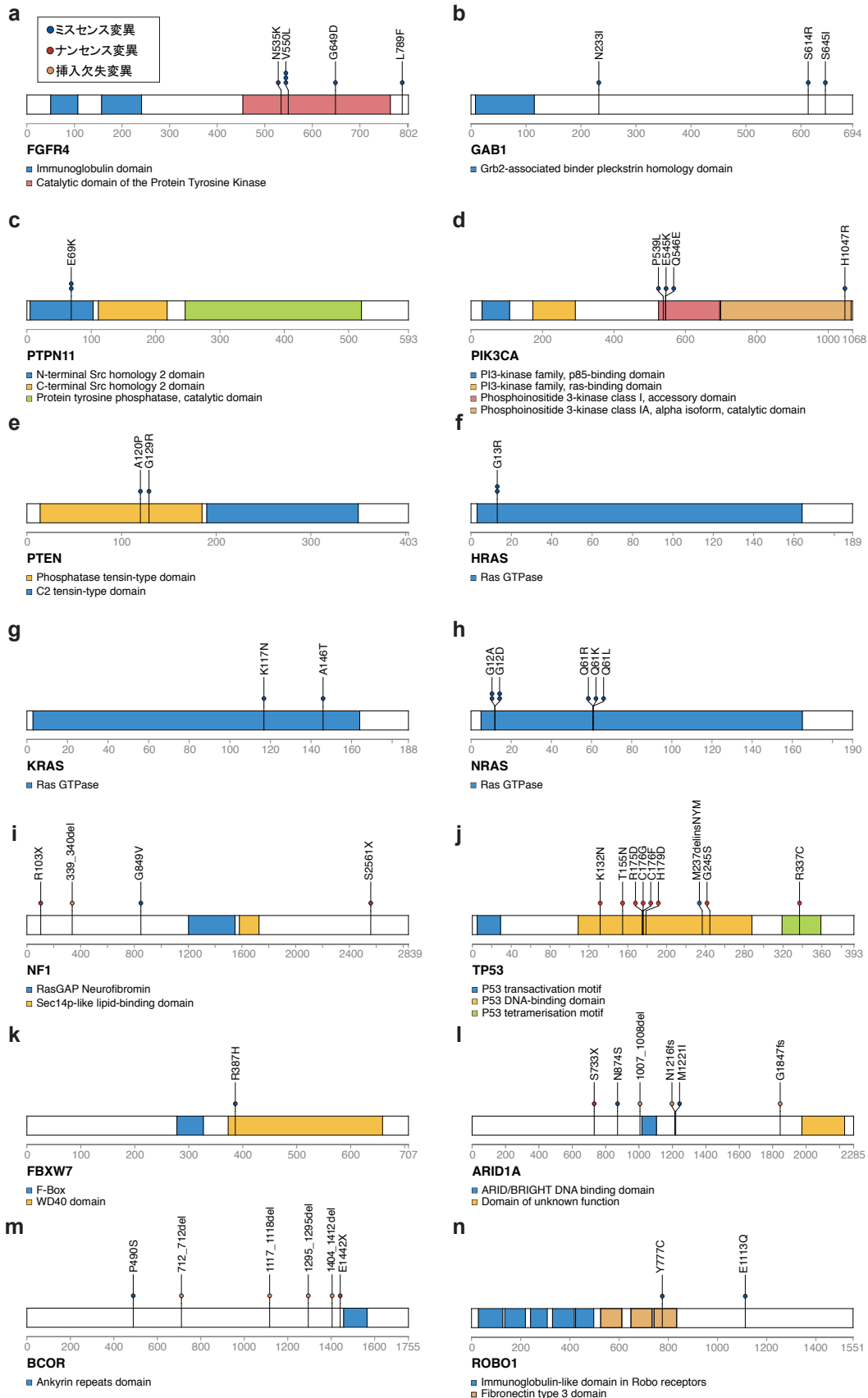


図 7-14 遺伝子のターゲットディープシーケンスで認められた変異
a-h. ミスセンス変異を青、ナンセンス変異を赤、挿入欠失変異を黄色で示す。

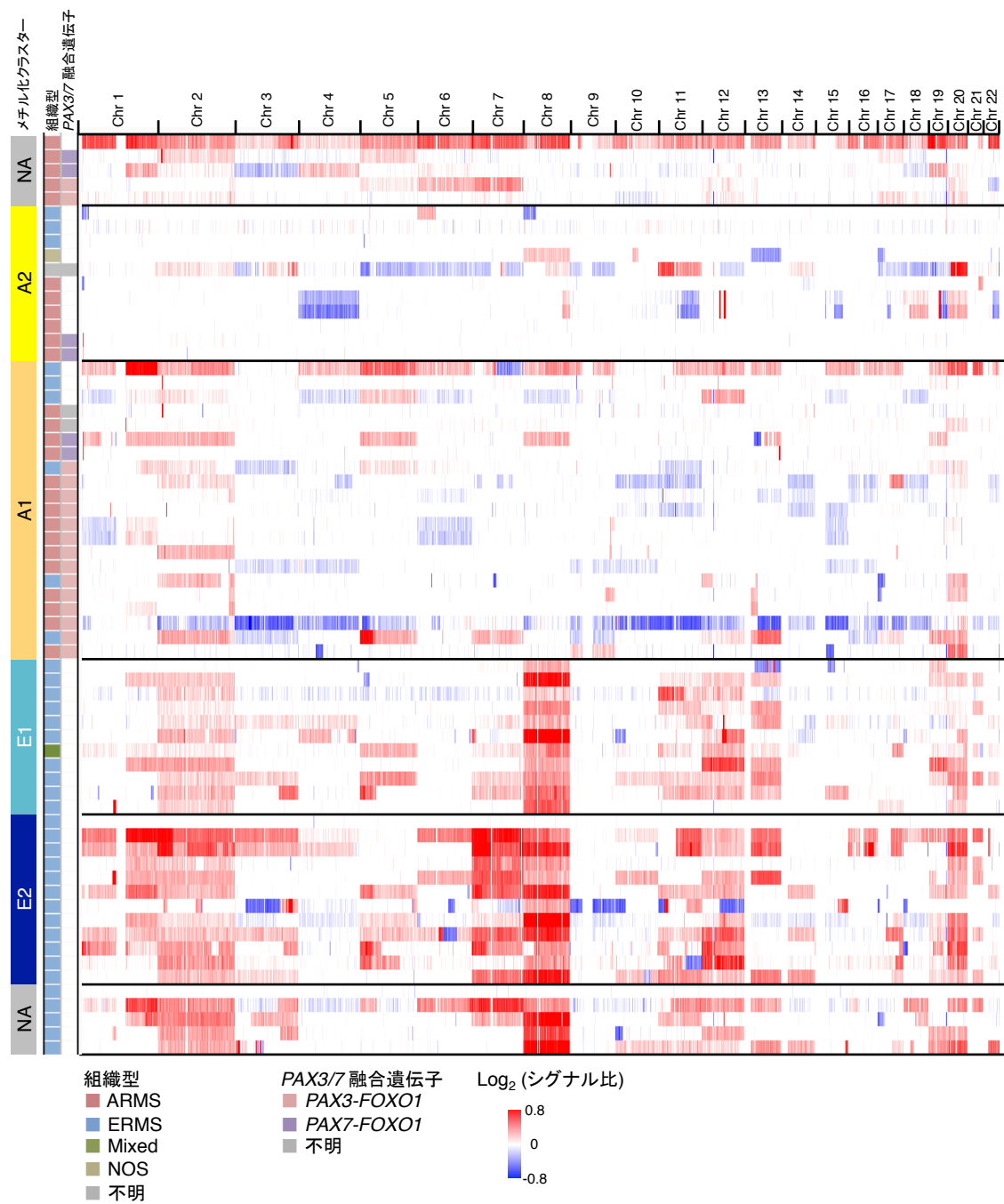


図 8 SNP アレイにより同定されたコピー数異常の全体像

SNP アレイにより得られたシグナル値を \log_2 に変換し、コピー数の増幅を赤、欠失を青で示した。

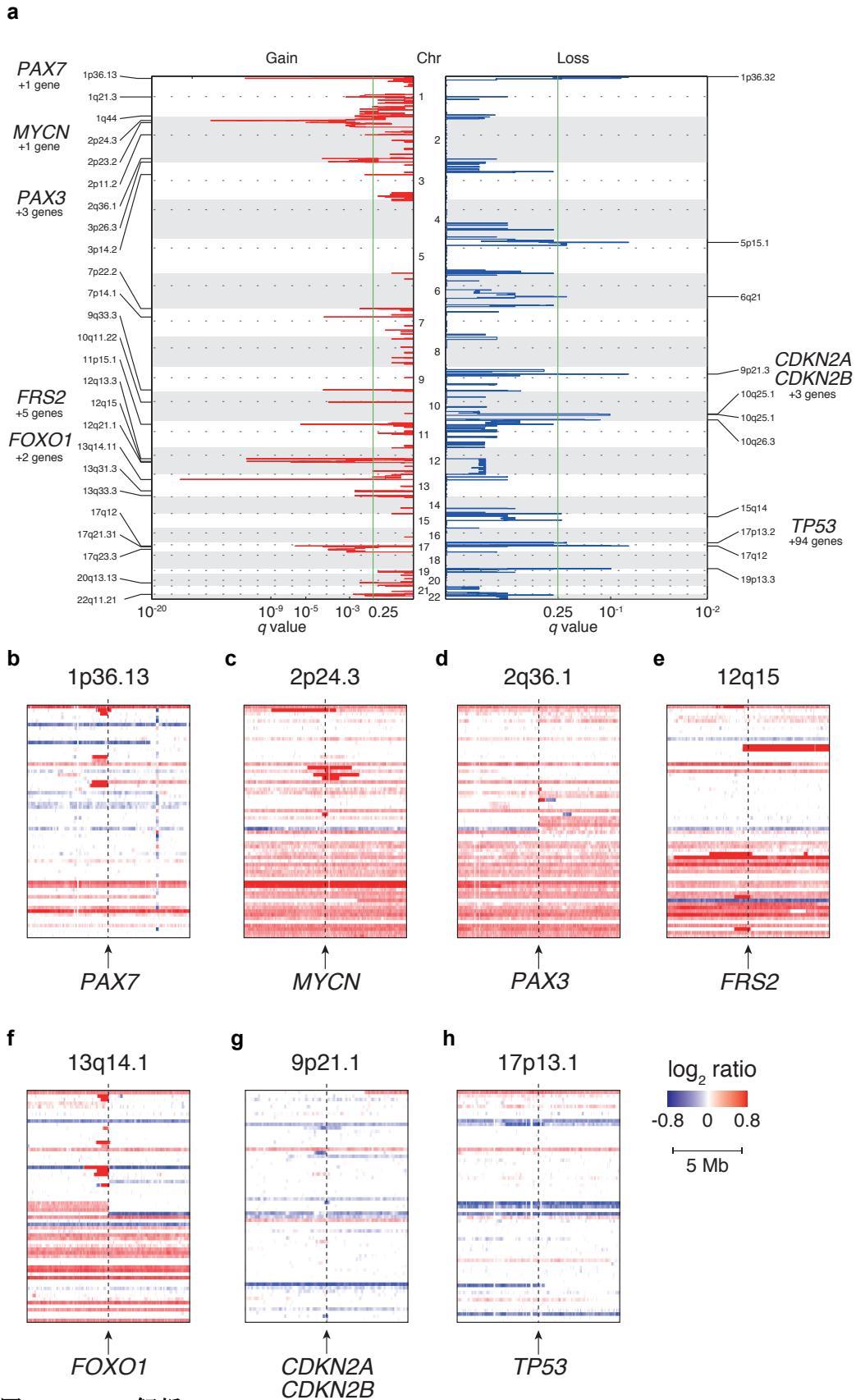


図 9 GISTIC 解析

a. GISTIC 解析により抽出された有意にコピー数異常を認める領域の全体像
b-h. GISTICで抽出された領域に含まれる、RMSに関連のある遺伝子領域のコピー数ヒートマップ

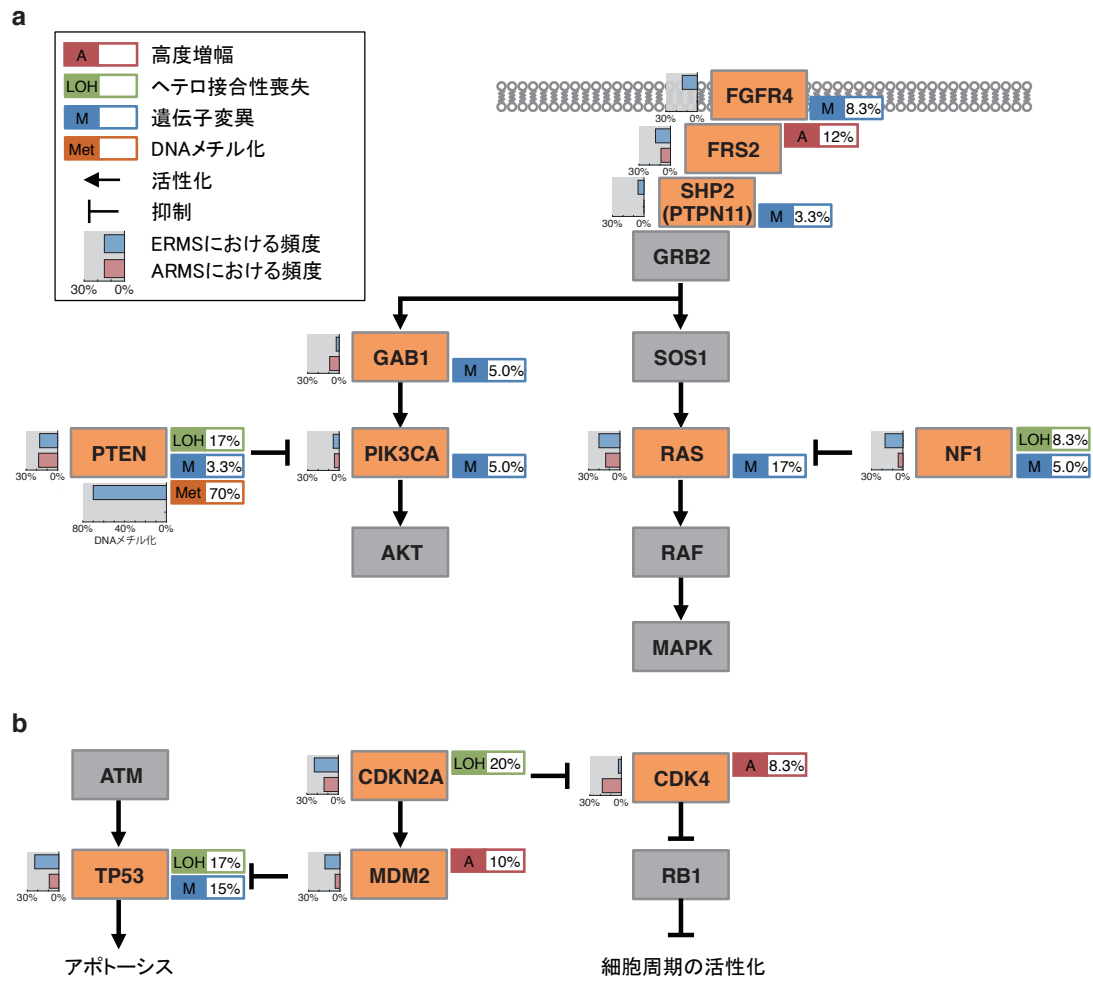


図 10 *FGFR4* 経路と細胞周期に関連する遺伝子変異とコピー数異常
 高度増幅、ヘテロ接合性喪失(LOH)、遺伝子変異、DNAメチル化をそれぞれの枠に頻度とともに提示した。異常が認められた遺伝子の背景をオレンジで示した。また主な組織型である ARMS と ERMS において同定された頻度をそれぞれの遺伝子の左側に提示した。*PTEN* のみは組織型別の DNA メチル化の頻度も提示した。
 a. *FGFR4* 経路とその下流において同定された異常。 b. 細胞周期に関連する遺伝子において同定された異常。

DNA メチル化アレイ解析

さらに RMS における分子遺伝学的病態を探求するため、DNA メチル化アレイを 50 例で施行した。階層的クラスタリングにより、50 例を 4 群に分類した(図

11)。4群のうち、2つの群(E1、E2)は病理組織分類である ERMS とほぼ一致しており、ARMS は含まれず、1例の混合型を除く、96%が ERMS であった。混合型 RMS は ARMS と ERMS の病理所見が混在する病型であり、その点から E1/E2 群はすべて ERMS の所見を有していると言える。また残りの2群(A1、A2)には *PAX3/7-FOXO1* 融合遺伝子陽性の ARMS が全て含まれたが、9例の ERMS 症例も含まれていた。しかし、この9例のうち3例は *PAX3-FOXO1* 融合遺伝子が陽性である ERMS であった。*PAX3/7-FOXO1* 融合遺伝子は ARMS で認められる異常として知られているため病理標本の再検討を考慮したが、診断時の病理標本は得られず評価できなかった。E1/E2 群と A1/A2 群を比較し、E1/E2 群で有意に高メチル化が生じている遺伝子が29個抽出された(図12a)。

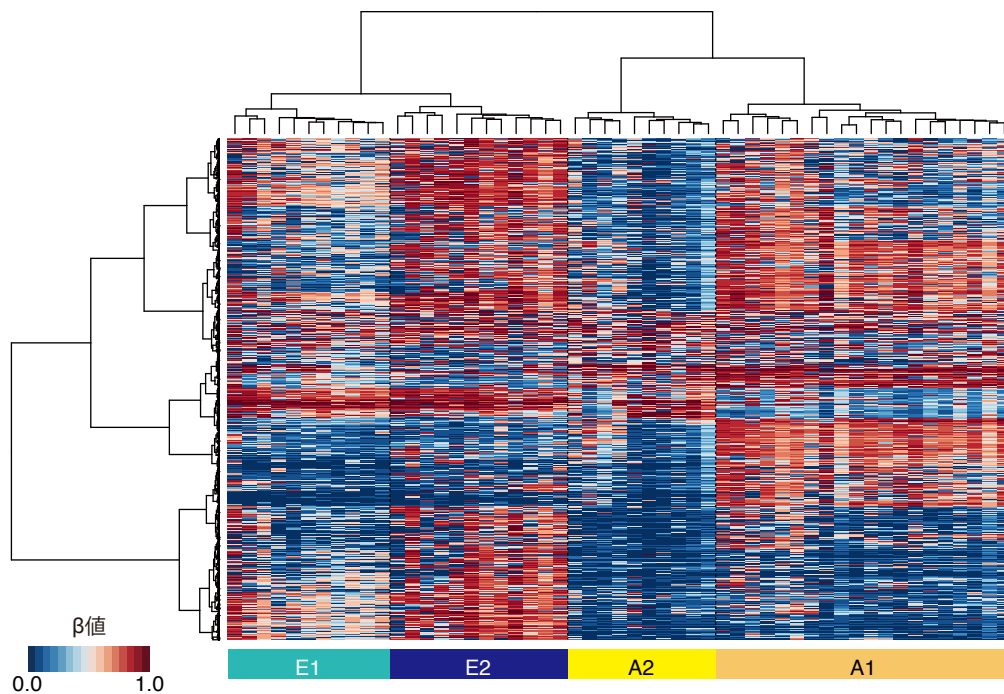


図 11 DNA メチル化アレイによる階層的クラスタリング

50例のRMSに対し、階層的クラスタリングを施行し、A1、A2、E1、E2の4群に分けた。横にサンプル、縦に抽出した差の大きいプローブを並べ、 β 値をヒートマップで示した。

一方、A1/A2 群で有意に高メチル化が生じている遺伝子は 10 個認められた(図 12a)。これらの抽出された遺伝子のうち、E1/E2 群で高メチル化が生じていたプローブに、*FGFR4* 経路に含まれる *PTEN* のプローブが複数検出された(図 12a,b)。*PTEN* の高メチル化は E1/E2 群において 91% (20/22) と高頻度に認められ、A1/A2 群ではわずか 7% (2/28) であった。RT-PCR を行い、*PTEN* の高メチル化が生じている症例では有意に *PTEN* の発現が低下していることを確認した(図 12d)。A1/A2 群で高メチル化が認められた遺伝子に *GATA4* が含まれ、過去に RMS における *GATA4* の高メチル化は報告されているが(24)、*GATA4* の発現は心臓、精巣、卵巣などに限られており、RMS における *GATA4* 高メチル化の意義は不明である。同様に E1 群と E2 群、A1 群と A2 群での比較を行い、DNA メチル化に有意に差のある遺伝子をそれぞれ 25 遺伝子ずつ抽出した(図 13a, 13b)。E1 群と E2 群の比較では、RMS において既知の DNA メチル化異常として、*P4HTM* が E2 群に含まれていた(24)。しかし A1/A2 群の一部でも *P4HTM* の高メチル化は認められ、E2 群に特異的な高メチル化異常とは言えず、単一遺伝子のメチル化異常として、E1 群と E2 群を識別するは困難であった。そのため、各群を比較して抽出されたプローブのリストを用い(図 13c, 13d)、IPA によるパスウェイ解析を行った。いずれの群間の比較でも、パスウェイ解析としては複数の遺伝子を含むパスウェイは抽出されなかった。E1 群と E2 群の比較では、筋の分化に関連する Skeletal and Muscular System Development and Function, Tissue Development が機能アノテーション解析で抽出され($P = 4.1 \times 10^{-4}$)、*HES5*、*HOXC4*、*WNT5A* の 3 遺伝子が含まれていた。また、A1 群と A2 群の比較でも、機能アノテーションによる解析において、abnormal morphology of muscle という筋組織の形態に関する機能アノテーション

セットが抽出され($P = 6.2 \times 10^{-4}$)、*DYSF*、*ELN*、*OTX2*、*TH* の 4 遺伝子が含まれていた。

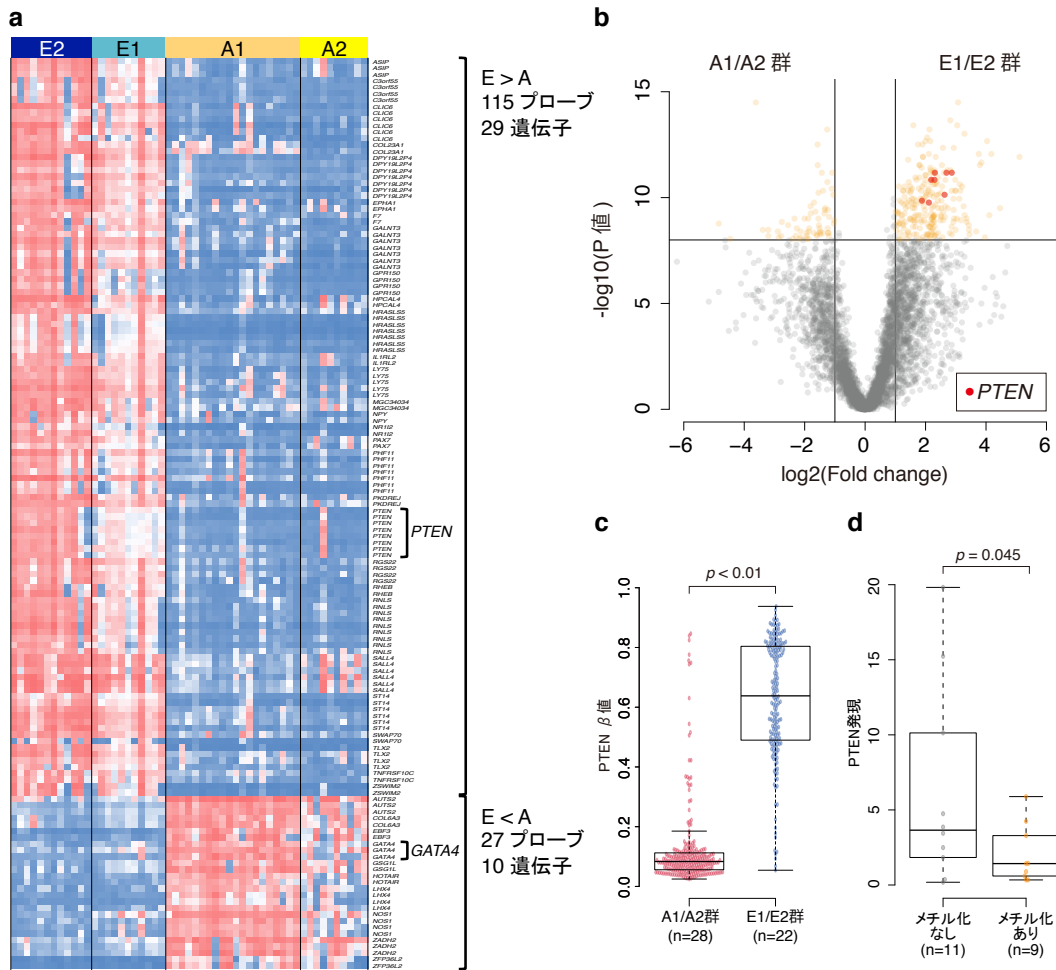


図 12 A1/A2 群と E1/E2 群の比較

a, b A1/A2 群と E1/E2 群を比較し、よりメチル化の差が大きいプローブを抽出を行った。 β 値の fold change と Wicoxon 順位和検定による P 値で volcano plot を描き、fold change が 2 倍以上、 $-\log_{10}(P \text{ 値})$ が 8 以上のものをオレンジで色分けをした。そのうち、1 つの遺伝子に複数のプローブが含まれた β 値をヒートマップで示し(a)、*PTEN* のプローブは赤で示した(b)。**c.** A1/A2 群と E1/E2 群で全サンプルの *PTEN* の β 値(8 プローブ)を比較すると、E1/E2 群で *PTEN* β 値は極めて高い値の分布を示し、有意な差が認められた。**d.** 定量 PCR により *PTEN* のメチル化のある群とない群で *PTEN* の発現量を比較し、有意にメチル化のある群で *PTEN* 発現量が低下していた。*PTEN* 発現量は *GAPDH* 発現量との比で表した。

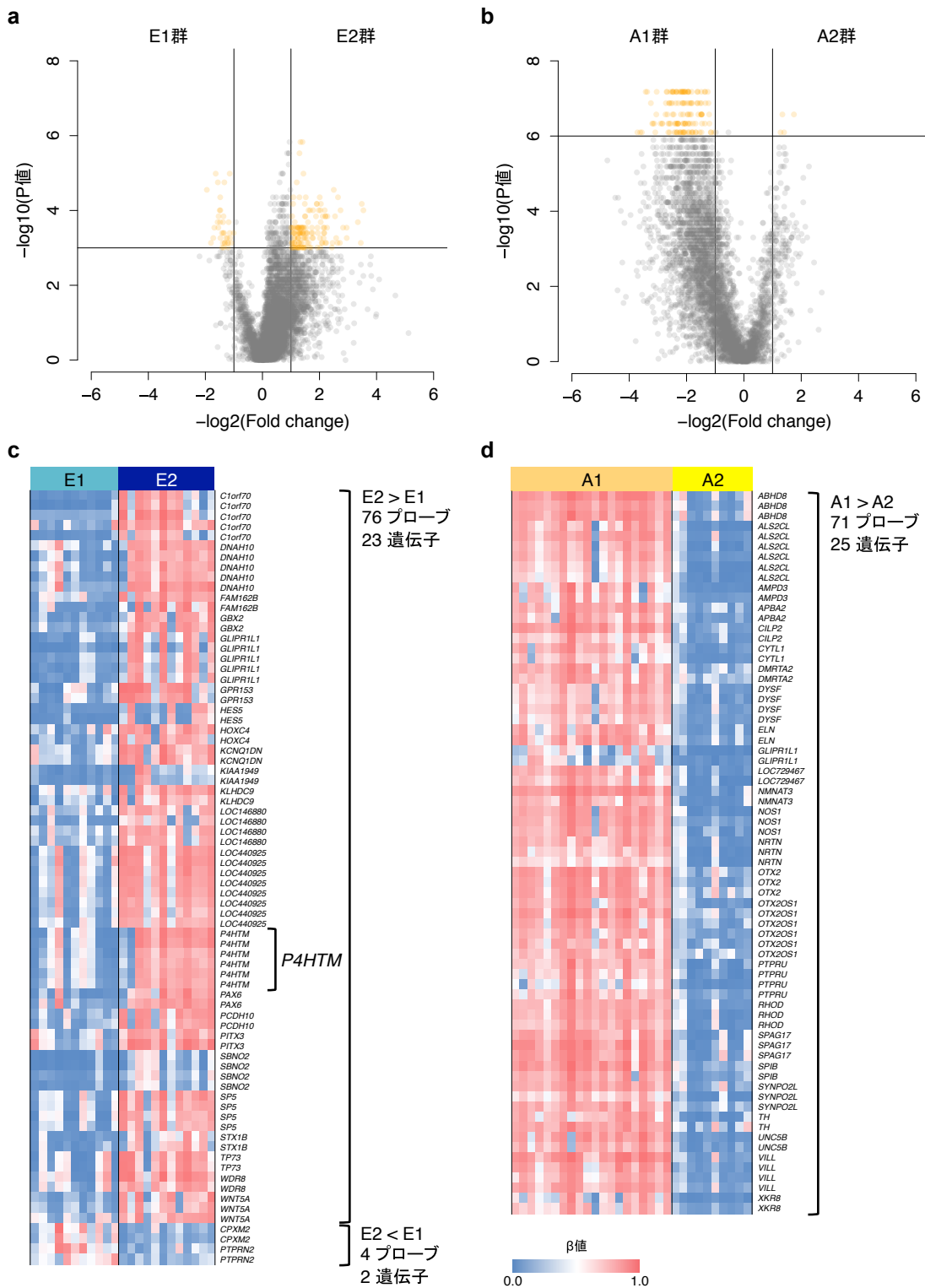


図 13 各群間で有意にメチル化の差を認めたプローブ

a, b E1 群と E2 群間(a)、と A1 群と A2 群(b)において、volcano plot を用い、有意に DNA メチル化の差があるプローブを抽出した。E1/E2 の比較では $-\log_{10}(P\text{値})$ が 3 以上、A1/A2 の比較では $-\log_{10}(P\text{値})$ が 6 以上かつ Fold change が 2 倍以上のプローブをオレンジで示した。**c, d** さらに単一の遺伝子内で 2 つ以上のプローブが含まれたものをヒートマップで図示した。これによりそれぞれ 25 遺伝子に絞り込みを行った。

DNA メチル化プロファイルによる分類と遺伝子変異、コピー数異常

次に DNA メチル化プロファイルにより分類された 4 群と同定された遺伝子変異、コピー数異常の関連を検討した(図 14)。コピー数異常として E1/E2 群は A1/A2 群に比べ、染色体 2 番、8 番、12 番の増幅が有意に多く認められた($P = 4.6 \times 10^{-4}$ 、 $P = 3.7 \times 10^{-7}$ 、 $P = 4.6 \times 10^{-4}$)。FGFR4 経路に関連する遺伝子変異は、A1/A2 群に比べ、E1/E2 群に有意に多く ($P = 4.6 \times 10^{-4}$)、特に E2 群に集中して認められた (E1 群 55%、E2 群 82%、A1/A2 群 18%)。そのうち、FGFR4、PTPN11、PIK3CA は E1 群に比し、E2 群で有意に多く認められた ($P = 1.0 \times 10^{-3}$)。また E2 群は E1 群と比べ、TP53 変異も有意に多く検出された (E1 群 0%、E2 群 46%、 $P = 0.035$)。それに対し、RAS 関連の変異(HRAS、NRAS、KRAS)は E1 群 4 例、E2 群 2 例とどちらの群にも認められた。A1/A2 群に有意に多い異常として、細胞周期に関連する MYCN、CDK4、CDKN2A/B におけるコピー数異常が見いだされ ($P = 0.016$)、A1/A2 群の特徴的な異常と考えられた。11p 領域の LOH は E1/E2 群に多く認められたが (64%)、A1/A2 群でも認め (43%)、有意差はなかった ($P = 0.17$)。

最後に、4 群と予後との関連を比較した(図 15a)。log-rank 検定により、E1 群が予後良好として、有意差が認められた ($P = 0.045$)。ARMS に比し ERMS は予後がよいことが知られているため、ERMS が集中している E1 群と E2 群で比較を行った。さらに E2 群においては TP53 変異や FGFR4 経路の変異 (FGFR4、PTPN11、PIK3CA、PTEN) が有意に多く認められたため、TP53 変異、FGFR4 経路の遺伝子変異の有無で予後を再検討した(図 15b, c, d)。

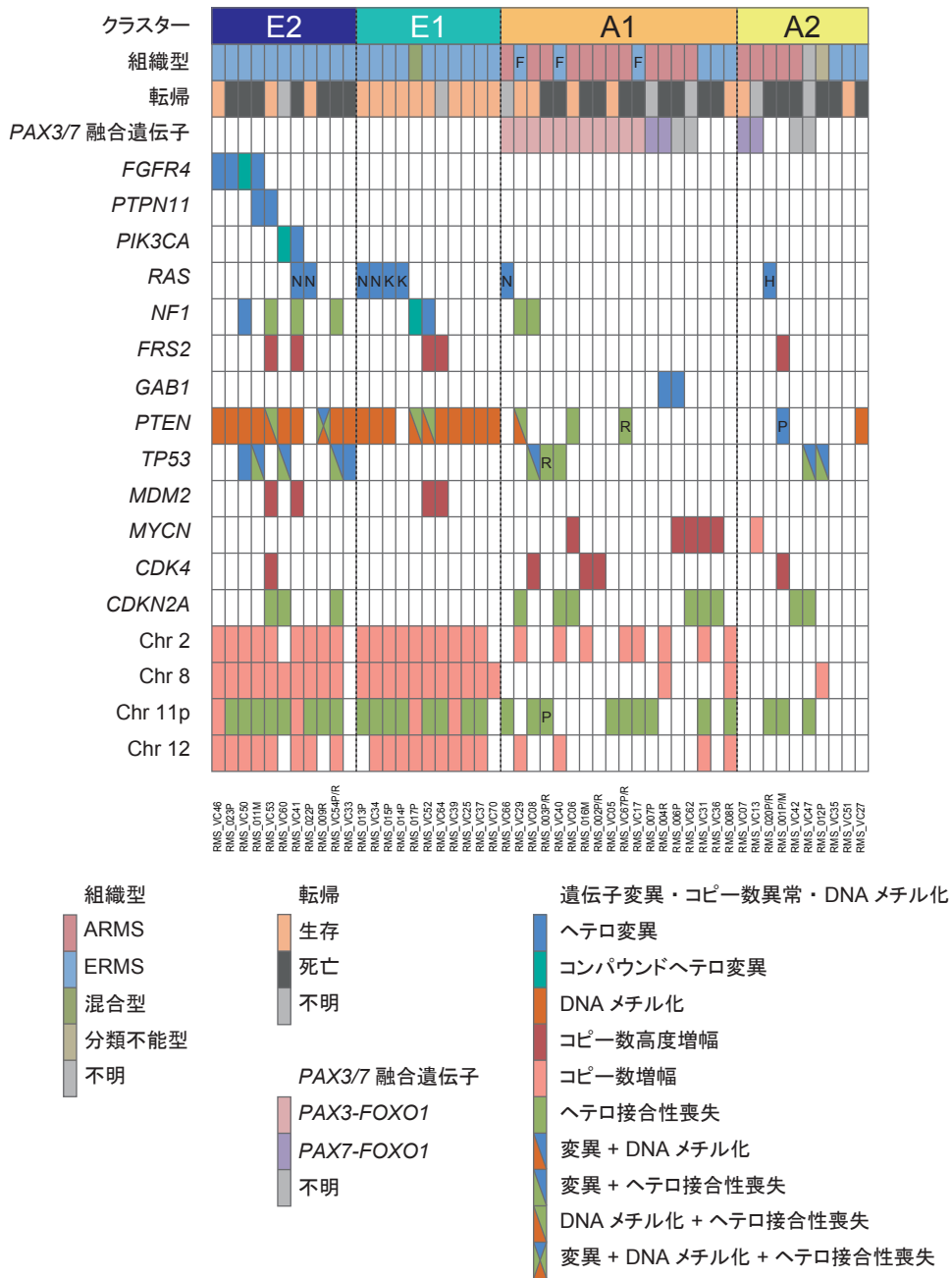


図 14 DNA メチル化プロファイルによる分類と遺伝子変異・コピー数異常の全体像

DNA メチル化アレイによって分けられた 4 群とターゲットディープシーケンスで同定された遺伝子変異、SNP アレイにより検出されたコピー数異常の関連を示した。

F, *PAX3-FOXO1* 融合遺伝子陽性; H, *HRAS*; K, *KRAS*; N, *NRAS*; P, 初発検体のみで検出; R, 再発検体のみで検出

その結果、*FGFR4* 経路の遺伝子変異の有無は予後と関連はなく、*TP53* 変異と E1/E2 群の比較で予後に有意な差が認められた(P = 0.0029、P = 0.0048)。しかし *TP53* 変異の有無より、E1/E2 群の比較の方が顕著に予後の違いを反映しており、より有用な指標であると考えられた。

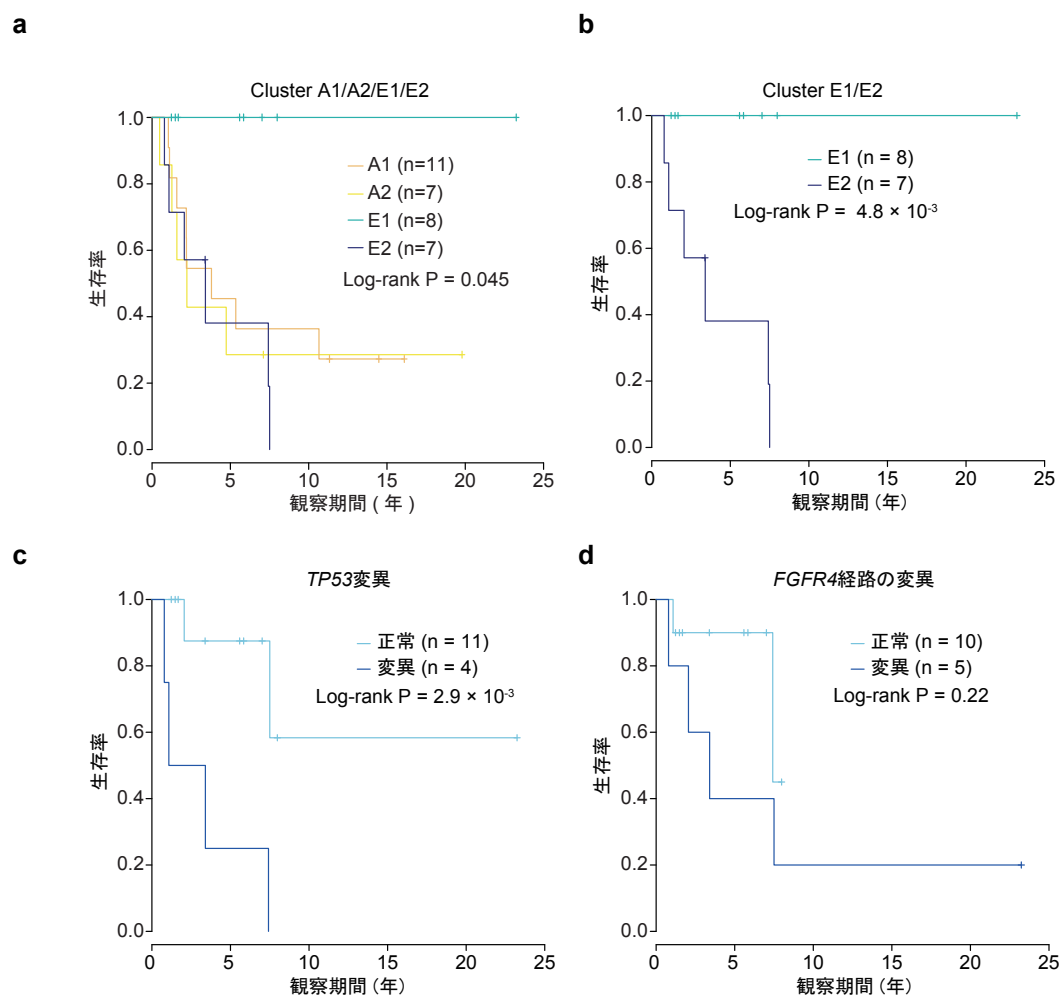


図 15 メチル化クラスター、遺伝子変異と予後

メチル化によるクラスター4群(a)、2群(b)、*TP53* 変異の有無(c)、*FGFR4* 経路の遺伝子変異の有無(d)による Kaplan-Meier 曲線を示す。(c)(d)は E1/E2 群の症例のみで比較を行った。*FGFR4* 経路の変異の有無と予後は関連しないが、*TP53* 変異、メチル化クラスターと関連が認められた。*FGFR4* 経路の遺伝子には、*FGFR4*、*PTPN11*、*PTEN*、*PIK3CA* の変異が含まれる。

考察

1. PPB

PPB に対する本研究において得られた知見で、最も特筆すべきものは高頻度に認められた *DICER1* の両アレル異常と *DICER1* RNase IIIb ドメインにおけるミスセンス変異のホットスポットである。我々の検体においては *DICER1* 変異を認めた 11 例中 8 例の 73%において *DICER1* の両アレル異常が同定され、8 例全例に RNase IIIb ドメイン内のミスセンス変異を認め、正常検体が得られた症例ではすべて体細胞変異であることが確認された。この結果は、家族性 PPB や *DICER1* 症候群における *DICER1* のヘテロ変異が認められるという、過去の報告とは対照的であった(5,6)。報告されていた *DICER1* 変異は 2 例を除き、すべてがナンセンス変異もしくは挿入欠失変異であり、ハプロ不全が原因であると考えられていた。本研究における *DICER1* 両アレル変異の頻度が高い結果と異なる原因として、本研究の対象は家族歴のない症例であったことがあげられる。家族性 PPB の浸透率は低いと言われ、生殖細胞の *DICER1* 変異を有していても腫瘍性疾患を発症しない場合もあり、*DICER1* のハプロ不全のみでは PPB 発症のリスクは高いと言えない可能性がある。本研究で対象とした PPB は家族性 PPB を疑う家族歴はなく、家系の検体は解析することができていないため推測ではあるが、本研究の *DICER1* コンパウンドヘテロ変異の症例は *de novo* の生殖細胞変異である可能性が高い。本研究で対象とした散发性 PPB では *DICER1* のヘテロ変異よりも両アレル変異の頻度が高く、両アレル異常となることがより PPB の発症リスクを高めていると考えられる。

興味深いことに、近年報告された非上皮性卵巣腫瘍であるセルトリ・ライディッヒ細胞腫における *DICER1* 変異では、RNase IIIb ドメイン内のミスセンス変異が 43 例中 26 例に認められており、生殖細胞におけるナンセンス変異もしくは挿入欠失変異を伴ったコンパウンドヘテロ変異の症例はわずか 4 例であった(8)。*DICER1* の完全な機能喪失を来す、ナンセンス変異もしくは挿入欠失変異による両アレル異常はこれまで報告がなく、細胞の生存には *DICER1* が必須であることが想定され、ハプロ不全のみではなく、*DICER1* の RNase IIIb ドメイン内のミスセンス変異により、極めて特定の領域の機能に異常を持つことが腫瘍細胞のクローン選択に必要であったと考えられる。RNase IIIb ドメインに変異が集中していた原因としては、PPB 以外の腫瘍でも同ドメインの変異が報告されている通り、このドメインのミスセンス変異により異常な miRNA プロファイルになることが腫瘍発生に関連していると考えられる。つまり RNase IIIb ドメインの変異は PPB だけの特徴ではなく、特に肺組織で体細胞変異としてミスセンス変異が加わった場合 PPB となり、その他卵巣や腎臓など *DICER1* が関連する腫瘍の組織に RNase IIIb ドメイン内のミスセンス変異が入れば、それぞれの腫瘍が発生すると推測される。近年、別の研究グループにおいても PPB に対するエクソーム解析の報告がなされ、*DICER1* の両アレル異常と、RNase IIIb ドメイン内のミスセンス変異のホットスポットが認められる結果が示され、より多数の症例において我々の結果の再現性が確認された(49)。また同報告においても、*DICER1* 変異を有さない PPB 症例も示されており、*DICER1* のコーディング領域以外の異常の存在、もしくは *DICER1* 以外の異常による病態も想定される。同様に、本研究におけるヘテロ変異の 3 例に関しても、散発性 PPB においては両

アレル異常の頻度が高かったことを踏まえると、今回の解析では検出できていない *DICER1* 異常が存在する可能性もあると考えられる。

DICER1 は miRNA の前駆体である pre-miRNA を切断し、成熟 miRNA を産生を担っており、RNase IIIa ドメインが 3p 側を、RNase IIIb ドメインが 5p 側の pre-miRNA を切断している(7)。RNase IIIb ドメイン内には反応を触媒する金属イオン結合部位が 4 つ存在し(E1705、D1709、D1810、E1813)、これらはセルトリ・ライディッヒ細胞腫におけるミスセンス変異のホットスポットと一致し、RNase IIIb ドメインの活性が低下していることが確認されている(8)。本研究においては金属イオン結合部位に近接する G1809 に 4 つのミスセンス変異が検出され、PPB におけるホットスポットであると考えられた。今回施行した miRNA シーケンスにより、セルトリ・ライディッヒ細胞腫のホットスポットである D1810Y 変異同様に、G1809R 変異においても劇的な 5p-miRNA の産生低下が示された。Anglesio らの報告(50)においては 3p-miRNA の発現低下は示されていないが、本研究においては図 4b に示した通り 3p-miRNA の産生は増加しており、Gutan らの報告(51)でも同様の結果が示されている。これは 5p-miRNA の産生低下を代償するために *DICER1* を活性化する機構が存在している可能性が示唆される。しかしながら、PPB やその他の *DICER1* 異常を伴う腫瘍においても、miRNA 全体の産生異常がどのように腫瘍発生に関与しているかは解明されていない。

コピー数異常としては 8q の増幅が最も高頻度に認められ、既知の報告に一致していたが(52)、8q に位置する遺伝子変異で重複して認められるものはなく、エクソーム解析でも標的遺伝子は同定されなかった。

DICER1 変異の次に多く認められた異常は *TP53* 変異であり、*TP53* 変異を持つ症例は 17p の欠失を伴っていた(図 5d)。Pugh らの報告においても PPB のセカンドヒットは *TP53* であると報告している(49)。*TP53* 変異のアレル頻度は 3 例においては 0.89 (PPB_003P)、0.96 (PPB_004P)、0.92 (PPB_004R)、0.74 (PPB_007P)であった。PPB_004 においては再発時検体もディープシーケンスを行っているが、初発検体と再発検体で異なる *TP53* 変異が検出され、治療により初発時の *TP53* 変異クローンが消失後に、残存クローンに新たな *TP53* 変異が加わり、再発時のメジャークローンとなったことが推測される。PPB_007P の値はやや低いが、フレームシフト変異であり、ディープシーケンスでもアレル頻度はやや不正確認になることが影響していると考えられる。残り 2 例は 0.47 (PPB_008P)、0.60 (PPB_010P)とやや低く、一部のクローンが *TP53* 変異を有していたものと考えられる。*DICER1* と *TP53* の関連として、野生型 *TP53* 蛋白は miRNA 産生を増加させるが、変異体 *TP53* 蛋白は pre-miRNA と成熟 miRNA の産生を低下するとされる報告や(53)、*TP53* が let-7 などの miRNA を介し、*DICER1* の発現を調整しているという報告がある(54)。また膵癌の細胞株において *DICER1* の発現をノックアウトすると、*TP53* 発現が上昇することが示されており、*DICER1* と *TP53* 間の制御回路の存在が示唆され(55)、PPB においても重要な役割をもつことが想定される。

2. RMS

本研究では既に報告されていた *FGFR4* 経路の遺伝子に加え(23)、新たに同経路の *PTEN*、*GAB1* と *ROBO1* に重複して変異が検出された。*GAB1* を除き、*FGFR4* 経路の関連遺伝子は ERMS に多く認められ、ERSM の病態において重要な異常

であると考えられた。検出された *PTEN* 変異 2 例のうち(図 7e)、1 例ミスセンス変異が認められたが(G129R)、この変異はその他の腫瘍でも報告されているミスセンス変異で、*PTEN* の機能喪失を来すことが報告されており(56, 57)、*RMS* においても病態に関与していることが推定される。もう 1 例の A120P 変異は過去に報告はないものの、*PTEN* が位置する 10q 領域の片親性ダイソミーを生じており、野生型 *PTEN* が存在しないため、機能異常をきたさない SNP であるよりも腫瘍の病態に関連する変異であると推測された。*GABI* 変異と *ROBO1* 変異に関してはいくつか腫瘍での報告があるが(58-60)、*RMS* の病態への関与は不明である。Kohsaka らは *MYOD1* 変異が *ERMS* の 10% に認められたと報告しているが(61)、本研究でのエクソーム解析では *MYOD1* 変異は検出されなかった。これは Kohsaka らの報告では成人例の解析を主な対照としており、*MYOD1* 変異陽性の小児例は 10 例中 3 例であり(61)、母集団の年齢が異なっていることが影響しているものと考えられた。

トランスクリプトーム解析では、主に *ERMS* における新たな融合遺伝子を探索する目的で施行したが、重複して融合遺伝子を認めることはなかった。Shern からも *ERMS* に対し、全ゲノムシーケンスを施行しているが、重複した融合遺伝子は同定されず(23)、*ARMS* とは異なり *ERMS* において頻度の高い融合遺伝子は関与していないと想定される。

本研究における最も強調すべき知見は、新たな病型分類と言える DNA メチル化プロファイルによる分類が *RMS* における組織型、遺伝子変異、臨床的な特徴と関連が示され、*RMS* のゲノム・エピゲノムの全体像が明らかとなった点である。特にこれまで 1 つの病型とされていた *ERMS* から予後不良の群(E2 群)が抽

出され、ERMS を DNA メチル化プロファイルから新たに 2 群に分けることが可能となった。E1 群と E2 群を区別する、メチル化プロファイルの異なる遺伝子として 25 遺伝子を抽出した(図 13a, c)。このうち、*P4HTM* は RMS においてプロモーター領域の高メチル化が報告されている(24)。*P4HTM* は低酸素誘導因子である HIF1 α の消化に関わっており、同報告においては、10 例中 9 例(ARMS 5 例、ERMS 4 例)で *P4HTM* のプロモーター領域の高メチル化と、*P4HTM* 発現の低下を認めたとしている。しかし、*P4HTM* の高メチル化は E2 群のみではなく、A1/A2 群の一部でも認められ、また Mahoney の報告でも ARMS において高メチル化が確認されているように、E2 群に特異的に認められる現象ではないと考えられた。抽出した 25 遺伝子から IPA による解析で抽出された機能アノテーション”Skeletal and Muscular System Development and Function, Tissue Development”に含まれた 3 遺伝子(*HES5*、*HOXC4*、*WNT5A*)のうち、*WNT5A* は Wnt シグナルの中でも、 β カテニンに非依存的な非古典経路の中心的な役割を持つ分子である。急性巨赤芽球性白血病、大腸癌、乳癌、卵巣癌などで腫瘍抑制因子として機能していることが報告されており(62-65)、RMS においても高メチル化により発現低下を来すことで病態に関与していることも考えられる。またこれらの抽出された遺伝子の免疫染色を行うことで、病理学的に E1 群と E2 群を区別することができる可能性もあり、今後の検討が必要である。

E2 群においては *FGFR4* 経路の遺伝子変異が多く、同経路の阻害剤を含む新規もしくは強化した治療戦略が望まれる。*FGFR* 阻害剤はさまざまな固形腫瘍で試みられているが、*FGFR4* に選択的な阻害剤は未だ存在せず、多くは *FGFR1-3* を含む汎 *FGFR* 阻害剤であり、*FGFR4* への阻害効果は不十分とされる(66, 67)。

近年、チロシンキナーゼ阻害剤であるポナチニブが *FGFR4* の阻害剤としても用いられる可能性が報告されており、*FGFR4* 活性型変異を持つ RMS のマウスモデルにおいて抗腫瘍効果が示されている(68)。また、新たな選択的 *FGFR4* 阻害剤も報告され(69)、このような新規治療薬の効果が期待される。

今回 ERMS において高頻度に *PTEN* のメチル化が新たに同定された。*PTEN* は腫瘍抑制因子として知られ、その他の腫瘍においても変異の報告があり、また胚細胞の発生に関与が知られている(70)。*PTEN* は細胞周期の G1 期において *FGFR4* 経路の下流で *PIK3CA* を抑制しており、*PTEN* の変異・メチル化による機能喪失、発現低下は *PIK3CA* の異常活性化を来していると推測される。さらに *PIK3CA* の機能獲得型変異も見出されたことから *PIK3CA* 阻害剤も ERMS の新たな治療の選択肢となる可能性が示された。また *PTEN* のメチル化は E1/E2 群に集中しており、*FGFR4* 経路の抑制による治療選択をする上での診断マーカーに用いられる可能性が提示された。

予後に関する解析においては、ERMS において DNA メチル化プロファイルによる E2 群と *TP53* 変異例が有意に予後不良な群として抽出された。各群の症例数は少数の検討であるため、別コホートでの再現性の確認は必要であるが、*TP53* 変異陰性例でも死亡例は認められ、E2 群に死亡例がない点を踏まえると、E1/E2 群による分類はより明確に予後予測を行うことができる可能性がある。そのため、DNA メチル化プロファイルによる分類は、新たなバイオマーカーとして臨床応用も可能となる有用性の高い発見といえる。また予後が良好であった E1 群においては治療強度を下げる試みの足がかりが提示され、近年課題となっている小児腫瘍患者の晩期障害を軽減できる点で意義は大きい。本研究により提示

された RMS における DNA メチル化プロファイルを用いた精度の高い新規分子診断は、RMS の治療最適化に貢献し、予後の改善や QOL 向上につながる臨床的にも価値の高い知見であると言える。

結論

PPB と RMS に対し、次世代シーケンサーを中心に、SNP アレイ、DNA メチル化アレイを併用した統合的ゲノム解析を行った。PPB においては *DICER1* 変異が高頻度に認められ、11 例中 6 例で *DICER1* 両アレル異常を認め、散发性 PPB における新たな分子遺伝学的特徴が見出された。また RMS においては組織型、遺伝子異常と相関する DNA メチル化プロファイルによる新たな病型分類により、ERMS から予後不良の一群を抽出可能とした。このように統合的ゲノム解析は発症頻度が稀であり難治性の小児固形腫瘍においても、分子病態の解明に極めて有用な方法であり、今後は本研究にて得られた知見を利用した新規薬剤の開発や、臨床現場での治療法選択や層別化への応用が期待される。

謝辞

本研究の遂行におきましてご指導をいただきました東京大学医学部小児科の岡明先生、滝田順子先生、京都大学腫瘍生物学の小川誠司先生、およびご支援いただきました東京大学医学部小児科の樋渡光輝先生、西村力先生、東京大学医学部小児外科の星野論子先生、成育医療研究センターの五十嵐隆先生、加藤元博先生、名古屋医療センターの眞田昌先生、京都大学腫瘍生物学の吉田健一先生、永田安伸先生、佐藤悠佑先生、佐藤亜以子先生、鈴木啓道先生、塩澤裕介先生、昆彩奈先生に深謝いたします。

また本研究における貴重な検体をご供与いただきました埼玉県立小児医療センターの花田良二先生、康勝好先生、荒川ゆうき先生、群馬県立小児医療センターの林泰秀先生、朴明子先生、神奈川県立こども病院の田中祐吉先生、茨城県立こども病院の加藤啓輔先生、成育医療研究センターの大喜多肇先生、京都府立医科大学の細井創先生、宮地充先生、九州大学の田口智暁先生、宗崎良太先生、兵庫県立こども病院の石田敏章先生、福岡大学の野村優子先生、東京慈恵会医科大学の秋山雅晴先生、また解析面で多大なご協力をいただきました東京大学医科学研究所の宮野悟先生、白石友一先生、千葉健一先生、田中洋子先生、東京大学先端科学技術研究センターの油谷浩幸先生、永江玄太先生、名古屋大学の島村徹平先生、奥野友介先生に深謝いたします。

引用文献

1. M. Soda, Y. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama, H. Mano, Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**, 561-566 (2007).
2. A. T. Shaw, D. W. Kim, K. Nakagawa, T. Seto, L. Crinó, M. J. Ahn, T. De Pas, B. Besse, B. J. Solomon, F. Blackhall, Y. L. Wu, M. Thomas, K. J. O'Byrne, D. Moro-Sibilot, D. R. Camidge, T. Mok, V. Hirsh, G. J. Riely, S. Iyer, V. Tassell, A. Polli, K. D. Wilner, P. A. Jänne, Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* **368**, 2385-2394 (2013).
3. Y. H. Messinger, D. R. Stewart, J. R. Priest, G. M. Williams, A. K. Harris, K. A. Schultz, J. Yang, L. Doros, P. S. Rosenberg, D. A. Hill, L. P. Dehner, Pleuropulmonary blastoma: a report on 350 central pathology-confirmed pleuropulmonary blastoma cases by the International Pleuropulmonary Blastoma Registry. *Cancer* **121**, 276-285 (2015).
4. J. R. Gutweiler, J. Labelle, M. Y. Suh, M. V. Misra, M. Ahmed, E. Y. Lee, S. O. Vargas, H. B. Kim, C. B. Weldon, A familial case of pleuropulmonary blastoma. *Eur J Pediatr Surg* **18**, 192-194 (2008).
5. D. A. Hill, J. Ivanovich, J. R. Priest, C. a. Gurnett, L. P. Dehner, D. Desruisseau, J. a. Jarzembowski, K. a. Wikenheiser-Brokamp, B. K.

- Suarez, A. J. Whelan, G. Williams, D. Bracamontes, Y. Messinger, P. J. Goodfellow, DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science (New York, N.Y.)* **325**, 965-965 (2009).
6. I. Slade, C. Bacchelli, H. Davies, a. Murray, F. Abbaszadeh, S. Hanks, R. Barfoot, a. Burke, J. Chisholm, M. Hewitt, H. Jenkinson, D. King, B. Morland, B. Pizer, K. Prescott, a. Saggar, L. Side, H. Traunecker, S. Vaidya, P. Ward, P. a. Futreal, G. Vujanic, a. G. Nicholson, N. Sebire, C. Turnbull, J. R. Priest, K. Pritchard-Jones, R. Houlston, C. Stiller, M. R. Stratton, J. Douglas, N. Rahman, DICER1 syndrome: clarifying the diagnosis, clinical features and management implications of a pleiotropic tumour predisposition syndrome. *Journal of Medical Genetics* **48**, 273-278 (2011).
 7. R. W. Carthew, Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 203-208 (2006).
 8. A. Heravi-Moussavi, M. S. Anglesio, S. W. Cheng, J. Senz, W. Yang, L. Prentice, A. P. Fejes, C. Chow, A. Tone, S. E. Kalloger, N. Hamel, A. Roth, G. Ha, A. N. Wan, S. Maines-Bandiera, C. Salamanca, B. Pasini, B. A. Clarke, A. F. Lee, C. H. Lee, C. Zhao, R. H. Young, S. A. Aparicio, P. H. Sorensen, M. M. Woo, N. Boyd, S. J. Jones, M. Hirst, M. A. Marra, B. Gilks, S. P. Shah, W. D. Foulkes, G. B. Morin, D. G. Huntsman, Recurrent somatic DICER1 mutations in nonepithelial ovarian cancers. *N Engl J Med* **366**, 234-242 (2012).
 9. M. S. Kumar, R. E. Pester, C. Y. Chen, K. Lane, C. Chin, J. Lu, D. G.

- Kirsch, T. R. Golub, T. Jacks, Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev* **23**, 2700-2704 (2009).
10. S. Ognjanovic, A. M. Linabery, B. Charbonneau, J. A. Ross, Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer* **115**, 4218-4226 (2009).
 11. J. C. Breneman, E. Lyden, A. S. Pappo, M. P. Link, J. R. Anderson, D. M. Parham, S. J. Qualman, M. D. Wharam, S. S. Donaldson, H. M. Maurer, W. H. Meyer, K. S. Baker, C. N. Paidas, W. M. Crist, Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma--a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. *J Clin Oncol* **21**, 78-84 (2003).
 12. Ries LAG, M. Smith, J. Gurney, M. Linet, T. Tamra, J. Young, G. Bunin, "Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995," (National Cancer Institute, SEER Program, Bethesda, 1999).
 13. W. A. Newton, E. H. Soule, A. B. Hamoudi, H. M. Reiman, H. Shimada, M. Beltangady, H. Maurer, Histopathology of childhood sarcomas, Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I and II: clinicopathologic correlation. *J Clin Oncol* **6**, 67-75 (1988).
 14. E. R. Rudzinski, L. A. Teot, J. R. Anderson, J. Moore, J. A. Bridge, F. G. Barr, J. M. Gastier-Foster, S. X. Skapek, D. S. Hawkins, D. M. Parham, Dense pattern of embryonal rhabdomyosarcoma, a lesion easily confused with alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the

- Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Am J Clin Pathol* **140**, 82-90 (2013).
15. W. M. Crist, J. R. Anderson, J. L. Meza, C. Fryer, R. B. Raney, F. B. Ruymann, J. Breneman, S. J. Qualman, E. Wiener, M. Wharam, T. Lobe, B. Webber, H. M. Maurer, S. S. Donaldson, Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol* **19**, 3091-3102 (2001).
 16. A. S. Pappo, J. R. Anderson, W. M. Crist, M. D. Wharam, P. P. Breitfeld, D. Hawkins, R. B. Raney, R. B. Womer, D. M. Parham, S. J. Qualman, H. E. Grier, Survival after relapse in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *J Clin Oncol* **17**, 3487-3493 (1999).
 17. F. G. Barr, L. E. Nauta, R. J. Davis, B. W. Schäfer, L. M. Nycum, J. A. Biegel, In vivo amplification of the PAX3-FKHR and PAX7-FKHR fusion genes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Hum Mol Genet* **5**, 15-21 (1996).
 18. R. B. Raney, J. R. Anderson, F. G. Barr, S. S. Donaldson, A. S. Pappo, S. J. Qualman, E. S. Wiener, H. M. Maurer, W. M. Crist, Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V. *J Pediatr Hematol Oncol* **23**, 215-220 (2001).

19. H. Scrabble, W. Cavenee, F. Ghavimi, M. Lovell, K. Morgan, C. Sapienza, A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7480-7484 (1989).
20. A. C. Taylor, L. Shu, M. K. Danks, C. A. Poquette, S. Shetty, M. J. Thayer, P. J. Houghton, L. C. Harris, P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Med Pediatr Oncol* **35**, 96-103 (2000).
21. M. R. Stratton, C. Fisher, B. A. Gusterson, C. S. Cooper, Detection of point mutations in N-ras and K-ras genes of human embryonal rhabdomyosarcomas using oligonucleotide probes and the polymerase chain reaction. *Cancer Res* **49**, 6324-6327 (1989).
22. N. Shukla, N. Ameer, I. Yilmaz, K. Nafa, C. Y. Lau, A. Marchetti, L. Borsu, F. G. Barr, M. Ladanyi, Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clin Cancer Res* **18**, 748-757 (2012).
23. J. F. Shern, L. Chen, J. Chmielecki, J. S. Wei, R. Patidar, M. Rosenberg, L. Ambrogio, D. Auclair, J. Wang, Y. K. Song, C. Tolman, L. Hurd, H. Liao, S. Zhang, D. Bogen, A. S. Brohl, S. Sindiri, D. Catchpoole, T. Badgett, G. Getz, J. Mora, J. R. Anderson, S. X. Skapek, F. G. Barr, M. Meyerson, D. S. Hawkins, J. Khan, Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of

- alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer discovery* **4**, 216-231 (2014).
24. S. E. Mahoney, Z. Yao, C. C. Keyes, S. J. Tapscott, S. J. Diede, Genome-wide DNA methylation studies suggest distinct DNA methylation patterns in pediatric embryonal and alveolar rhabdomyosarcomas. *Epigenetics* **7**, 400-408 (2012).
25. X. Chen, E. Stewart, A. A. Shelat, C. Qu, A. Bahrami, M. Hatley, G. Wu, C. Bradley, J. McEvoy, A. Pappo, S. Spunt, M. B. Valentine, V. Valentine, F. Krafcik, W. H. Lang, M. Wierdl, L. Tsurkan, V. Tolleman, S. M. Federico, C. Morton, C. Lu, L. Ding, J. Easton, M. Rusch, P. Nagahawatte, J. Wang, M. Parker, L. Wei, E. Hedlund, D. Finkelstein, M. Edmonson, S. Shurtleff, K. Boggs, H. Mulder, D. Yergeau, S. Skapek, D. S. Hawkins, N. Ramirez, P. M. Potter, J. A. Sandoval, A. M. Davidoff, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. Zhang, J. R. Downing, M. A. Dyer, Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer cell* **24**, 710-724 (2013).
26. H. Li, R. Durbin, Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-1760 (2009).
27. K. Wang, M. Li, H. Hakonarson, ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* **38**, e164 (2010).
28. Y. Shiraishi, Y. Sato, K. Chiba, Y. Okuno, Y. Nagata, K. Yoshida, N. Shiba, Y. Hayashi, H. Kume, Y. Homma, M. Sanada, S. Ogawa, S.

- Miyano, An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic acids research* **41**, e89-e89 (2013).
29. Y. Nannya, M. Sanada, K. Nakazaki, N. Hosoya, L. Wang, A. Hangaishi, M. Kurokawa, S. Chiba, D. K. Bailey, G. C. Kennedy, S. Ogawa, A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer research* **65**, 6071-6079 (2005).
30. G. Yamamoto, Y. Nannya, M. Kato, M. Sanada, R. L. Levine, N. Kawamata, A. Hangaishi, M. Kurokawa, S. Chiba, D. G. Gilliland, H. P. Koeffler, S. Ogawa, Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet* **81**, 114-126 (2007).
31. C. H. Mermel, S. E. Schumacher, B. Hill, M. L. Meyerson, R. Beroukhim, G. Getz, GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome biology* **12**, R41-R41 (2011).
32. P. Du, X. Zhang, C. C. Huang, N. Jafari, W. A. Kibbe, L. Hou, S. M. Lin, Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* **11**, 587 (2010).
33. A. Zykovich, A. Hubbard, J. M. Flynn, M. Tarnopolsky, M. F. Fraga, C.

- Kerksick, D. Ogborn, L. MacNeil, S. D. Mooney, S. Melov, Genome-wide DNA methylation changes with age in disease-free human skeletal muscle. *Aging Cell* **13**, 360-366 (2014).
34. S. Oba, M. A. Sato, I. Takemasa, M. Monden, K. Matsubara, S. Ishii, A Bayesian missing value estimation method for gene expression profile data. *Bioinformatics* **19**, 2088-2096 (2003).
35. R. Nishimura, J. Takita, A. Sato-Otsubo, M. Kato, K. Koh, R. Hanada, Y. Tanaka, K. Kato, D. Maeda, M. Fukayama, M. Sanada, Y. Hayashi, S. Ogawa, Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer science* **104**, 856-864 (2013).
36. C. Liu, D. Li, J. Jiang, J. Hu, W. Zhang, Y. Chen, X. Cui, Y. Qi, H. Zou, F. Li, Analysis of molecular cytogenetic alteration in rhabdomyosarcoma by array comparative genomic hybridization. *PLoS One* **9**, e94924 (2014).
37. S. Banerji, K. Cibulskis, C. Rangel-Escareno, K. K. Brown, S. L. Carter, A. M. Frederick, M. S. Lawrence, A. Y. Sivachenko, C. Sougnez, L. Zou, M. L. Cortes, J. C. Fernandez-Lopez, S. Peng, K. G. Ardlie, D. Auclair, V. Bautista-Piña, F. Duke, J. Francis, J. Jung, A. Maffuz-Aziz, R. C. Onofrio, M. Parkin, N. H. Pho, V. Quintanar-Jurado, A. H. Ramos, R. Rebollar-Vega, S. Rodriguez-Cuevas, S. L. Romero-Cordoba, S. E. Schumacher, N. Stransky, K. M. Thompson, L. Uribe-Figueroa, J. Baselga, R. Beroukhim, K. Polyak, D. C. Sgroi, A. L. Richardson, G.

- Jimenez-Sanchez, E. S. Lander, S. B. Gabriel, L. A. Garraway, T. R. Golub, J. Melendez-Zajgla, A. Toker, G. Getz, A. Hidalgo-Miranda, M. Meyerson, Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* **486**, 405-409 (2012).
38. C. G. A. R. Network, Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609-615 (2011).
39. C. G. A. R. Network, Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519-525 (2012).
40. T. J. Pugh, S. D. Weeraratne, T. C. Archer, D. A. Pomeranz Krummel, D. Auclair, J. Bochicchio, M. O. Carneiro, S. L. Carter, K. Cibulskis, R. L. Erlich, H. Greulich, M. S. Lawrence, N. J. Lennon, A. McKenna, J. Meldrim, A. H. Ramos, M. G. Ross, C. Russ, E. Shefler, A. Sivachenko, B. Sogoloff, P. Stojanov, P. Tamayo, J. P. Mesirov, V. Amani, N. Teider, S. Sengupta, J. P. Francois, P. A. Northcott, M. D. Taylor, F. Yu, G. R. Crabtree, A. G. Kautzman, S. B. Gabriel, G. Getz, N. Jäger, D. T. Jones, P. Lichter, S. M. Pfister, T. M. Roberts, M. Meyerson, S. L. Pomeroy, Y. J. Cho, Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations. *Nature* **488**, 106-110 (2012).
41. T. J. Pugh, O. Morozova, E. F. Attiyeh, S. Asgharzadeh, J. S. Wei, D. Auclair, S. L. Carter, K. Cibulskis, M. Hanna, A. Kiezun, J. Kim, M. S. Lawrence, L. Lichtenstein, A. McKenna, C. S. Pedamallu, A. H. Ramos, E. Shefler, A. Sivachenko, C. Sougnez, C. Stewart, A. Ally, I. Birol, R. Chiu, R. D. Corbett, M. Hirst, S. D. Jackman, B. Kamoh, A. H.

- Khodabakshi, M. Krzywinski, A. Lo, R. A. Moore, K. L. Mungall, J. Qian, A. Tam, N. Thiessen, Y. Zhao, K. A. Cole, M. Diamond, S. J. Diskin, Y. P. Mosse, A. C. Wood, L. Ji, R. Sposto, T. Badgett, W. B. London, Y. Moyer, J. M. Gastier-Foster, M. A. Smith, J. M. Auvil, D. S. Gerhard, M. D. Hogarty, S. J. Jones, E. S. Lander, S. B. Gabriel, G. Getz, R. C. Seeger, J. Khan, M. A. Marra, M. Meyerson, J. M. Maris, The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* **45**, 279-284 (2013).
42. A. Bellacosa, Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol* **187**, 137-144 (2001).
43. L. B. Alexandrov, S. Nik-Zainal, D. C. Wedge, S. A. Aparicio, S. Behjati, A. V. Biankin, G. R. Bignell, N. Bolli, A. Borg, A. L. Børresen-Dale, S. Boyault, B. Burkhardt, A. P. Butler, C. Caldas, H. R. Davies, C. Desmedt, R. Eils, J. E. Eyfjörd, J. A. Foekens, M. Greaves, F. Hosoda, B. Hutter, T. Ilicic, S. Imbeaud, M. Imielinski, M. Imielinsk, N. Jäger, D. T. Jones, D. Jones, S. Knappskog, M. Kool, S. R. Lakhani, C. López-Otín, S. Martin, N. C. Munshi, H. Nakamura, P. A. Northcott, M. Pajic, E. Papaemmanuil, A. Paradiso, J. V. Pearson, X. S. Puente, K. Raine, M. Ramakrishna, A. L. Richardson, J. Richter, P. Rosenstiel, M. Schlesner, T. N. Schumacher, P. N. Span, J. W. Teague, Y. Totoki, A. N. Tutt, R. Valdés-Mas, M. M. van Buuren, L. van 't Veer, A. Vincent-Salomon, N. Waddell, L. R. Yates, J. Zucman-Rossi, P. A. Futreal, U. McDermott, P. Lichter, M. Meyerson, S. M. Grimmond, R.

- Siebert, E. Campo, T. Shibata, S. M. Pfister, P. J. Campbell, M. R. Stratton, A. P. C. G. Initiative, I. B. C. Consortium, I. M.-S. Consortium, I. PedBrain, Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415-421 (2013).
44. J. G. Taylor, A. T. Cheuk, P. S. Tsang, J. Y. Chung, Y. K. Song, K. Desai, Y. Yu, Q. R. Chen, K. Shah, V. Youngblood, J. Fang, S. Y. Kim, C. Yeung, L. J. Helman, A. Mendoza, V. Ngo, L. M. Staudt, J. S. Wei, C. Khanna, D. Catchpoole, S. J. Qualman, S. M. Hewitt, G. Merlino, S. J. Chanock, J. Khan, Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J Clin Invest* **119**, 3395-3407 (2009).
45. Y. Samuels, Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S. M. Powell, G. J. Riggins, J. K. Willson, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**, 554 (2004).
46. I. G. Campbell, S. E. Russell, D. Y. Choong, K. G. Montgomery, M. L. Ciavarella, C. S. Hooi, B. E. Cristiano, R. B. Pearson, W. A. Phillips, Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* **64**, 7678-7681 (2004).
47. C. Rosty, J. P. Young, M. D. Walsh, M. Clendenning, K. Sanderson, R. J. Walters, S. Parry, M. A. Jenkins, A. K. Win, M. C. Southey, J. L. Hopper, G. G. Giles, E. J. Williamson, D. R. English, D. D. Buchanan,

- PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoS One* **8**, e65479 (2013).
48. S. Weber-Hall, A. McManus, J. Anderson, T. Nojima, S. Abe, K. Pritchard-Jones, J. Shipley, Novel formation and amplification of the PAX7-FKHR fusion gene in a case of alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* **17**, 7-13 (1996).
49. T. J. Pugh, W. Yu, J. Yang, A. L. Field, L. Ambrogio, S. L. Carter, K. Cibulskis, P. Giannikopoulos, A. Kiezun, J. Kim, A. McKenna, E. Nickerson, G. Getz, S. Hoffher, Y. H. Messinger, L. P. Dehner, C. W. Roberts, C. Rodriguez-Galindo, G. M. Williams, C. T. Rossi, M. Meyerson, D. A. Hill, Exome sequencing of pleuropulmonary blastoma reveals frequent biallelic loss of TP53 and two hits in DICER1 resulting in retention of 5p-derived miRNA hairpin loop sequences. *Oncogene* **33**, 5295-5302 (2014).
50. M. S. Anglesio, Y. Wang, W. Yang, J. Senz, A. Wan, A. Heravi-Moussavi, C. Salamanca, S. Maines-Bandiera, D. G. Huntsman, G. B. Morin, Cancer-associated somatic DICER1 hotspot mutations cause defective miRNA processing and reverse-strand expression bias to predominantly mature 3p strands through loss of 5p strand cleavage. *J Pathol* **229**, 400-409 (2013).
51. A. M. Gurtan, V. Lu, A. Bhutkar, P. A. Sharp, In vivo structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA* **18**, 1116-1122 (2012).

52. R. R. de Krijger, S. M. Claessen, F. van der Ham, A. J. van Unnik, C. A. Hulsbergen-van de Kaa, L. van Leuven, M. van Noesel, E. J. Speel, Gain of chromosome 8q is a frequent finding in pleuropulmonary blastoma. *Mod Pathol* **20**, 1191-1199 (2007).
53. H. I. Suzuki, K. Yamagata, K. Sugimoto, T. Iwamoto, S. Kato, K. Miyazono, Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* **460**, 529-533 (2009).
54. A. Lujambio, S. W. Lowe, The microcosmos of cancer. *Nature* **482**, 347-355 (2012).
55. X. Wang, J. Zhao, J. Huang, H. Tang, S. Yu, Y. Chen, The regulatory roles of miRNA and methylation on oncogene and tumor suppressor gene expression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **425**, 51-57 (2012).
56. J. Li, C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliarensis, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko, H. Hibshoosh, M. H. Wigler, R. Parsons, PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947 (1997).
57. S. I. Wang, J. Puc, J. Li, J. N. Bruce, P. Cairns, D. Sidransky, R. Parsons, Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* **57**, 4183-4186 (1997).
58. T. Sjöblom, S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P.

- Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B. H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* **314**, 268-274 (2006).
59. C. Ortiz-Padilla, D. Gallego-Ortega, B. C. Browne, F. Hochgräfe, C. E. Caldon, R. J. Lyons, D. R. Croucher, D. Rickwood, C. J. Ormandy, T. Brummer, R. J. Daly, Functional characterization of cancer-associated Gab1 mutations. *Oncogene* **32**, 2696-2702 (2013).
60. A. V. Biankin, N. Waddell, K. S. Kassahn, M. C. Gingras, L. B. Muthuswamy, A. L. Johns, D. K. Miller, P. J. Wilson, A. M. Patch, J. Wu, D. K. Chang, M. J. Cowley, B. B. Gardiner, S. Song, I. Harliwong, S. Idrisoglu, C. Nourse, E. Nourbakhsh, S. Manning, S. Wani, M. Gongora, M. Pajic, C. J. Scarlett, A. J. Gill, A. V. Pinho, I. Rومان, M. Anderson, O. Holmes, C. Leonard, D. Taylor, S. Wood, Q. Xu, K. Nones, J. L. Fink, A. Christ, T. Bruxner, N. Cloonan, G. Kolle, F. Newell, M. Pinese, R. S. Mead, J. L. Humphris, W. Kaplan, M. D. Jones, E. K. Colvin, A. M. Nagrial, E. S. Humphrey, A. Chou, V. T. Chin, L. A. Chantrill, A. Mawson, J. S. Samra, J. G. Kench, J. A. Lovell, R. J. Daly, N. D. Merrett, C. Toon, K. Epari, N. Q. Nguyen, A. Barbour, N. Zeps, N. Kakkar, F. Zhao, Y. Q. Wu, M. Wang, D. M. Muzny, W. E. Fisher, F. C. Brunnicardi, S. E. Hodges, J. G. Reid, J. Drummond, K. Chang, Y.

- Han, L. R. Lewis, H. Dinh, C. J. Buhay, T. Beck, L. Timms, M. Sam, K. Begley, A. Brown, D. Pai, A. Panchal, N. Buchner, R. De Borja, R. E. Denroche, C. K. Yung, S. Serra, N. Onetto, D. Mukhopadhyay, M. S. Tsao, P. A. Shaw, G. M. Petersen, S. Gallinger, R. H. Hruban, A. Maitra, C. A. Iacobuzio-Donahue, R. D. Schulick, C. L. Wolfgang, R. A. Morgan, R. T. Lawlor, P. Capelli, V. Corbo, M. Scardoni, G. Tortora, M. A. Tempero, K. M. Mann, N. A. Jenkins, P. A. Perez-Mancera, D. J. Adams, D. A. Largaespada, L. F. Wessels, A. G. Rust, L. D. Stein, D. A. Tuveson, N. G. Copeland, E. A. Musgrove, A. Scarpa, J. R. Eshleman, T. J. Hudson, R. L. Sutherland, D. A. Wheeler, J. V. Pearson, J. D. McPherson, R. A. Gibbs, S. M. Grimmond, A. P. C. G. Initiative, Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* **491**, 399-405 (2012).
61. S. Kohsaka, N. Shukla, N. Ameer, T. Ito, C. K. Ng, L. Wang, D. Lim, A. Marchetti, A. Viale, M. Pirun, N. D. Socci, L. X. Qin, R. Sciot, J. Bridge, S. Singer, P. Meyers, L. H. Wexler, F. G. Barr, S. Dogan, J. A. Fletcher, J. S. Reis-Filho, M. Ladanyi, A recurrent neomorphic mutation in MYOD1 defines a clinically aggressive subset of embryonal rhabdomyosarcoma associated with PI3K-AKT pathway mutations. *Nat Genet* **46**, 595-600 (2014).
62. H. Liang, Q. Chen, A. H. Coles, S. J. Anderson, G. Pihan, A. Bradley, R. Gerstein, R. Jurecic, S. N. Jones, Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer*

- Cell* **4**, 349-360 (2003).
63. J. Ying, H. Li, J. Yu, K. M. Ng, F. F. Poon, S. C. Wong, A. T. Chan, J. J. Sung, Q. Tao, WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 55-61 (2008).
64. K. Roarty, S. E. Baxley, M. R. Crowley, A. R. Frost, R. Serra, Loss of TGF-beta or Wnt5a results in an increase in Wnt/beta-catenin activity and redirects mammary tumour phenotype. *Breast Cancer Res* **11**, R19 (2009).
65. B. G. Bitler, J. P. Nicodemus, H. Li, Q. Cai, H. Wu, X. Hua, T. Li, M. J. Birrer, A. K. Godwin, P. Cairns, R. Zhang, Wnt5a suppresses epithelial ovarian cancer by promoting cellular senescence. *Cancer Res* **71**, 6184-6194 (2011).
66. V. Guagnano, P. Furet, C. Spanka, V. Bordas, M. Le Douget, C. Stamm, J. Brueggen, M. R. Jensen, C. Schnell, H. Schmid, M. Wartmann, J. Berghausen, P. DruECKes, A. Zimmerlin, D. Bussiere, J. Murray, D. Graus Porta, Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* **54**, 7066-7083 (2011).
67. P. R. Gavine, L. Mooney, E. Kilgour, A. P. Thomas, K. Al-Kadhimi, S. Beck, C. Rooney, T. Coleman, D. Baker, M. J. Mellor, A. N. Brooks, T.

- Klinowska, AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res* **72**, 2045-2056 (2012).
68. S. Q. Li, A. T. Cheuk, J. F. Shern, Y. K. Song, L. Hurd, H. Liao, J. S. Wei, J. Khan, Targeting wild-type and mutationally activated FGFR4 in rhabdomyosarcoma with the inhibitor ponatinib (AP24534). *PLoS One* **8**, e76551 (2013).
69. M. Hagel, C. Miduturu, M. Sheets, N. Rubin, W. Weng, N. Stransky, N. Bifulco, J. L. Kim, B. Hodous, N. Brooijmans, A. Shutes, C. Winter, C. Lengauer, N. E. Kohl, T. Guzi, First Selective Small Molecule Inhibitor of FGFR4 for the Treatment of Hepatocellular Carcinomas with an Activated FGFR4 Signaling Pathway. *Cancer Discov* **5**, 424-437 (2015).
70. K. M. Yamada, M. Araki, Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* **114**, 2375-2382 (2001).