

論文の内容の要旨

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

小児における固形腫瘍の治療成績は化学療法や分子標的療法の進歩など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、近年の網羅的なゲノム解析技術により、さまざまな腫瘍において、新規治療薬の開発に結びつく新たな分子遺伝学的病態が解明されてきているが、このような解析は発症頻度の高い疾患で行われ、特に発症者数の少ない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な遺伝学的基盤をもとに発症していることが予想され、解析を進める意義は深い。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、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、小児腫瘍において稀であり、かつ難治性である胸膜肺芽腫(PPB)と横紋筋肉腫(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、腫瘍性疾患の家族歴を有する症例も知られている。近年、家族性PPBのゲノム解析によりmiRNA産生に必須であるRNAリボヌクレアーゼIIIである*DICER1*の生殖細胞変異が高頻度に認められることが報告された。しかし、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、小

児悪性腫瘍全体のわずか3%程度である。近年化学療法の進歩により、予後の改善が得られているが、転移もしくは再発例では5年生存率は30%未満となる。RMSは組織型として胎児型(ERMS)と胞巣型(ARMS)に大別されるが、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。また、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(LOH)が多いとされるが、それ以外の異常は十分に知られていない。近年、FGFR4経路の異常も報告されたが、これらの異常を認めない例も多く存在し、RMSにおけるエピゲノム異常については十分に検討がなされていない。

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、トランスクリプトーム解析、miRNAシーケンス解析、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。

7例のPPBに対しエクソーム解析を施行し、6例にDICER1変異が同定された。5例を追加し、12例でDICER1に対するターゲットディープシーケンスを施行し、11例でDICER1変異が検出され、92%と高率にDICER1変異が認められた。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。ホモ変異の2例においては、SNPアレイによりDICER1が位置している14番染色体短腕のLOHを生じていることが確認された。興味深いことに、全ての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。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、正常機能のDICER1が腫瘍内に存在していないことが示唆された。また正常検体が得られた症例において変異の起源を評価すると、コンパウンドヘテロ変異は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。ホモ変異2例はいずれも体細胞変異であり、ヘテロ変異2例は体細胞のミスセンス変異1例と生殖細胞の挿入欠失変異1例であった。

次に、DICER1の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、5'-miRNAの産生が有意に低く、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。それに対し RNase IIIa ドメインの機能は保たれ、3'-miRNA の産生は胎児肺検体と比べむしろ有意に高い結果が得られた。

DICER1 以外の遺伝子異常として、*TP53* 変異が 5 例(42%)において検出された。またコピー数異常として 17p 欠失が 73%に認められた。*TP53* 変異を有する症例はすべて 17p の欠失を伴っており、*DICER1* に次ぐセカンドヒットである可能性が示唆された。

RMS におけるエクソーム解析とターゲットディープシーケンスでは、*FGFR4* 経路の遺伝子変異(*FGFR4*, *PTPN11*, *GAB1*, *PIK3CA*, *PTEN*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *NFI*)を合計すると、40% (24/60) と高頻度に認められた。SNP アレイにより同定されたコピー数異常の領域を GISTIC 解析にて有意に変動している領域を抽出した。*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。また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%、*CDKN2A/B* が含まれる 9p21 領域の欠失が 20%、*TP53* が含まれる 17p13.2 領域の欠失が 17%で抽出された。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コピー数異常として、*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。

さらに 50 例の RMS に対し DNA メチル化アレイを施行し、階層的クラスタリングにより 4 群に分類した。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、1 例の混合型を除く 96%が ERMS であった。また残りの 2 群(A1、A2)には *PAX3/7-FOXO1* 融合遺伝子陽性の ARMS が全て含まれていた。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。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。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。*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。

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調べた。コピー数異常としては A1/A2 群は E1/E2 群に比べ、2 番、8 番、12 番染色体の増幅が有意に多く認められた。*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 ($P = 1.0 \times 10^{-3}$)。E2 群は E1 群と比べ、*TP53* 変異も有意に多く認められた (E1 群 0%、E2 群 46%、 $P = 0.035$)。また、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同定され ($P = 0.016$)、A1/A2 群の特徴的な異常と考えられた。

最後に 4 群と予後との関連を比較したところ、E1 群が予後良好な群として有意差が認められた ($P = 0.045$)。しかし、E1/E2 群は ERMS が集中し、ARMS に比し ERMS は予後良好であると知られているため、予後が不良であった E2 群と E1 群の比較を行い、さらに *TP53* 変異と *FGFR4* 経路の変異 (*FGFR4*、*PTPN11*、*PIK3CA*、*PTEN*) との関連も検討した。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。

本研究における統合的なゲノム解析により、PPB において *DICER1* 変異が高頻度に認められ、その多くで *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。