

論文の内容の要旨

論文題目 ハイスループット解析を用いた小児固形腫瘍の分子病態

氏名 星野 論子

近年、大量検体を短時間で解析できるハイスループット解析により、がんは先天的なゲノム異常だけでは説明できず、後天的なゲノム修飾であるエピジェネティックな制御が、がんの病態に関与していることが明らかとなってきた。成人のがん領域では、ゲノム異常と DNA メチル化異常が協調して分子病態に関与することが示されており、また小児腫瘍である横紋筋肉腫では DNA メチル化情報を基盤としたサブグループが見出され、遺伝子異常と臨床情報が強く相関することが報告された。さらにマウスを用いた実験では、胎生期に一時的に山中因子を強制発現させるとメチル化異常のみで小児のウィルムス腫瘍類似の腫瘍が発生することが証明されており、成人のみならず小児腫瘍においてもエピジェネティックな制御の破綻が分子病態に重要な影響を及ぼしている可能性が示唆されている。

神経芽腫は、小児において白血病、脳腫瘍について頻度の高い腫瘍であり、15 歳未満の小児腫瘍の 8~10%を占める。近年、次世代シーケンサーなどを用いた解析により、神経芽腫における分子病態の解明が多数試みられているが、臨床的、病理学的、生物学的に多様性を示し、腫瘍内部においても不均一でその標的は多岐にわたるであろうことが推察される神経芽腫の分子病態の全貌は未だ明らかにされておらず、とりわけエピジェネティック制御の役割は十分には解明されていない。

そこで本研究では、神経芽腫の分子病態にエピジェネティック制御の破綻が関与するかを検討するため、次世代シーケンサーとアレイ解析技術を駆使して、エピジェネティック制御遺伝子の解読深度ターゲットキャプチャー、網羅的ゲノムコピー数およびメチル化解析を行い、神経芽腫におけるエピジェネティック制御の遺伝学的全体図を作成した。

はじめに、ディスカバリーコホートとして、神経芽腫新鮮腫瘍検体の初発 20 検体と再発時腫瘍 2 検体、さらに再発時のみの 1 検体を加え計 23 検体で、ターゲットキャプチャー法によるエピジェネティック制御遺伝子の変異解析を行った。ディスカバリーコホートでの変異候補は計 67 個で、最終的に確認された変異は 33 個であった。2 例以上の重複する腫瘍特異的変異を認められた遺伝子は、*ASH1L* と *CHD7* の 2 遺伝子であり、再発かつ転移巣 2 検体において認められた。また、他の腫瘍特異的変異も、この再発 2 検体に集中していた。胚細胞における変異の病的意義

については未だ定まった見解はないが、*ALK*の R1275Q 変異など腫瘍のみならず胚細胞にも生じ、病的意義をもつことが知られている変異も存在する。そこでレアバリエントを含め病因の可能性のある胚細胞変異もあわせて検討した。2 例以上重複した変異は、*ASH1L*(4/21)、*ARID1B*(3/21)、*CHD7*(2/21)、*MLL3*(2/21) であり、Trithorax group (TrxG) や Switch/Sucrose non-fermentable (SWI/SNF) などの転写を活性化する複合体に属していた。腫瘍特異的遺伝子、もしくは胚細胞変異も合わせて 2 例以上で変異のあった候補遺伝子 (*ASH1L*, *CHD7*, *KDM5C*, *MLL*, *MLL3*, *SMARCA4*, *RBBP4*) と神経芽腫で既知の変異遺伝子 (*ALK*, *ARID1A*, *ARID1B*, *ATRX*) に関して、バリデーションコホート 81 例を用いて、ターゲットディープシーケンス変異解析と SNP アレイ解析を追加した。全症例を通じて変異の頻度が最も高かったのは、*ALK*, *ARID1B* であり、8/102 (7.8%) で認められた。また、4/102 (3.9%) と頻度は高くないものの、神経芽腫で報告のない新規の腫瘍特異的変異が *CHD7* において認められた。SNP アレイ解析では、1p 欠失や、11q 欠失、17q 増加など神経芽腫の生物学的特性を明らかにするとともに、ハプロ不全でも細胞の増殖に関連するとされる、*MLL3*, *ARID1A* に関しても注目した。*MLL3* ではコピー数の低下はなく、*ARID1A* では 18/102 (17.6%) でゲノムコピー数の低下を認めた。全症例でのエピジェネティック制御遺伝子の変異解析、ゲノムコピー数変化および臨床情報との関連性を検討したところ、エピジェネティック制御遺伝子異常は、全体の 40/102 (39.2%) で検出され、特に SWI/SNF 複合体に集中し、排他的に生じていた。エピジェネティック制御異常群とその他の群で予後因子を比較すると、*MYCN* 増幅や病期 4 症例、1p 欠失の割合が有意に多く、発症年齢も高かった。また、エピジェネティック制御異常群とその他の群での 5 年 EFS (Event Free Survival) は、エピジェネティック制御異常群で有意に予後不良であった。

次に、神経芽腫におけるメチル化の影響について解析するために、神経芽腫初発 44 例について網羅的メチル化解析を行った。さらに公開データベースである Genome expression omnibus (GEO) より、正常対照群 (正常副腎 5 例、リンパ球 6 例、幹細胞群 8 例) のメチル化データを取得、自験例のデータと統合して解析を行った。神経芽腫におけるプロモーター領域では、多くのプローブが低メチル化状態であった。そこで、神経芽腫、正常副腎で、メチル化に統計的ばらつきがある上位プローブを選択し、メチル化の違いがサブグループにどのような影響を与えているのかを検討した。病期ごとに遺伝子のプロモーター領域のメチル化の状態を観察すると、神経芽腫群では病期に関わらず、正常副腎よりも低メチル化しているプローブの頻度が高かった。また、CpG island 領域とそれ以外の領域では、CpG island 領域において、病期間でメチル化に統計的ばらつきが認められた一方で、CpG island 以外の領域では、病期間で有意差はなかった。CpG island 領域の高メチル化は、成人のがんにおいて一部の特徴づけられたサブグループに存在し、CIMP (CpG island methylator phenotype) と分類されるが、神経芽腫においても CIMP は *MYCN* 増幅症例が多く、予後不良とされている。そこで CpG island 領域について

階層別クラスター解析を行った。コンセンサスクラスタリングの結果、CpG island 領域のプロモーター領域は、3 群が最も安定性があり、神経芽腫グループの特徴を捉えていると考えられた。メチル化プローブのヒートマップから、この3 群をメチル化のパターンにより Hyper-methylated 群、Intermediate-methylated 群、Adrenal-like 群と定義した。エピジェネティック制御遺伝子の異常、ゲノムコピー数異常、臨床情報とメチル化クラスターの統合的解析では、Hyper-methylated 群は、*MYCN* 増幅と 1p 欠失、エピジェネティック異常を伴うことが多かった。全例が病期 4 であり、年齢は他群と比較して有意に高く、予後不良の傾向があった。一方、予後良好因子とされる発症年齢が 18 ヶ月以下、Hyperploid の症例は、Intermediate-methylated 群に集中していた。自験例でのメチル化解析におけるサブグループ分類の再現性を確かめるために、同じプラットフォームでメチル化の解析を行っている Gomez らのデータ(神経芽腫 35 例と正常副腎 2 例、胎児脳組織 2 例、神経節芽腫 2 例)を公開データベースである GEO から取得し、階層別クラスター解析を行ったところ、自験例の解析結果と同様にメチル化パターンにより 3 群に分かれ、サブグループの臨床情報も同様の結果を得られた。次に、自験例と Gomez らの症例を統合したデータにおいて、サブグループを分類するメチル化プローブを抽出するために、各 2 群におけるメチル化プローブの比較を Wilcoxon の順位和検定を用いて行った。*MYCN* 増幅症例の多い Hyper-methylated 群において、既知の *RASSF1* に加え、*CYTH2*、*GRIN1* など RAS パスウェイに関わる遺伝子や、*ACP5*、*C6orf150*、*EPST11* などインターフェロンの応答や免疫に関わると考えられる遺伝子、また胃がんで高メチル化が報告されておりアポトーシスに関わるとされる *TMEM106A* などは、正常副腎群よりも高メチル化していた。本研究では、検体の制限によりメチル化と発現の関係を示せなかったが、今後症例数を増やし、メチル化と発現との関連、予後不良である Hyper-methylated 群で高メチル化している遺伝子がバイオマーカーとして使用可能か、また *MYCN* 増幅がある予後不良群のなかでも特に Hyper-methylated 群に含まれる症例が、より予後の悪いサブグループを形成するのかなどを検討する必要があると考えられた。

以上より、エピジェネティック制御遺伝子の変異解析と SNP アレイ解析を組み合わせることにより、神経芽腫においてエピジェネティック制御遺伝子の異常が、SWI/SNF 複合体に集中しており、この複合体が重要である可能性が示唆された。また、エピジェネティック制御関連遺伝子異常は、病期 4 や再発例、年長児に随伴しており、この異常が腫瘍の悪性化に関与している可能性が示唆された。

網羅的メチル化解析の結果、神経芽腫においてはメチル化パターンの違いにより 3 つのサブグループが存在することが明らかとなり、それぞれの遺伝学的特性と臨床的な特徴を見出した。また、神経芽腫において CIMP は、*MYCN* 増幅群のみならず病期 4 かつ年長児、エピジェネティック制御遺伝子の異常がある症例群であり、免疫応答に関する遺伝子が高メチル化していることが新たに明らかになった。