

博士論文

Defective DNA damage response in neuroblastoma

(神経芽腫における DNA 損傷応答機構の破綻)

吉田 美沙

目次

| | |
|--|----|
| 略語 | 3 |
| 要旨 | 4 |
| 序文 | 5 |
| 方法と材料..... | 9 |
| 検体 | 9 |
| SNP アレイを用いた網羅的なコピー数およびアレル不均衡の解析..... | 14 |
| 高解像度融解曲線分析 (High Resolution Melting, HRM) | 14 |
| ターゲットアンプリコンシーケンス解析 | 15 |
| ATM の相補性試験 | 20 |
| コロニー形成法 | 20 |
| Direct repeat-green fluorescent protein (DR-GFP) 相同組み換えアッセイ..... | 21 |
| 結果 | 21 |
| SNP アレイによるコピー数の網羅的解析..... | 21 |
| 細胞株の ATM 変異 | 26 |
| 臨床検体の ATM 変異 | 27 |
| 健常人における ATM 変異 | 28 |
| 臨床検体の DNA 損傷応答関連遺伝子の変異 | 29 |
| 生物学的因子の相互関係の全体像..... | 32 |
| DNA 損傷応答関連遺伝子の異常と予後 | 34 |
| ATM の発現と ATM 経路の活性化状態..... | 37 |
| ATM 変異の機能..... | 39 |
| 神経芽腫細胞株の相同組み換え修復への関与と PARP 阻害剤感受性の検討..... | 41 |
| 考察 | 42 |
| 結論 | 48 |
| 謝辞 | 49 |
| 引用文献 | 50 |

略語

AT, ataxia telangiectasia

GISTIC, genomic Identification of Significant Targets in Cancer

INSS, international neuroblastoma staging system

LOH, loss of Heterozygosity

PARP, poly ADP ribose polymerase

SNP, single nucleotide polymorphism

UPD, uniparental disomy

要旨

11q 上の *ATM* は様々な悪性腫瘍への関与が知られているが神経芽腫との関連は十分に解明されていない。11q 欠失は進行神経芽腫に多いため *ATM* が関与している可能性を考え、本研究では過去に報告のなかった *ATM* の全エクソンターゲットアンプリコンシーケンスを行い、加えてコピー数解析、*ATM* 経路の遺伝子解析、機能解析、*PARP* 阻害剤の検討も行い、統合的解釈を試みた。その結果、神経芽腫症例に認められた生殖細胞変異は *ATM* 機能不全をもたらす可能性が示唆された。また、*ATM* 経路の遺伝子欠失と変異は相互排他的であり DNA 損傷応答関連遺伝子の片アレル異常が病態に関与する可能性が示唆され、*PARP* 阻害薬の利用可能性も期待された。

序文

神経芽腫は頭蓋外小児腫瘍の中で最多で、生物学的にヘテロジニアスな腫瘍である。米国 Children oncology group (COG)では年齢、International neuroblastoma staging system (INSS) (1)、International neuroblastoma pathology classification(INPC)、*MYCN*増幅、核型 ploidy を組み合わせてリスク分類を行っている。高リスク群の神経芽腫は最も難治性の小児腫瘍の一つであり(2)、新規治療法の開発が望まれている。

神経芽腫と関連する遺伝子異常として、多くの遺伝子の発現に関わる転写因子である *MYCN* の増幅は最もよく知られているが、これは予後不良因子として臨床的にも重要とされている(3)。そのほかに遺伝子異常としては、*ALK* のチロシンキナーゼドメインの活性型変異が家族例の2%、孤発例の5-10%において認められる(4, 5)。近年、年長児の予後不良症例における *ATRX* の高頻度な変異が報告された(6, 7)。また、*PHOX2B* の機能喪失型生殖細胞変異が孤発例・家族例のいずれにおいても報告されている(8, 9)。さらに、ゲノムワイド関連解析によって、6p22.3 の *FLJ22536*、2q35 の *BARD1* (*BRCA1*-associated RING domain 1)、11p15.4 の *LMO1* の変異は神経芽腫の進展と関連する可能性が指摘されている(10-12)。そのほか神経芽腫に関連する可能性のある生殖細胞変異として、*CHEK2*、*PINK1*、*BARD1* の変異も報告されている(13)。ゲノムコピー数異常としては、神経芽腫の約半数に17qの不均衡増幅が認められるほか、1p、3p、あるいは11qの欠失は進行神経芽腫において頻度が高く、予後不良との関連性が指摘されている(14-16)。

中でも 11q 欠失は進行例の 14-48%に見られ、*MYCN* 増幅例と排他的な傾向があることが知られており(17, 18)、これらの事実から 11q 欠失は神経芽腫に対して異なる病態をもたらしている可能性が推測される。

神経芽腫における 11q 上の標的遺伝子についてはこれまでも検討されてきた。

11q の狭義の共通欠損領域の抽出と遺伝子発現により、11q23 の *CADMI* が病態と関係する可能性が指摘されている(19, 20)。11q の中でも 11q21-24 の領域には *CADMI* に加え *MRE11A*、*ATM*、*KMT2A*、*H2AFX*、*CBL*、*CHEK1*、*ETS1*、*FLI1*、*TP53AIP1* といった多くのがん関連遺伝子が存在するため、この領域はがんゲノムについて検討する際にとくに重要であると考えられる。

このような背景の中で、11q22.3 に位置する *ATM* は 11q 上の標的遺伝子候補の一つであると考えられる。なぜなら、DNA 損傷応答機構において中心的役割を担う分子である。哺乳類の細胞は自然放射線などによる DNA 損傷を常に受け、それは *ATM* や *ATR* によって細胞周期チェックポイント機構、アポトーシス経路、DNA 修復機構に伝えられる(21)。DNA 損傷応答機構はゲノム安定性の維持において必須である。しかしながら、DNA 損傷がその応答機構を担う分子自体に起こると、その機構は破綻し、細胞はゲノム不安定性を得、さらなる複雑な変異が積み重なり、その結果腫瘍発生へとつながっていく(22-25)。*ATM* の異常は様々な悪性腫瘍に関与することが知られている(26-30)。慢性リンパ性白血病では *ATM* の両アレルの異常は予後不良因子となることが知られている(31)。

しかしながら神経芽腫においては、*ATM*との関連性についてのこれまでの報告は限られている。*ATM*のホモ接合性生殖細胞変異を有する毛細血管拡張性運動失調症 (*Ataxia telangiectasia, AT*)では白血病やリンパ腫等を発生しやすいが、神経芽腫合併の報告はほとんどない。染色体不安定性を示す他の疾患における神経芽腫合併に関しては、ファンconi貧血では報告がみられるが(32-35)、ナイミーヘン染色不安定症候群やブルーム症候群においてはまれである(36, 37)。近年、Mandriotaらは神経芽腫において11q欠失症例では*ATM*の発現量が低下していることを確認し、神経芽腫細胞株において*ATM*のsilencingが腫瘍進展に関与することを示し、*ATM*は神経芽腫においてhaploinsufficiencyにより高悪性度に関与するがん抑制遺伝子である可能性があると報告した(38)。一方、*ATM*の変異については、次世代シーケンサーによって神経芽腫222症例の全エクソン解析を行った報告において、アミノ酸変化を伴う*ATM*変異は2例のみ検出されている(13)。しかしながら、腫瘍細胞の変異解析においては、DNA抽出に用いた検体の腫瘍含有量が少ない場合や、様々な変異を有する腫瘍細胞が混在したヘテロジーニアスな腫瘍であるために変異アレルの頻度が低い場合には、次世代シーケンサーによる全エクソン解析の読み取り深度では変異として同定されない可能性も考えられる。*ATM*の生殖細胞変異を有するATでは神経芽腫が高頻度ではないことを考えると、神経芽腫において*ATM*は発症を来すドライバー変異というよりは、進展速度や治療耐性や再発しやすさといった高悪性度に関与するものと予測されるため、少なくとも発症時には、同一個体の腫瘍の中で優勢ではない、すな

わちアレル頻度が低い変異である可能性が高いと推測される。これらの事実をふまえて、十分な読み取り回数が可能となる全エクソターゲットアンプリコンシーケンス解析をATMについて多数例行った文献報告は検索可能な範囲ではこれまでにない。その理由としては、ATMは巨大遺伝子であるため変異解析に労力を要すること、さらに、健常人におけるsingle nucleotide polymorphism (SNP)も多く報告されているため検出された一塩基置換が病的意義のある変異かどうか評価するための機能解析が必要となるが、ATMの機能解析が困難であることなどが考えられる。ATMは発現していても恒常的に活性化状態にあるわけではないこと、下流分子の活性化状態を評価するにも、ATMに制御される分子が多岐にわたることなどから機能解析は困難であると推測される(39)。本研究では次世代シーケンサーによるプールシーケンス法を用いたターゲットアンプリコンシーケンス解析によりATMの全エクソン変異解析を比較的容易に行うことが可能であると考えた。

ATMの異常を利用した治療の一つとして、Poly ADP ribose polymerase (PARP) 阻害薬の使用が挙げられる。PARP阻害剤は1本鎖DNA切断を修復するPARPの機能を阻害する薬剤であるので、2本鎖切断を修復する相同組み換え修復機能が欠損した細胞にPARP阻害剤を加えると、DNA損傷が修復されなくなり合成致死と呼ばれる細胞死が誘導される(40, 41)。相同組み換え修復に関与するBRCA1とBRCA2の機能不全の乳がんや卵巣がんではPARP阻害剤の有効性が報告され臨床試験も進んでいる。子宮頸がんや肺がんの細胞株においてATMは相同組み換え修復に関与することが報告されて

おり(42)、*ATM*機能不全の白血病／リンパ腫に対する有効性も報告されている(40, 41, 43)。

本研究では、*ATM* 変異解析結果をより詳細に解釈するために、網羅的コピー数解析、健常人の *ATM* 変異解析、*ATM* 経路上の他の DNA 損傷応答関連遺伝子のコピー数と変異の解析、さらに機能解析として、*ATM* の発現、*ATM* 経路の活性化状態、*ATM* 変異株の放射線感受性、神経芽腫細胞株の *PARP* 阻害剤の感受性についても合わせて検討を行う方針とした。*ATM* の機能解析が困難であることを考慮し、とくに機能解析に関しては、*ATM* の解析に長年携わっている他の研究室の協力を得ることにより研究を進めることを計画した。

方法と材料

検体

対象は神経芽腫由来細胞株 45 株と神経芽腫臨床検体 159 検体とした。細胞株のうち、SJNB シリーズは A. T. Look (Dana-Farber Cancer Institute)から、UTP-N-1 は A. Inoue (St. Jude Children's Research Hospital)から、PFSK-1、MC-IXC、KAN-TS、SK-PN-DW、KELLY、CHP-212 は Astellas Pharma Inc. (Tokyo, Japan)からそれぞれ供与された。SV40 導入 *ATM* 野生型線維芽細胞 GM0637 と *ATM* 欠損線維芽細胞である *ATM* 細胞株 GM05849C (7009 del TG)は Coriell Cell Repositories (Camden, NJ, USA)から購入した。他の細胞株は JCRB Cell Bank と RIKEN BioResource Center から購入した。細

胞の培養は 10%ウシ胎児血清(Fetal calf serum, FCS)を含む 1ml のダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM)(Life Technologies)当たりおよそ 5×10^5 個を 37°C、5% CO₂ 下で行った。

臨床検体は INSS に基づく病期分類を行った(1)。臨床的特徴を表 1 に掲載した。

159 検体の病期の内訳は stage 4 は 83 例、stage 3 は 28 例、stage 2 は 18 例、stage 4S は 7 例、stage 1 は 23 例であった。進行例 (stage 4 と stage 3) は 111 例を占めた。臨床検体は日本全国多施設で治療前生検あるいは初発治療後に採取され、新鮮凍結組織として保管されたものを用いた。再発腫瘍組織は含まれなかった。具体的な施設としては日本神経芽腫研究グループ(JNBSG)参加医療機関、東京大学医学部附属病院、埼玉県立小児医療センター、太田西ノ内病院である。詳細な病理組織像の情報は全例については得られなかったため本研究の解析項目に含めなかった。研究参加への書面上のインフォームドコンセントは患者の親から得た。遺伝子解析は東京大学倫理委員会の承認 (承認番号: 1598-9)を受けて施行された。なお本研究の説明文書には「本研究の目的は多数症例の遺伝子の情報を相互に比較解析することによって達成されるものであり、得られる情報が個々の提供者の状態を評価するための情報としての精度や確実性に欠ける可能性があるため、たとえ生殖細胞を起源とする変異と考えられるものが同定された場合にも提供者本人やその家族に解析結果は知らせない」と明記している。

表1 臨床検体の特徴

| 検体ID | 性別 | 診断時月齢 | INSS 病期 | 転帰 | 観察期間 (月) |
|--------|----|-------|---------|----|-------------|
| NB_001 | M | 0 | 4S | D | 1 |
| NB_002 | M | 4 | 1 | A | 51 |
| NB_003 | M | 32 | 4 | D | 34 |
| NB_004 | F | 40 | 4 | D | 24 |
| NB_005 | F | 61 | 2 | A | 47 |
| NB_006 | F | 54 | 4 | D | 14 |
| NB_007 | F | 0 | 3 | A | 47 |
| NB_008 | F | 16 | 4 | D | 39 |
| NB_009 | M | 24 | 3 | A | 42 |
| NB_010 | M | 29 | 4 | D | 17 |
| NB_011 | M | 0 | 3 | A | 41 |
| NB_012 | M | 44 | 4 | A | 43 |
| NB_013 | F | 139 | 4 | A | 37 |
| NB_014 | M | 29 | 3 | U | U |
| NB_015 | F | 0 | 3 | A | 36 |
| NB_016 | M | 0 | 1 | A | 35 |
| NB_017 | M | 11 | 4 | A | 36 |
| NB_018 | M | 25 | 1 | A | 27 |
| NB_019 | M | 101 | 4 | A | 35 |
| NB_020 | M | 0 | 1 | A | 36 |
| NB_021 | F | 35 | 4 | A | 34 |
| NB_022 | F | 31 | 4 | A | 36 |
| NB_023 | F | 44 | 2 | A | 28 |
| NB_024 | M | 7 | 3 | A | 24 |
| NB_025 | M | 0 | 1 | A | 27 |
| NB_026 | F | 2 | 4S | A | 28 |
| NB_027 | F | 24 | 4 | D | 9 |
| NB_028 | M | 16 | 1 | A | 24 |
| NB_029 | M | 31 | 2 | A | 6 |
| NB_030 | M | 20 | 3 | A | 33 |
| NB_031 | M | 20 | 4 | A | 19 |
| NB_032 | M | 1 | 4S | A | 28 |
| NB_033 | M | 54 | 4 | A | 17 |
| NB_034 | M | 42 | 4 | A | 32 |
| NB_035 | M | 72 | 2 | A | 26 |
| NB_036 | M | 16 | 1 | A | 26 |
| NB_037 | M | 51 | 4 | A | 23 |
| NB_038 | M | 7 | 4 | A | 33 |
| NB_039 | F | 2 | 4 | A | 24 |
| NB_040 | M | 4 | 1 | A | 24 |
| NB_041 | M | 23 | 4 | A | 29 |
| NB_042 | F | 7 | 4 | D | 24 |
| NB_043 | F | 39 | 4 | D | 17 |
| NB_044 | M | 239 | 4 | A | 0 |
| NB_045 | M | 50 | 4 | A | 30 |
| NB_046 | M | 32 | 4 | A | 30 |
| NB_047 | M | 27 | 4 | A | 29 |
| NB_048 | F | 28 | 4 | A | 28 |
| NB_049 | M | 6 | 1 | A | 31 |
| NB_050 | M | 34 | 4 | A | 29 |
| NB_051 | F | 174 | 4 | D | 10 |
| NB_052 | F | 13 | 2 | A | 22 |

| | | | | | |
|--------|---|-----|----|---|----|
| NB_053 | M | 5 | 4S | A | 21 |
| NB_054 | F | 80 | 4 | A | 15 |
| NB_055 | F | 6 | 1 | A | 29 |
| NB_056 | F | 43 | 4 | A | 30 |
| NB_057 | M | 20 | 4 | D | 8 |
| NB_058 | M | 66 | 4 | A | 28 |
| NB_059 | M | 19 | 4 | A | 31 |
| NB_060 | M | 6 | 3 | A | 27 |
| NB_061 | F | 8 | 2 | A | 25 |
| NB_062 | M | 71 | 3 | A | 24 |
| NB_063 | F | 32 | 3 | D | 11 |
| NB_064 | F | 37 | 3 | A | 26 |
| NB_065 | F | 186 | 4 | A | 27 |
| NB_066 | M | 52 | 4 | D | 22 |
| NB_067 | M | 32 | 4 | A | 28 |
| NB_068 | M | 150 | 2 | A | 27 |
| NB_069 | M | 75 | 1 | A | 27 |
| NB_070 | M | 7 | 1 | A | 27 |
| NB_071 | M | 2 | 4S | D | 5 |
| NB_072 | F | 6 | 2 | A | 26 |
| NB_073 | F | 29 | 4 | D | 10 |
| NB_074 | F | 5 | 1 | A | 27 |
| NB_075 | F | 50 | 2 | A | 26 |
| NB_076 | F | 14 | 4 | A | 11 |
| NB_077 | M | 45 | 4 | A | 26 |
| NB_078 | M | 5 | 4 | A | 28 |
| NB_079 | M | 28 | 4 | A | 23 |
| NB_080 | F | 2 | 1 | A | 25 |
| NB_081 | M | 34 | 1 | A | 22 |
| NB_082 | M | 18 | 3 | A | 25 |
| NB_083 | F | 15 | 2 | A | 6 |
| NB_084 | M | 29 | 4 | A | 27 |
| NB_085 | M | 19 | 2 | A | 23 |
| NB_086 | F | 12 | 3 | A | 24 |
| NB_087 | M | 37 | 4 | A | 6 |
| NB_088 | M | 1 | 1 | A | 22 |
| NB_089 | F | 0 | 1 | A | 23 |
| NB_090 | M | 57 | 3 | A | 27 |
| NB_091 | F | 51 | 4 | A | 24 |
| NB_092 | M | 20 | 4 | A | 24 |
| NB_093 | M | 37 | 4 | A | 23 |
| NB_094 | M | 58 | 4 | A | 25 |
| NB_095 | F | 5 | 4S | A | 15 |
| NB_096 | F | 34 | 4 | A | 23 |
| NB_097 | M | 19 | 2 | A | 25 |
| NB_098 | F | 27 | 3 | A | 15 |
| NB_099 | F | 39 | 3 | A | 18 |
| NB_100 | M | 8 | 3 | A | 23 |
| NB_101 | M | 26 | 4 | A | 24 |
| NB_102 | F | 20 | 4 | A | 22 |
| NB_103 | M | 18 | 4 | D | 6 |
| NB_104 | M | 6 | 4 | A | 20 |
| NB_105 | F | 46 | 4 | D | 16 |
| NB_106 | M | 187 | 4 | A | 23 |
| NB_107 | F | 22 | 2 | A | 12 |

| | | | | | |
|--------|---|-----|----|---|-----|
| NB_108 | F | 37 | 4 | A | 12 |
| NB_109 | M | 34 | 4 | A | 11 |
| NB_110 | M | 11 | 4 | A | 12 |
| NB_111 | M | 30 | 4 | A | 13 |
| NB_112 | M | 25 | 4 | A | 13 |
| NB_113 | F | 54 | 4 | A | 13 |
| NB_114 | M | 8 | 4 | A | 14 |
| NB_115 | M | 45 | 4 | A | 18 |
| NB_116 | M | 2 | 2 | A | 12 |
| NB_117 | M | 9 | 4 | A | 12 |
| NB_118 | M | 7 | 3 | A | 188 |
| NB_119 | M | 4 | 1 | A | 68 |
| NB_120 | F | 43 | 3 | A | 64 |
| NB_121 | M | 5 | 3 | A | 143 |
| NB_122 | M | 9 | 1 | A | 39 |
| NB_123 | M | 37 | 3 | A | 205 |
| NB_124 | F | 7 | 2 | A | 32 |
| NB_125 | M | 8 | 1 | A | 76 |
| NB_126 | F | 3 | 3 | A | 45 |
| NB_127 | M | 34 | 3 | A | 189 |
| NB_128 | F | 5 | 3 | D | 10 |
| NB_129 | M | 18 | 3 | A | 86 |
| NB_130 | M | 51 | 4 | A | 125 |
| NB_131 | M | 100 | 4 | D | 44 |
| NB_132 | F | 107 | 4 | A | 234 |
| NB_133 | F | 47 | 4 | A | 73 |
| NB_134 | M | 50 | 4 | D | 16 |
| NB_135 | M | 11 | 4 | D | 10 |
| NB_136 | M | 33 | 4 | A | 114 |
| NB_137 | F | 35 | 4 | D | 46 |
| NB_138 | M | 48 | 4 | D | 58 |
| NB_139 | M | 128 | 4 | D | 52 |
| NB_140 | M | 50 | 4 | A | 128 |
| NB_141 | M | 58 | 4 | A | 129 |
| NB_142 | M | 20 | 4 | D | 19 |
| NB_143 | M | 0 | 4S | A | 59 |
| NB_144 | M | 105 | 4 | A | 124 |
| NB_145 | M | 8 | 3 | A | 156 |
| NB_146 | M | 4 | 3 | A | 61 |
| NB_147 | F | 25 | 4 | D | 5 |
| NB_148 | F | 0 | 4 | A | 87 |
| NB_149 | F | U | 4 | U | U |
| NB_150 | M | 7 | 2 | A | 8 |
| NB_151 | F | 15 | 4 | A | 122 |
| NB_152 | M | 8 | 2 | A | 160 |
| NB_153 | M | 6 | 1 | A | 189 |
| NB_154 | M | 8 | 2 | A | 22 |
| NB_155 | M | 7 | 3 | A | 65 |
| NB_156 | M | 29 | 4 | D | 17 |
| NB_157 | M | 39 | 4 | A | 4 |
| NB_158 | M | 7 | 1 | A | 83 |
| NB_159 | M | 6 | 1 | A | 90 |

M, 男性; F, 女性; U, 不明; A, 生存; D, 死亡

検出された変異の起源を明らかにするために、神経芽腫 9 症例の非腫瘍組織を使用した。さらに腫瘍に検出された *ATM* 変異の病的意義を検討するために健常な日本人の *ATM* 変異解析も行うこととし、171 名のボランティアの末梢血液由来単核球を使用した。これらの検体から DNA を抽出し解析に用いた。DNA 抽出は市販のキットを用いた。DNA 抽出を行った時期と施設が一定していないため、実際に使用したキットの商品名は統一されていない。

SNP アレイを用いた網羅的なコピー数およびアレル不均衡の解析

細胞株 39 株と臨床検体 159 検体について、Affymetrix GeneChip 50K/250K array (Affymetrix) 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。解析は Affymetrix 社のプロトコールに準じて行った。スキャンされたアレイ情報を GTYPE ソフトウェア (Affymetrix) によって SNP タイピングを行い、CNAG/AsCNAR アルゴリズム(<http://www.genome.umin.jp>)を用いてコピー数およびアレル不均衡の解析を行った。250K を用いて解析したアレイデータにおいては、Genomic Identification of Significant Targets in Cancer (GISTIC) 解析(44)を行った。

高解像度融解曲線分析 (High Resolution Melting, HRM)

細胞株 11 株の *ATM* について、LightCycler® 480 High Resolution Master (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) と LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) を用いて高解像度融解曲線分析を行った。これはリアルタイム PCR 装置を用いて行われる遺伝子変異解析法の一つであり、反応産物の二本鎖 DNA の 50% が一本鎖 DNA に解離する温

度 (Tm 値) を測定する融解曲線分析の応用解析である。増幅配列中に一塩基でも差異があればその増幅産物の持つ Tm 値に差が生じることを利用し、精密な融解曲線を得ることで、増幅配列中に存在する変異を検出する。検出された一塩基置換の「変異」としての採用基準として、イントロンの変異とアミノ酸変化を伴わない変異は除外し、SNP 登載のある一塩基置換については頻度 0.01 未満の場合のみ採用した。Catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC) に登載されており SNP 登載もされている場合にも同様に頻度 0.01 未満の場合のみ採用した。SNP 登載とそのアレル頻度の確認には National Center for Biotechnology Information (NCBI) Database SNP (dbSNP) build 131/132、1000 Genomes Project、Human Genetic Variation Database (HGVD) を用いた。HGVD は 1208 名の日本人のエクソーム解析によって検出された遺伝子変異を含んでいる。

ターゲットアンプリコンシーケンス解析

対象遺伝子 (後述) の全コーディングエクソン領域について、Hiseq2000 あるいは Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてプールシーケンス法(45)によるターゲットアンプリコンシーケンス解析を行った。臨床検体については、十分量の DNA を得るために全ゲノム増幅を REPLI-g kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) を用いて行った。まず、対象遺伝子のコーディング領域をカバーするプライマーを設計した (表 2)。

表2 ターゲットアンプリコンシーケンス解析で使用したプライマー

| 遺伝子 | Exon | Forward | Reverse |
|---------------|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>ALK</i> | 20 | AAGCGGCCGCAGGAAGTGGCCTGTGTAGTG | AAGCGGCCGCATAACATTTCAGCCCCTACAC |
| | 21-22 | AAGCGGCCGCTGACTCTGTCTCCTCTTGTGTC | AAGCGGCCGCTTAGAAACCTCTCCAGGTTT |
| | 23 | AAGCGGCCGCAAGATTTGCCAGACTCAGC | AAGCGGCCGCTGTCTTGGCACAACTG |
| | 24 | AAGCGGCCGCAGATTTCCCTCCTCTCACTG | AAGCGGCCGCATGTGAGCCCTTGAGATCTG |
| | 25 | AAGCGGCCGCTAGTGATGGCCGTTGTACAC | AAGCGGCCGCCCAGGAGATGATGTAAGGGA |
| | 26 | AAGCGGCCGCGGCAGATGCTTAATGCCATC | AAGCGGCCGCTCCCGGCTTAGAGTATAGA |
| | 27 | AAGCGGCCGCTGGGTGTGTCTATATCCATC | AAGCGGCCGCTAACTAGCAGAAGTGTTC |
| | 28 | AAGCGGCCGCCCTCAACGTATTCTGTTGCA | AAGCGGCCGCACTCTGACTGGCTTGACCTA |
| <i>BARD1</i> | 1 | AAGCGGCCGCAAGAGCTTGGCCGGTTTC | AAGCGGCCGCATTTGAAAAGATTCTGCCGC |
| | 2 | AAGCGGCCGCCAGGGAGTAACAGCCTTTC | AAGCGGCCGCTCATCCTCTTTGAGCTTTGG |
| | 3 | AAGCGGCCGCTCTGTCTCCATTTATTCTGTTC | AAGCGGCCGCATACGTATTCCAGAACTCCAGATAG |
| | 4-1 | AAGCGGCCGCAAAACAAAATTCTTCGGGAGC | AAGCGGCCGCTTCATTCTGTCTTAGTGTCTG |
| | 4-2 | AAGCGGCCGCCAACCATCTGTATCTCCAGTCC | AAGCGGCCGCGGAAGTATCATGTCTGTGAAAGG |
| | 5 | AAGCGGCCGCTCAATATTTTCTTTCTTTCC | AAGCGGCCGCAAGAGTATATGTGGCAGAGGATG |
| | 6 | AAGCGGCCGCAATATCATCCATTGCTCTTTCTTATC | AAGCGGCCGCAAGTCTGCTTTATCACACACCTTG |
| | 7 | AAGCGGCCGCTTTTGATTCTAGATTCTTCTGCC | AAGCGGCCGCTCCACAGTAGCTAATACTCAGGAAG |
| | 8 | AAGCGGCCGCTGCCCTGGGTATAGAGAGC | AAGCGGCCGCGCAAAGTATACAGCCATCTCCC |
| | 9 | AAGCGGCCGCTTTTCATATTGATGGCCAGG | AAGCGGCCGCCATCAAGTTCCTTAATCACAGGC |
| | 10 | AAGCGGCCGCAATGAGAGAGATATAGTGTCACTTG | AAGCGGCCGCCCTGTAGCTGTTGAAAGGGC |
| 11 | AAGCGGCCGCTGAGCCTCATCCTTAAGATACC | AAGCGGCCGCCCTTTAAAAGCAATCCCAGC | |
| <i>MRE11A</i> | 2 | AAGCGGCCGCCCTTGTGCAGCGTAAATCATG | AAGCGGCCGCACCTCAGATGATCCCCTAG |
| | 3 | AAGCGGCCGCGCTGGGTTACATGAGTTTG | AAGCGGCCGCTCGAATAGACACTGCCACAGG |
| | 4 | AAGCGGCCGCTGGCCTGAATCAGAGACTTG | AAGCGGCCGCCAAGTAATCCTCCCACCTCAG |
| | 5 | AAGCGGCCGCGCAATAAGTGATAGAGCTGGGAG | AAGCGGCCGCCCTCTACTCTGGCTTCTTATTG |
| | 6 | AAGCGGCCGCCAGTTGCTGTAGGTGATTTG | AAGCGGCCGCCCTTCTGTCTTTCACTTGC |
| | 7 | AAGCGGCCGCAGAACCTGCAACATACCCA | AAGCGGCCGCATGCTTCCCTTTGGGATAG |
| | 8 | AAGCGGCCGCTCTCAAGGTCAGGAGTTAGC | AAGCGGCCGCGAATTTGCCTAATGAGCAGC |
| | 9 | AAGCGGCCGCGCTTTTCGTTTGACATCACC | AAGCGGCCGCACAGTGTCTTACAGGCTTC |
| | 10 | AAGCGGCCGCCCTAAATCTTCTGGTGAGTCTCC | AAGCGGCCGCTCCGATGGTGATTGCTCTTC |
| | 11 | AAGCGGCCGCTCAGATGGTTTGTCTGGTAGG | AAGCGGCCGCATGCAACAAACCTGCACG |
| | 12 | AAGCGGCCGCGCTGGCAGTTGCTAAAGTTTGG | AAGCGGCCGCGCTTACCATCATTGGCTG |
| | 13 | AAGCGGCCGCGGACTCCATATCTTAGCCATC | AAGCGGCCGCTCCACTGCTTCTTGTCTAG |
| | 14 | AAGCGGCCGCATTTACAGAGCCTCCTGG | AAGCGGCCGCCACTGCACTTGTAAACAGG |
| | 15 | AAGCGGCCGCCACTGTGTTCAGCTCCTTTATG | AAGCGGCCGCCGTGACAAACACAGTGAAGC |
| | 16 | AAGCGGCCGCGTCCAGCCTATTTCTTAC | AAGCGGCCGCGCTTACCCTTTCAGTAACTC |
| | 17 | AAGCGGCCGCGCATTGAGTTATGCGTACC | AAGCGGCCGCTAGGGCAAACCACATGGATC |
| | 18 | AAGCGGCCGCATGAAGAGGGACATTGGAGG | AAGCGGCCGCAGTCTAGGGCAGAGAATGAG |
| | 19 | AAGCGGCCGCTTGTCTAAAGCCACATAGG | AAGCGGCCGCACCTCAGCATCACGCAATTC |
| | 20 | AAGCGGCCGCATACATGCACACACAGCAGG | AAGCGGCCGCGCTTTCCCTCAACTTTGG |
| | <i>ATM</i> | 2 | AAGCGGCCGCCCAGAATGTGCCTCTAATTG |
| 3 | | AAGCGGCCGCGATCTGCTTATCTGTGTC | AAGCGGCCGCCCTGTCCAGCAATCAGTTGTG |
| 4 | | AAGCGGCCGCTTTGTGATGGCATGAACAGC | AAGCGGCCGCCAAACTTATGCAACAGTTAAGTCC |
| 5 | | AAGCGGCCGCCATAATTTGCCAATTTCTTCTC | AAGCGGCCGCAGACAGAGTGTCTTTCTTTGGTG |
| 6 | | AAGCGGCCGCTCTGTATGGGATTATGGAATATTTAAG | AAGCGGCCGCCCTGAGTCTAAAACATGGTCTTGC |
| 7 | | AAGCGGCCGCTCAGCATACACTTCATAACTGTTC | AAGCGGCCGCTGGCTAAGTAACATTATCAACCAGAG |
| 8 | | AAGCGGCCGCTTTTGTGGGAGCTAGCAGTG | AAGCGGCCGCTTTTAAAAGCCCCAAAATGCC |
| 9 | | AAGCGGCCGCAGATCGTGTCTGTTCCTCC | AAGCGGCCGCGGTTGAGATGAAAGGATTCCAC |
| 10 | | AAGCGGCCGCTATGGAATGATGGTGATTCTC | AAGCGGCCGCTGATCAGGGATATGTGAGTGTG |
| 11 | | AAGCGGCCGCAAGTCTTTGCCCTCCAATAG | AAGCGGCCGCGGAGAGAGCCTGATAAAACAAAC |
| 12 | | AAGCGGCCGCGTTGTCTCTCTTAAATTGTCC | AAGCGGCCGCAAAACAACCTCTTCCCTGGC |
| 13 | | AAGCGGCCGCAATTTGCTACTGAATAATGACATTTG | AAGCGGCCGCCCTGCCCTATTTCTCCTTCC |
| 14 | | AAGCGGCCGCAGCTATCCAGGATATGCCAC | AAGCGGCCGCTGTAACAAACCTGCATGCT |
| 15 | | AAGCGGCCGCTTTGCAAGAACAGAGTATAAGATTTG | AAGCGGCCGCCCTGGAAACCAGGAGGTCAAG |
| 16 | | AAGCGGCCGCAAGATAGAGAAAACACTGTCTGCC | AAGCGGCCGCCACCTGGCCTTAATTTCCAC |
| 17 | | AAGCGGCCGCATGTGAGCCACTGTGCC | AAGCGGCCGCAAGAAAGGAACAATCCTAAAAGG |

| | | |
|--------------|--|---------------------------------------|
| 18 | AAGCGGCCGCGACTATATATGGCTGTTGTGCC | AAGCGGCCGCTCTTCAAAGACACCATGTGATTC |
| 19-20 | AAGCGGCCGCCCGGCCTATGTTTATATAC | AAGCGGCCGCCATTCTGATCCACAGATAGC |
| 21-22 | AAGCGGCCGCGTTTAGCACAGAAAGACATATTGG | AAGCGGCCGCTTGAACCTGTGAGCTGTTACTATG |
| 23 | AAGCGGCCGCTGCTTTGGAAAGTAGGGTTTG | AAGCGGCCGCAATCAATTCATACAGTTGTTTTAGAGC |
| 24 | AAGCGGCCGCAAAATCTGGAGTTCAGTTGGG | AAGCGGCCGAGTGCCACTCAGAAAATCTAGC |
| 25 | AAGCGGCCGCGAGGAAATCAAGAAAAGTTGAATG | AAGCGGCCGCTGGTATGTGTGTTGCTGGTG |
| 26 | AAGCGGCCGCTTAAATGTGATGGTATTAACAG | AAGCGGCCGCTGGGTTGGCTATGCTAGATAATG |
| 27 | AAGCGGCCGCTGAGCTGTCTTGACGTTTAC | AAGCGGCCGCTGAAGGTGTCAACCAATAAACTTC |
| 28 | AAGCGGCCGCTGAAAGTTCAGTGGTCTATG | AAGCGGCCGCTGCTCACATATGGCAAGAAG |
| 29 | AAGCGGCCGCAAAAGTGTATTTATTGTAGCCGAGTATC | AAGCGGCCGCGCGGACAGAGTGAGTCTTTG |
| 30 | AAGCGGCCGCGCATATAAGAATTAGAGATGCTGAAC | AAGCGGCCGCAAAACTCAAATCCTTCTAACAATAC |
| 31 | AAGCGGCCGCCACAGAACTAAAAGCTGGGTATC | AAGCGGCCGCATAGGCATGAGCCAATGTGC |
| 32 | AAGCGGCCGCGGTTTGCAGTGAAAGAAATC | AAGCGGCCGCTGACAATGAAACCAAGAGCAA |
| 33 | AAAGCGGCCGCTTGCTAATCACTTCAAAGAATC | AAGCGGCCGCCATTGCGTGAACATCACAG |
| 34 | AAGCGGCCGCACTCGGCCCTAAGGTTAATTC | AAGCGGCCGAGTGTCTGGCACATAGTAGG |
| 35 | AAGCGGCCGCCAGTGGAGGTTAACATTCATCAAG | AAGCGGCCGCCCTGGATTTATGAAATATGGC |
| 36 | AAGCGGCCGCGAAAGGTACAATGATTCCAC | AAGCGGCCGCTTACAACAGTTTGAGTGGGG |
| 37 | AAGCGGCCGCTGGCCTAGACTGAAATAAACAG | AAGCGGCCGCTCTGTAAAGTGTCTTTAGTGGG |
| 38 | AAGCGGCCGCAAGGAAGAAGGTGTGTAAGCAAG | AAGCGGCCGCTCATGTTAAAATTCAGCCGATAG |
| 39 | AAGCGGCCGCTCAACATGCTTTTATTTGATATTG | AAGCGGCCGCATACCTTATTGAGACAATGCC |
| 40 | AAGCGGCCGCTACAAAATTCCTTTCCATCC | AAGCGGCCGCTGATGCTTAGTCCAGTAAGTAAATTC |
| 41-42 | AAGCGGCCGCTTGGGAGTTACATATTGGTAATGATAC | AAGCGGCCGCCCAACTACTGAAATAACCTCAGC |
| 43 | AAGCGGCCGCCACCCAGCTGATATTTGGG | AAGCGGCCGCCAGTTGTTGTTTGAATGAGGAGAG |
| 44 | AAGCGGCCGCTTGCTCTTGGTGAAGCTATTTATAC | AAGCGGCCGCTTTCATCAATGCAAATCCTTAC |
| 45 | AAGCGGCCGCAAACTTTATTTCCCTGAAAACCTC | AAGCGGCCGCTCACTATTGGTAAACAGAAAAGCTG |
| 46 | AAGCGGCCGCTTGACCGCATAGCATTTTG | AAGCGGCCGCGCCCAAGGCTTAAAAGTCAG |
| 47 | AAGCGGCCGCGACAGATAGGCAGACGTGGG | AAGCGGCCGCCGACCACATGATGGACTGATAG |
| 48 | AAGCGGCCGCAAGGCAGTTGGGTACAGTC | AAGCGGCCGCTGTTTACTCCACCTAGAGAC |
| 49 | AAGCGGCCGCTGGGTTGGACAAGTTTGC | AAGCGGCCGCCGAAAAGAACCCTAAAAGAC |
| 50 | AAGCGGCCGCTTCCCTTATAATCCTTAGAAGTTTG | AAGCGGCCGCTGTGTAGAGCACTGGACCAAG |
| 51 | AAGCGGCCGCCACTTGTGCTAATAGAGGAGC | AAGCGGCCGCGAGGCCTATGAGGAATTAGAGAG |
| 52 | AAGCGGCCGCCGCTTACCCTGACAGTATC | AAGCGGCCGCTTGAACCGATTTTATAGATGGC |
| 53 | AAGCGGCCGCAACTCTGAGAAGTTAAATGTTGGG | AAGCGGCCGCAAAATTAAGCTTTTGGATTACGTTTG |
| 54 | AAGCGGCCGCGCCAGTGGTATCTGCTGAC | AAGCGGCCGCGCAATATTTAACCAATTTTGACC |
| 55 | AAGCGGCCGCTCACATCGTCATTTGTTCTCTG | AAGCGGCCGCAAGACAAAATCCCAAATAAAGCAG |
| 56 | AAGCGGCCGCATTTGGTTTGTAGTGCCCTTTG | AAGCGGCCGCATATGGGCATGAGCCACTTC |
| 57 | AAGCGGCCGCAAAATGCTTTGCACTGACTCTG | AAGCGGCCGCTTGACAATTACCTGATGAAATTAAG |
| 58 | AAGCGGCCGCCATCTTTATTGCCCTATATCTGTCT | AAGCGGCCGCAAAATAAAACCTGCCAAACAAC |
| 59 | AAGCGGCCGCCGTTATGCACATCATTTAAGTAG | AAGCGGCCGCTTGGTAGGCAACAACATTCC |
| 60 | AAGCGGCCGCTTCTAAGTAAAGAAAGTAAATTAGC | AAGCGGCCGCTGCAAAGAACCATGCC |
| 61 | AAGCGGCCGCGACATAGGCTCAGCATACTACAC | AAGCGGCCGCTGAAGCAGTGCTCTTTCACATC |
| 62-63 | AAGCGGCCGCTGTGCATGATGTTTGTCTCC | AAGCGGCCGCAAGAGTAAAGCAGAGATGTTCC |
| <i>H2AFX</i> | 1 AAGCGGCCGCTTAAACCGCAACCAACCGGAG | AAGCGGCCGCTCAGCTCTTCCATGAGG |
| <i>CHEK1</i> | 2 AAGCGGCCGCGGCTTCACTGGTGATCTTACTCTC | AAGCGGCCGCTGTCCCTTCCAGCTCTCTAC |
| | 3 AAGCGGCCGCCCTTGGTTTCTCCTTTGTGG | AAGCGGCCGCGAAAGGACAACGACCAAATAGC |
| | 4 AAGCGGCCGAGTCATGGCTTGCATTCTTG | AAGCGGCCGCACCTGATCCGCATTGTATTG |
| | 6 AAGCGGCCGCTGGTCCAGACTGTCTGTG | AAGCGGCCGCGAGGATTGCTTGTAGCCTAG |
| | 7 AAGCGGCCGCTGCCATGCCTATCCTGATTC | AAGCGGCCGCGCAGAGTCTGGGACTAAAGAG |
| | 8 AAGCGGCCGCTCCAAGATACAGCAGCAGAG | AAGCGGCCGCTTCCCTGTCCCTTAGACTTG |
| | 9 AAGCGGCCGCTCTGAGCATACTCCACTTTG | AAGCGGCCGCTGGCTGAGAAGTGGAGTAC |
| | 10 AAGCGGCCGCTCTCCAGTAAACAGTGCTTC | AAGCGGCCGCCCTCCCTCCTCTCTTTCTTC |
| | 11 AAGCGGCCGCGAAGAAAGAGAGGAGGGAGG | AAGCGGCCGCTACAGGTGTGAGCCACAG |
| | 12 AAGCGGCCGAGTAGTGGGATTGCTGGAAC | AAGCGGCCGCGCCTCCAGGTTCAAATGATTC |
| | 13 AAGCGGCCGCTGGGCATGAAACCACATCAG | AAGCGGCCGCTGGTTTCCACCAGATGAGTTTC |
| <i>TP53</i> | 2-3 AAGCGGCCGCTGACCCAGGGTTGGAAG | AAGCGGCCGCTGGGTGAAAAGAGCAGTCAG |
| | 4 AAGCGGCCGCCGTTCTGGTAAGGACAAGGG | AAGCGGCCGCGGAATCCCAAAGTTCCAAAC |
| | 5-6 AAGCGGCCGCTAGTGGGTTGCAGGAGGTG | AAGCGGCCGCTCATGGGTTATAGGAGGTC |

| | | | |
|--------------|------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | 7 | AAGCGGCCGCCCTCCCCTGCTTGCCAC | AAGCGGCCCGAGGTGGATGGGTAGTAGTATGG |
| | 8-9 | AAGCGGCCGCTGGTTGGGAGTAGATGGAGC | AAGCGGCCCGCCCCAATTGCAGGTA AAAAC |
| | 10 | AAGCGGCCGCTCAAACAATTGTAACCTGAACCATC | AAGCGGCCCGCGCAGGATGAGAATGGAATC |
| | 11 | AAGCGGCCCGGGAAAAGGGGCACAGAC | AAGCGGCCCGCAAGCAAGGGTTCAAAGAC |
| <i>BRCA1</i> | 2 | AAGCGGCCCGGGTTGGCAGCAATATGTG | AAGCGGCCCGAGTGGATGGAGAACAAGG |
| | 3 | AAGCGGCCGCAAATATTGAACGAACTTGAGGC | AAGCGGCCCGGTGTTTCTGGGTATGAAG |
| | 4 | AAGCGGCCCGGCTCTTAAGGGCAGTTGTG | AAGCGGCCGCAAACCTTCAGGAAAATAACTTTGG |
| | 5 | AAGCGGCCGCTTGATTATAGAGGTTTTCTACTGTTGC | AAGCGGCCGCAAAGGTTTATCACCACGTCATAG |
| | 6 | AAGCGGCCGCTGTCTTAACACAACAAGAGCATAAC | AAGCGGCCCGGAGGACTGCTTCTAGCCTGG |
| | 7 | AAGCGGCCGCTTCTCTCAGGAGGAAAAGCAC | AAGCGGCCGCTTGGCAAACCTATAAGATAAGGAATC |
| | 8 | AAGCGGCCGCTAGCATTGTACTGCCACAG | AAGCGGCCGCTGCACATACATCCCTGAACC |
| | 9 | AAGCGGCCGCTGGTCATTTGACAGTTCTGC | AAGCGGCCCGAGGTCCCAAATGGTCTTCAG |
| | 10-1 | AAGCGGCCCGTTGATTTCCACCTCCAAGG | AAGCGGCCGCCATCAGCTACTTTGGCATTTG |
| | 10-2 | AAGCGGCCGCTGCCATGCTCAGAGAATCC | AAGCGGCCCGAGCTTTCGTTTTGAAAGCAG |
| | 10-3 | AAGCGGCCCGCAAAGAAAGCAGATTTGGCAG | AAGCGGCCGCTTCTTCTTGGAAAGGCTAGG |
| | 10-4 | AAGCGGCCCGGAGCCAAGAAGAGTAACAAGCC | AAGCGGCCCGGACCCAGAGTGGGCAGAG |
| | 10-5 | AAGCGGCCCGCAGAAATACATTCAAGGTTTCAAAG | AAGCGGCCGCTCATAAATACTGGAGCCCACTTC |
| | 10-6 | AAGCGGCCCGCAGTGAGCACAATTAGCCG | AAGCGGCCGCAAGCAGGGAAGCTCTTCATC |
| | 10-7 | AAGCGGCCCGGAGTCTTAGCCCTTACC | AAGCGGCCGCTGCTCCCCAAAAGCATAAAC |
| | 11 | AAGCGGCCCGCAGCAAGTTGCAGCGTTTATAG | AAGCGGCCGCTGAATGCAAAGGACACCAC |
| | 12 | AAGCGGCCGCTAAAAGGTGTTAGCTAGAACTTG | AAGCGGCCCGGACAAGAACCAAGGCTCC |
| | 13 | AAGCGGCCCGATGCTGGGTCACGTTGTAG | AAGCGGCCCGGGAAGGCTCAGATACAAACAC |
| | 14 | AAGCGGCCGCTGTGTATCATAGATTGATGCTTTTG | AAGCGGCCCGCAATAAAAGTGTATAAATGCCTG |
| | 15 | AAGCGGCCCGCAGCTGGGAGATATGGTGC | AAGCGGCCCGACACCAAGACTCCCTCATCC |
| | 16 | AAGCGGCCGCAATTCTTAACAGAGACCAGAACTTTG | AAGCGGCCGCTGACAATACCTACATAAAACTCTTTCC |
| | 17 | AAGCGGCCCGCACTTTAAATAGTTCCAGGACACG | AAGCGGCCCGCCCTCATGTGGTTTTATGC |
| | 18 | AAGCGGCCGCTCCAGATTGATCTTGGGAGTG | AAGCGGCCGCTGTAACCTCAGACTCAGCATCAG |
| | 19 | AAGCGGCCCGCGCTGACCTCTCTATCTCCG | AAGCGGCCCGGTGCATTGATGGAAGGAAG |
| | 20 | AAGCGGCCGCTGTCTGCTCCACTTCCATTG | AAGCGGCCGCTGGAATACAGAGTGGTGGGG |
| | 21 | AAGCGGCCCGCAGCAGAAATCATCAGGTG | AAGCGGCCGCTTACGAATCTGAGGAACCC |
| | 22 | AAGCGGCCCGGTAGAGGGCCTGGGTTAAG | AAGCGGCCCGCCAGTCTTGCTCACAGGAG |
| | 23 | AAGCGGCCGCTGAAGTGACAGTTCCAGTAGTCC | AAGCGGCCGCAAACCAAACCCATGCAAAAAG |
| | 24 | AAGCGGCCCGCAGGACCCTGGAGTCGATTG | AAGCGGCCGCAATAATGAATCAGCATCTTGCTC |
| <i>CHEK2</i> | 2 | AAGCGGCCGCAAAGCTCAGCCCAGAAGAAC | AAGCGGCCCGACTTTGCTACAAGGGCTCTG |
| | 3-1 | AAGCGGCCGCTCCCGGTTTCAAGCGATTCC | AAGCGGCCCGCATGGTGCTCACACTCTTATC |
| | 3-2 | AAGCGGCCGCTGGCTTCCCAAAGTGTTAGG | AAGCGGCCGCAAGGGAAGACCCACAGCTAAC |
| | 4 | AAGCGGCCGCTCCTGAGTAGCTGAGACCAC | AAGCGGCCCGCCATTGCCACTGTGATCTTC |
| | 5 | AAGCGGCCGCTGACAACACTGTTGGGAGG | AAGCGGCCCGACCACGCCAGCAACTTACTC |
| | 6 | AAGCGGCCGCTGGGCTGTTGTAATCTGC | AAGCGGCCGCAACACCCTGTCTCACAAG |
| | 7 | AAGCGGCCCGACTTGAAGTGGACCCAGGAG | AAGCGGCCCGCCATATTACCCAGAACAGC |
| | 8 | AAGCGGCCGCTTGAACCTCAGGCAGCCTTG | AAGCGGCCGCTAGGGTTACAGGCATCAGC |
| | 9 | AAGCGGCCGCTGGGAGATGTTCTAAGCTC | AAGCGGCCCGCAGGACCTGGAATCCCATAC |
| | 10 | AAGCGGCCGCTCCAATGCCCAATCCTTTC | AAGCGGCCCGCAGGACGCAACACTACACC |
| | 11 | AAGCGGCCGCTGTGTATCACGGCTTACG | AAGCGGCCCGCCACTCGTCCATTTAGACC |
| | 12 | AAGCGGCCCGAGCTGAGTGTGAGATTCC | AAGCGGCCCGGTGGTGTGCATCTGTAGTC |
| | 13 | AAGCGGCCGCTACAGATGCACACCACCATG | AAGCGGCCCGAGTGCTCTCAAATGGTGTG |
| | 14 | AAGCGGCCCGCTGACTCCGTGATGATCTC | AAGCGGCCGCAACCATCCTCCAAGATACC |
| | 15 | AAGCGGCCCGCACATAATGCCTTCGCTGTGG | AAGCGGCCGCTAAGGGTGTGGAGCGAATC |
| | 16 | AAGCGGCCGCTGTGGTGAGGACTCAGTT | AAGCGGCCGCTGCACCACTGCATTCATTC |

次世代シーケンサーによる解析ではランダムに断片化したゲノム DNA を繰り返

返し読むことが重要なため、Not I 配列を付加したプライマーを用い、その PCR 産

物を電気泳動で確認後、Not I 酵素で切断し、T4 ligase で PCR アンプリコンをライゲーションし、長鎖の DNA を作成した。その後、次世代シーケンサーによる解析用に Covaris sonicator (Woburn, MA, USA)を用いた超音波破碎により DNA を平均 200bp のサイズに断片化し、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)を用いてシーケンシングライブラリーを作成し解析を行った。データ処理は過去に報告された方法で行った(46)。プールシーケンス法(45)では 10-12 人の 患者由来の DNA を均一に混合した DNA プールを作成し、それを一検体として扱って初回の解析を行った (図 1)。検出された変異についてプールに対応する 10-12 サンプルのシーケンスを行い、変異を有する検体を同定した。

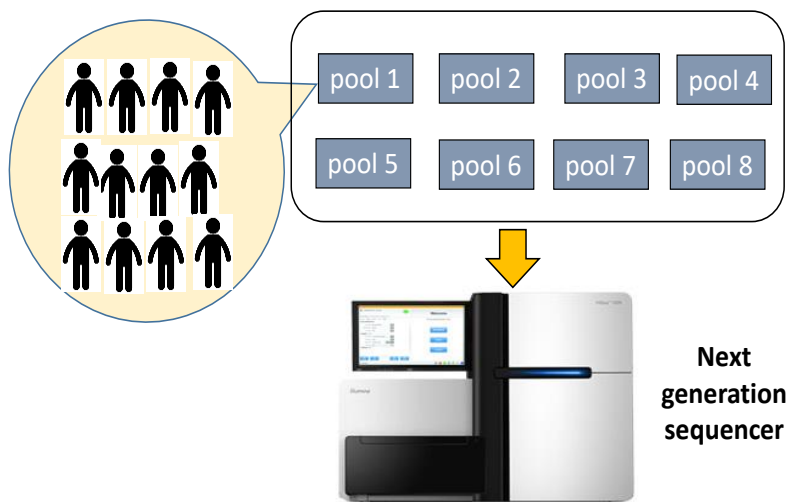


図 1 プールシーケンス法

図は著者作成。検体数が多く変異頻度が低いと予測される変異解析では有用である。

検出された一塩基置換の変異としての採用基準は検体や遺伝子の種類によらず HRM 解析と同一とした。プールシーケンスの深度は臨床検体の ATM では

10,507–208,634(中央値 64,948)、健康人の *ATM* では 3,015–70,278 (中央値 10,349)、臨床検体の *ATM* 以外の遺伝子では 4,031–440,891(中央値 14,670)であった。

***ATM* の相補性試験**

野生型 *ATM* を逆転写 PCR によって増幅し、PiggyBac ベクター(System Biosciences, Mountain View, CA, USA)の *NheI* と *NotI* サイトに導入した。*ATM* の ATG 開始コドンから *KpnI* サイト(codon 3891)と、*KpnI* サイトから終末コドンの配列を、TOPO-TA クローニングベクター (Life Technologies)に導入した。その後、In vitro Mutagenesis Kit XL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて In vitro 突然変異生成を行った。変異した *ATM* の部分的配列を、*ATM* 発現 PiggyBac ベクターにおいて野生型 *ATM* の代わりに用いた。変異型あるいは野生型 *ATM* 発現 PiggyBac ベクターを Lipofectamine 3000 (Life Technologies)を用いて PiggyBac トランスポザーゼ発現ベクターとともに AT 細胞株である GM05849C (7009 del TG)細胞に導入し、ピューロマイシンによって選択し、ウェスタンブロット法によって遺伝子が導入されていることを確認した。なお、*ATM* の発現量に関しては多少のばらつきが認められ、変異による蛋白の安定化の差なども影響していることが推測されたが、*ATM* の発現量をそろえる作業は非常に困難と予測されたため発現の確認だけを行った。

コロニー形成法

コロニー形成法はこれまでの報告に従って行った(47)。細胞を 10% FCS を含む 3 ml の DMEM 当たり 1×10^4 個の濃度で 6 ウェルプレートの各ウェルに入れ、X 線を

照射した。2週間の培養後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、コロニー数を観察した。

Direct repeat-green fluorescent protein (DR-GFP) 相同組み換えアッセイ

この方法は相同組み換え修復により DNA 二本鎖切断が修復されると GFP が発現するレポーターアッセイである。レポーターアッセイとは転写調節領域の活性を評価する方法である。神経芽腫細胞株における *ATM* の相同組み換え修復への関与を検討するために、*ATM* 阻害剤 KU-55933 を神経芽腫由来細胞株 SK-N-BE に添加し *ATM* 機能を阻害した後、Lipofectamine 3000 (Life Technologies) を用い、DNA を切断する I-SceI 発現ベクターである pCBAS を、DR-GFP を組み込んだ SK-N-BE に導入して DNA 二本鎖切断を誘導し、72 時間後にフローサイトメトリーを用いて GFP 陽性細胞の割合をモニターした。

結果

SNP アレイによるコピー数の網羅的解析

神経芽腫由来細胞株 39 株と神経芽腫臨床検体 159 検体を対象に SNP アレイによるコピー数の網羅的解析を行った。臨床検体の結果を図 2 に示した。

染色体

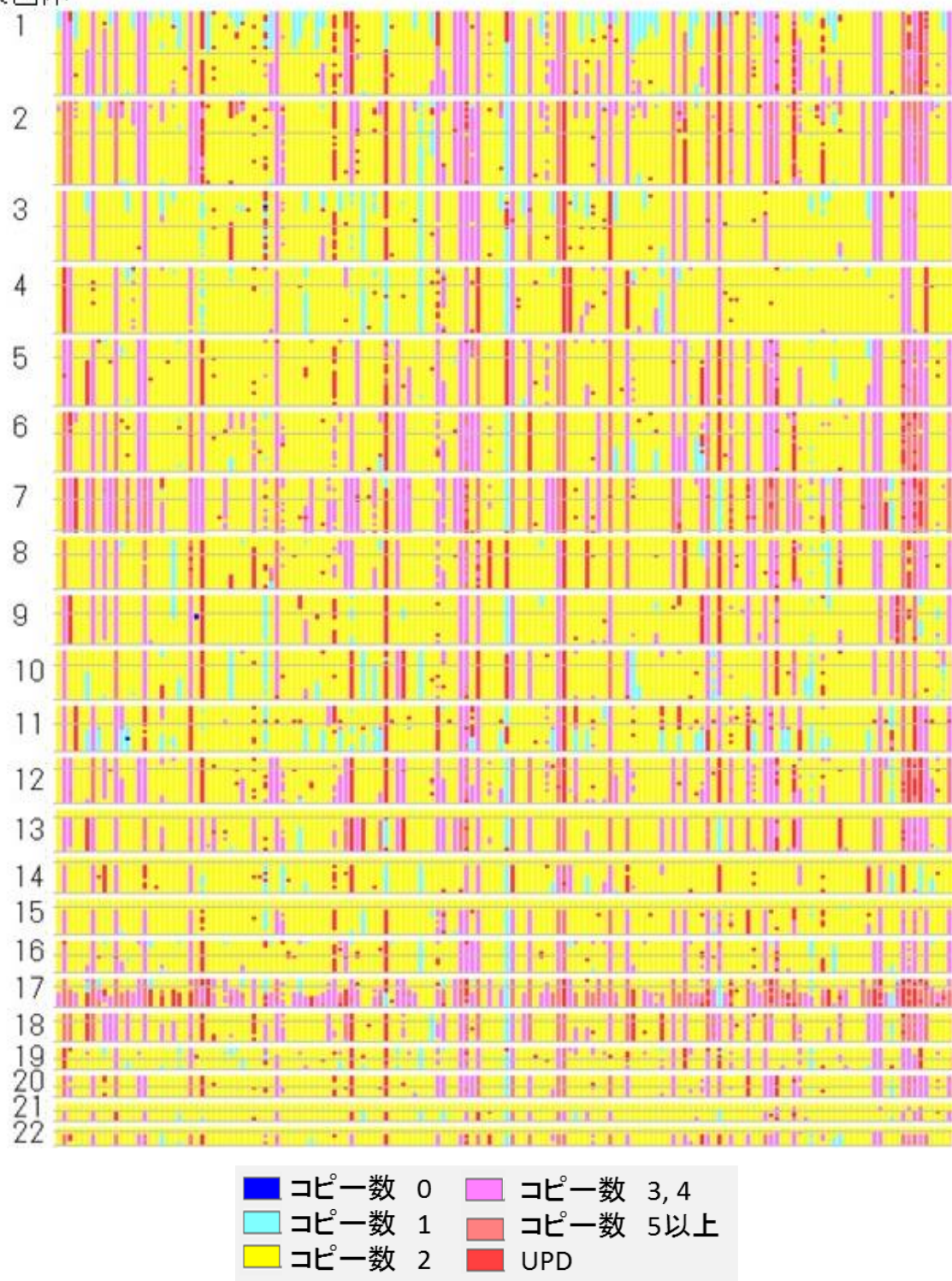


図2 SNPアレイ解析による神経芽腫臨床検体のコピー数変化の全体像

縦軸に染色体番号を、横軸に個々の症例を示した。症例の配列は左から右へ表1と同一順序である。呈示した色でコピー数変化を示した。図はCNAG Graphソフトウェアを用いて作成した。

臨床検体の 24% (38/159 検体) に 11q の Loss of Heterozygosity (LOH)、すなわち欠失あるいは片親性二倍体 (uniparental disomy, UPD) が検出された。これらは進行例の 30.6%(34/111 検体)であった。

11q 上の標的遺伝子について、まず、11qLOH の共通領域に位置する DNA 損傷応答関連遺伝子をすべて抽出し、逆転写 PCR により神経芽腫細胞株での発現を確認した。その結果、*ATM*、*MRE11A*、*H2AFX*、*CHEK1* が抽出された (図 3)。これらの遺伝子領域の欠損頻度を表 3 に示した。臨床検体の進行例の 25% (28/111 例) に *ATM* 欠損が確認された。

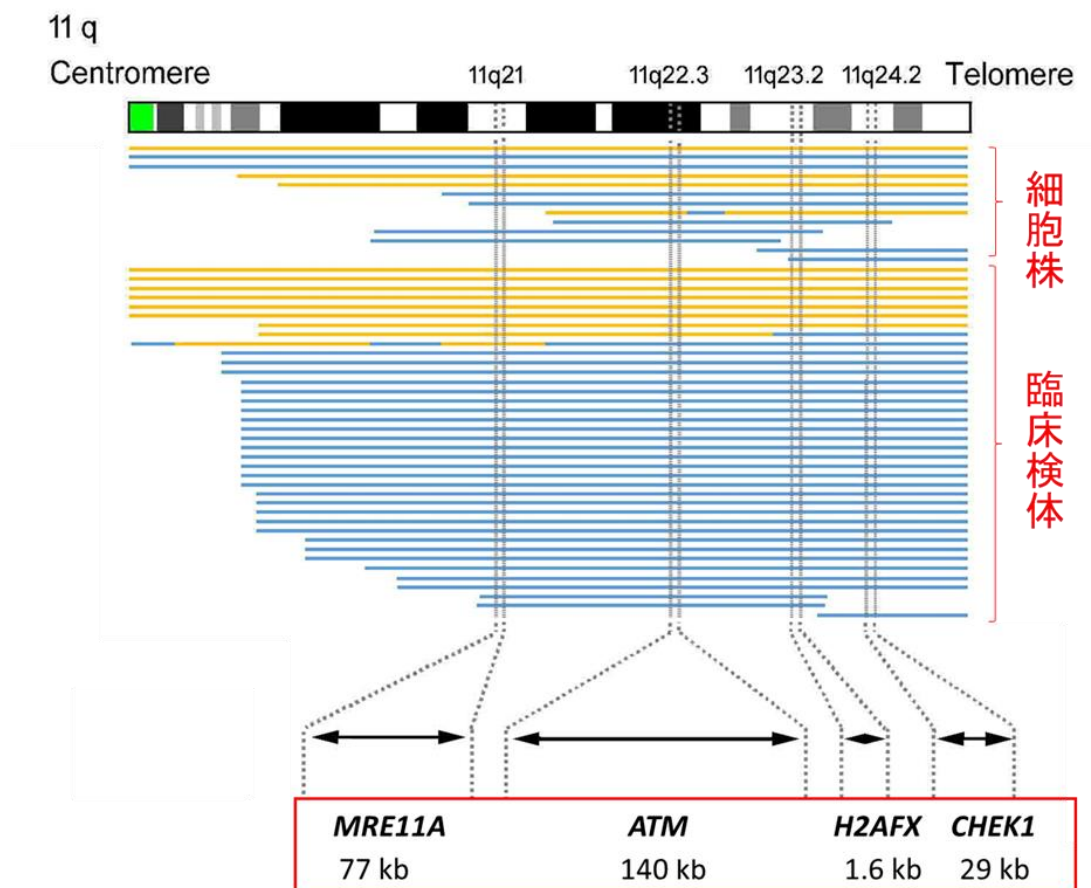


図 3 SNP アレイによって検出された 11q LOH の全体像

青線で欠失、黄色線で UPD を示した。灰色の点線で遺伝子の位置とサイズを示した。検体名を各線の右側に示し、赤字で細胞株、黒字で臨床検体を示した。

表 3 11q 上の DNA 損傷応答関連遺伝子の欠失あるいは UPD

| コホート | <i>ATM</i> | <i>H2AFX</i> | <i>CHEK1</i> | <i>MRE11A</i> |
|------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 細胞株 | 28 % (11/39) | 30 % (12/39) | 28 % (11/39) | 23 % (9/39) |
| 臨床検体 | 18 % (29/159) | 18 % (30/159) | 18 % (29/159) | 17 % (28/159) |

さらに、250K を用いて解析した 133 検体のアレイデータにおいて、GISTIC 解析を行った。同解析はがんにおいてコピー数が偶然ではなく有意に変動している領域を抽出し、病気の標的となる遺伝子を同定しようとするものである(26)。神経芽腫における既知の異常である *MYCN* (2p25.1-2p21)、*MDM2* (12q15)、17q の各領域では q 値が低く、同解析の信頼性が確認できた。11q22.1 から 11q24.3 の q 値は低く、同領域には *MRE11A*、*ATM*、*H2AFX*、*CHEK1* が含まれ、この結果からも採用した遺伝子の標的候補としての可能性を確認できた(図 4)。そこで当初の計画通り *ATM* の変異解析を行う方針とした。*ATM* と神経芽腫の関係をより詳細に検討するため *MRE11A*、*H2AFX*、*CHEK1* についても変異解析を行う方針とし、11q 以外の *ATM* 経路上の遺伝子 *TP53*、*CHEK2*、*BRCA1* についても、様々ながんで報告があることや、サイズが大きくないため変異解析のアンプリコン数を大幅に増やさないこと等の理由から解析対象に加えた。

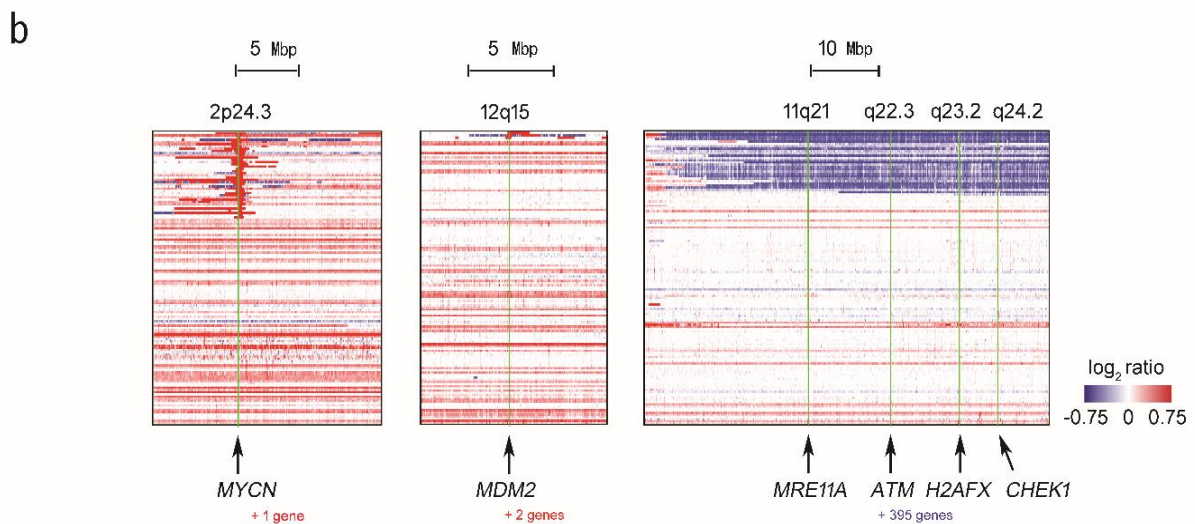
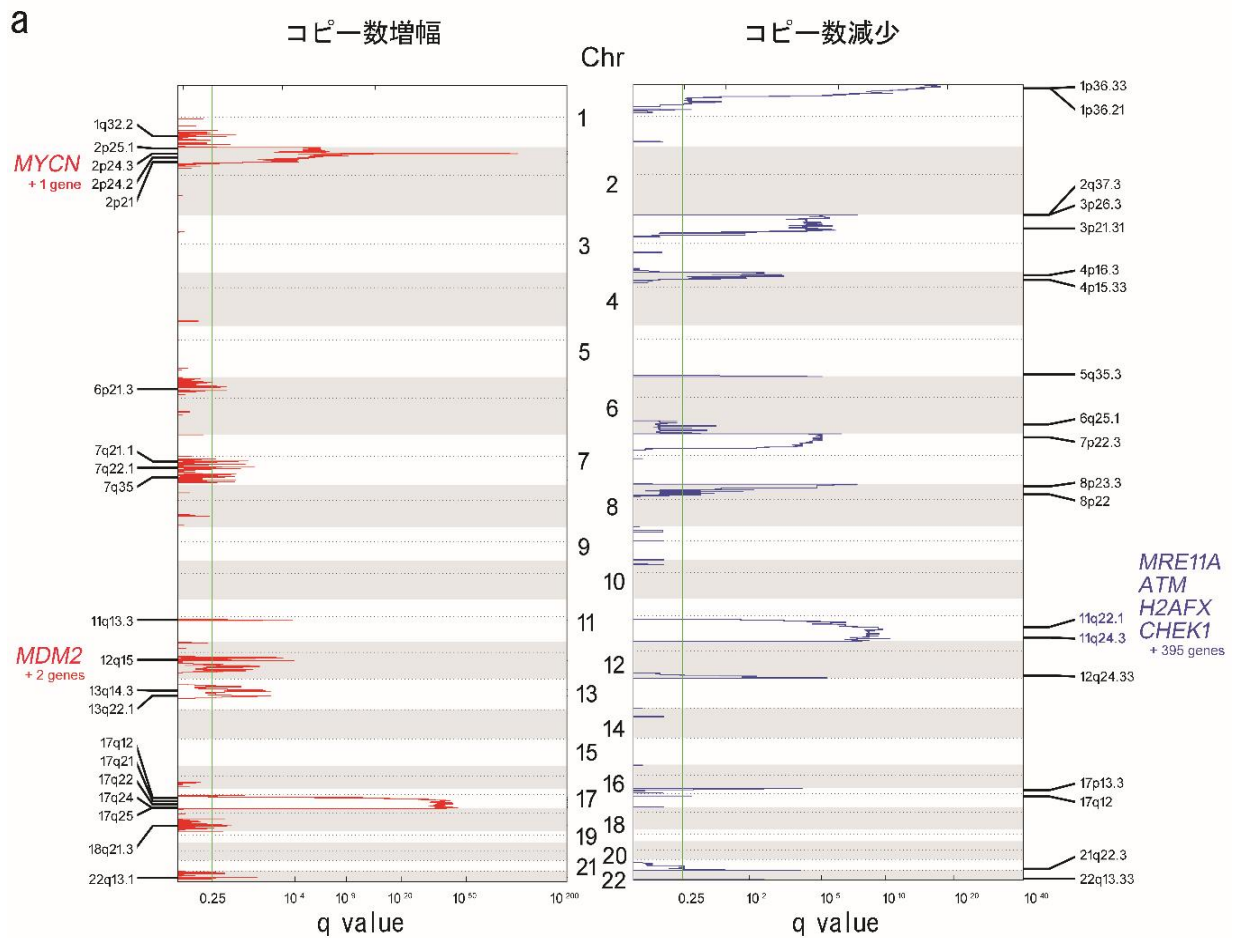


図4 臨床検体における GISTIC 解析とコピー数ヒートマップ

(a) GISTIC 解析により抽出された有意にコピー数異常を示す領域の全体像。各領域に対して推定される標的遺伝子を記載した。点線で各染色体の動原体、緑色線で q 値=0.25 を示した。(b)(a)で抽出された領域に含まれる、神経芽腫に関連する遺伝子領域のコピー数ヒートマップ。 Mbp, megabase pairs.

細胞株の ATM 変異

細胞株の ATM 変異は 11%(5/45 株)に同定された (表 4)。IMR-32 に同定された p.V2716A は ATM の catalytic domain 内の ATP 結合部位に位置し、過去に毛細血管拡張性運動失調症の mild phenotype を呈する家系において pathogenic dominant negative mutation として報告されている(48, 49)。GOTO は 11q 欠失と ATM のナンセンス変異を有し ATM 欠損細胞であることが判明した。

表 4 細胞株における ATM のコピー数異常と変異

| 細胞株名 | コピー数変化 | 変異 | 変異タイプ | アミノ酸変化 | アレル変化 | 変異解析法 | SNP | MAF |
|---------|--------|-----|-------|--------|------------|-------|-----------|--------|
| CHP-126 | Loss | No | - | - | - | T | | |
| CHP-134 | No | No | - | - | - | T | | |
| CHP-212 | No | No | - | - | - | T | | |
| GOTO | Loss | Yes | N | K31X | c.91A>T | T | none | none |
| HS-NB | No | No | - | - | - | T | | |
| IMR-32 | UPD | Yes | M | V2716A | c.8147 T>C | T | none | none |
| KAN-TS | Loss | No | - | - | - | T | | |
| KELLY | No | No | - | - | - | T | | |
| KP-N-NS | No | No | - | - | - | T | | |
| LAN-1 | No | No | - | - | - | T | | |
| LAN-2 | Loss | No | - | - | - | T | | |
| LAN-5 | No | No | - | - | - | T | | |
| MC-IXC | Loss | No | - | - | - | T | | |
| MC-NB-1 | No | No | - | - | - | T | | |
| NB-1 | No | No | - | - | - | T | | |
| NB-16 | No | No | - | - | - | T | | |
| NB-69 | No | No | - | - | - | T | | |
| NB-9 | No | No | - | - | - | T | | |
| NBL-S | Loss | No | - | - | - | H | | |
| NGP | Loss | No | - | - | - | H | | |
| NH-12 | No | No | - | - | - | T | | |
| NMB | Loss | Yes | M | S1198F | c.3593 C>T | H | none | none |
| PFSK-1 | UPD | Yes | M | S707P | c.2119 T>C | T | rs4986761 | 0.0044 |
| SCCH-26 | No | No | - | - | - | T | | |
| SCMC-N2 | No | No | - | - | - | T | | |
| SCMC-N3 | No | No | - | - | - | T | | |
| SCMC-N4 | Loss | No | - | - | - | T | | |
| SCMC-N5 | No | No | - | - | - | T | | |
| SJNB-1 | UPD | No | - | - | - | T | | |
| SJNB-2 | No | No | - | - | - | T | | |
| SJNB-3 | No | No | - | - | - | T | | |
| SJNB-4 | No | No | - | - | - | T | | |

| | | | | | | | | |
|----------|------|-----|---|--------|------------|---|------|------|
| SJNB-5 | UPD | No | - | - | - | T | | |
| SJNB-6 | No | No | - | - | - | T | | |
| SJNB-7 | No | No | - | - | - | T | | |
| SJNB-8 | No | No | - | - | - | T | | |
| SK-N-AS | Loss | No | - | - | - | H | | |
| SK-N-BE | Gain | No | - | - | - | H | | |
| SK-N-DZ | Loss | Yes | M | S1990T | c.5969 G>C | H | none | none |
| SK-N-SH | No | No | - | - | - | T | | |
| SK-PN-DW | Loss | No | - | - | - | T | | |
| TGW | No | No | - | - | - | T | | |
| TN-1 | No | No | - | - | - | T | | |
| TNB-1 | No | No | - | - | - | T | | |
| UTP-N-1 | No | No | - | - | - | T | | |

UPD, uniparental disomy; M, missense mutation; N, nonsense mutation; T, targeted deep sequencing; H, high resolution melting analysis; MAF, minor allele frequency.

臨床検体の *ATM* 変異

臨床検体の *ATM* 変異は 5.6%(9/159 検体)に検出された。進行例では 5.4% (6/111 検体)であった。変異の起源については、正常検体の解析あるいはアレル頻度に基づく推測によればほとんどが生殖細胞変異であった (表 5)。変異の部位は *ATM* の全長にわたっていた (図 4)

表 5 臨床検体における *ATM* 変異(NM_000051)

| 検体 ID | 月齢 † | IN SS | 転 帰 | 変 異 型 | アミノ酸 変化 | 位置‡ | アレ ル変 化 | 起 源 | アレ ル頻 度 | SNP | MAF |
|--------|---------|----------|--------|-------------|------------|-----------|---------------|--------|---------------|-------------|---------|
| NB_105 | 46 | 4 | D | M | A59S | 108098605 | G>T | S | 0.13 | none | none |
| NB_062 | 71 | 3 | A | M | V519I | 108121747 | G>A | G | 0.51 | HGVD SNP | 0.0004 |
| NB_058 | 66 | 4 | A | M | P604S | 108123551 | C>T | G | 0.50 | rs2227922 | 0.0026 |
| NB_122 | 9 | 1 | A | M | S824F | 108137902 | C>T | G* | 0.52 | none | none |
| NB_038 | 7 | 4 | A | M | P960H | 108141831 | C>A | G | 0.45 | rs587779828 | 0.00002 |
| NB_117 | 9 | 4 | A | M | S1455R | 108160457 | T>A | G* | 0.48 | rs527471560 | 0.0002 |
| NB_032 | 1 | 4S | A | M | L1956H | 108180991 | T>A | G | 0.74 | HGVD SNP | 0.0013 |
| NB_069 | 75 | 1 | A | M | R2691C | 108205756 | C>T | G | 0.48 | none | none |
| NB_149 | U | 4 | U | M | K2749I | 108206666 | A>T | G | 0.48 | rs779145081 | 0.00002 |

† 診断時月齢; ‡ Position in NCBI reference sequence; INSS, international neuroblastoma staging system; U, unknown; A, alive; D, dead; M, missense mutation; G, germline; S, somatic; MAF, minor allele frequency.

*は正常組織で起源を確認したものを示した。*印のない変異はアレル頻度から起源を推測した (0.4 以上を germ line とした)。

健常人における ATM 変異

臨床検体に検出された ATM 変異のほとんどが生殖細胞起源であったことから、変異の病的意義を検討するために 171 名の健常ボランティアの ATM 変異についても解析を行った。変異採用基準は腫瘍と同一とした。その結果、変異頻度は 5.2% (9/171 検体) で、臨床検体と同等であった (表 6)。その種類は p.S1455R と p.K2749I を除いて重複がなく、変異の部位は ATM の全長にわたっていた (図 4)。p.V2716A と p.K2749I は ATM の catalytic domain に位置した。

表 6 健常人における ATM 変異(NM_000051)

| 変異型 | アミノ酸変化 | 検出頻度 | 位置* | アレル変化 | SNP ID | MAF |
|-----|--------|-------|-----------|-------|-------------|--------|
| M | R45Q | 1/171 | 108098564 | G>A | none | none |
| M | A220V | 1/171 | 108114842 | C>T | rs145355104 | 0.001 |
| M | L581V | 1/171 | 108122697 | T>G | unknown | 0.001 |
| M | S1455R | 1/171 | 108160457 | T>A | rs527471560 | 0.0002 |
| M | N1650S | 1/171 | 108168053 | A>G | rs55870064 | 0.004 |
| M | T2031I | 1/171 | 108186635 | C>T | none | none |
| M | S2707C | 1/171 | 108205805 | C>G | none | none |
| M | K2749I | 2/171 | 108206666 | A>T | rs779145081 | 0.002 |

* Position in NCBI reference sequence. M, missense mutation.

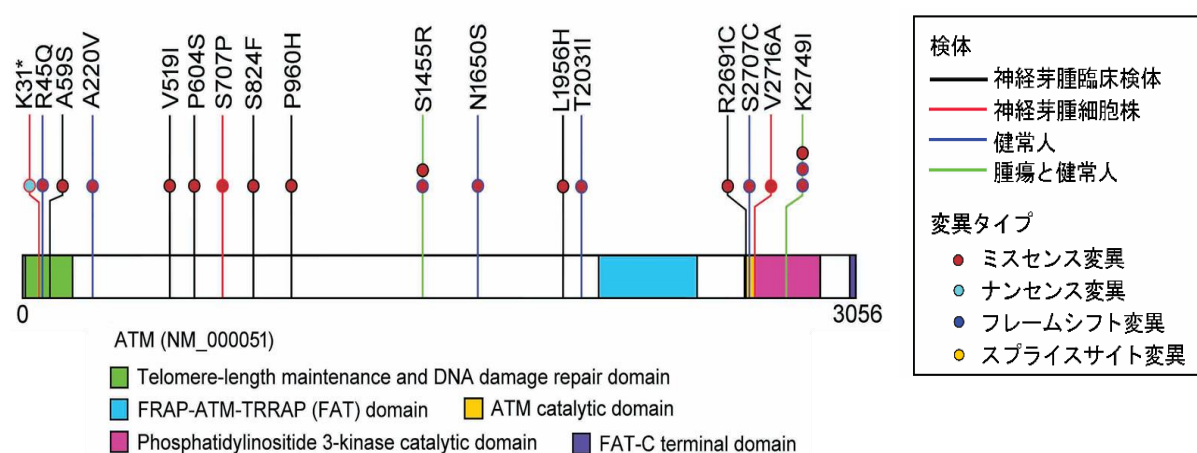


図 4 ATM 変異の分布

変異タイプは丸の色で、検体の種類は線の色で示した。図は Protein painter (<http://explore.pediatriccancergenomeproject.org>)を用いて作成した。

臨床検体の DNA 損傷応答関連遺伝子の変異

臨床検体の DNA 損傷応答関連遺伝子の変異は合計 20% (33/159 検体) に認められ、遺伝子別には 0.6-8.8% の症例が変異を有していた (表 7)。変異の起源については正常検体の解析あるいはアレル頻度による推測から、ほとんどが生殖細胞変異であった。変異の頻度は *BARD1* において最多であり、その分布は *BARD1* タンパク質の全長に及んでおり、機能喪失型変異であることが示唆された (図 5)。*BARD1* は神経芽腫の生殖細胞変異として報告がある。そのため、病的意義の有無を確認するために健常人においても変異解析を行った。その結果、健常人における変異頻度は 1.2% (2/171 検体) であり、*ATM* とは異なり、健常人での変異頻度は低く、病的意義を有する可能性が高いことが示唆された (表 8)。

表 7 臨床検体における ATM 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子の変異

| | 検体 ID | 月齢† | IN SS 病 期 | 転帰 | 変異 タイ プ | アミノ酸変 化 | 位置‡ | アレ ル変 化 | 起源 | アレ ル頻 度 |
|---------------|--------|-----|--------------------|----|---------------|-------------|-----------|---------------|----|---------------|
| <i>BARD1</i> | NB_083 | 15 | 2 | A | M | H116Q | 215657037 | A>T | G | 0.61 |
| | NB_011 | 0 | 3 | A | M | S186G | 215646042 | T>C | G | 0.51 |
| | NB_096 | 33 | 4 | A | M | S186G | 215646042 | T>C | NA | NA |
| | NB_121 | 5 | 3 | A | M | S202F | 215645993 | G>A | G* | 0.56 |
| | NB_082 | 18 | 3 | A | M | I437V | 215645289 | T>C | G | 0.50 |
| | NB_002 | 4 | 1 | A | M | R658C | 215595164 | G>A | G | 0.51 |
| | NB_039 | 3 | 4 | A | M | R658C | 215595164 | G>A | NA | NA |
| | NB_045 | 50 | 4 | A | M | R658C | 215595164 | G>A | NA | NA |
| | NB_068 | 150 | 2 | A | M | R658C | 215595164 | G>A | S | 0.35 |
| | NB_154 | 8 | 2 | A | M | R658C | 215595164 | G>A | G* | NA |
| | NB_144 | 60 | 4 | A | F | I702fs | 215593629 | >+T | G* | 0.42 |
| | NB_021 | 35 | 4 | A | S | V604_splice | 215610445 | C>A | G | 0.49 |
| | NB_137 | 24 | 4 | A | S | V604_splice | 215610445 | C>A | G* | 0.52 |
| | NB_004 | 40 | 4 | D | S | W635_splice | 215609790 | C>- | S | 0.35 |
| <i>MRE11A</i> | NB_092 | 20 | 4 | A | M | R191Q | 94209542 | C>T | G | 0.45 |
| | NB_042 | 7 | 4 | D | M | R503H | 94189497 | C>T | G | 0.46 |
| <i>H2AFX</i> | NB_095 | 6 | 4S | A | S | - | 118966176 | C>T | G | 0.50 |
| <i>CHEK1</i> | NB_132 | 36 | 4 | A | M | V46I | 125497572 | G>A | G* | 0.79 |
| | NB_048 | 28 | 4 | A | M | R160P | 125503112 | G>C | S | 0.32 |
| | NB_007 | 0 | 3 | A | M | N229T | 125505396 | A>C | S | 0.38 |
| <i>TP53</i> | NB_001 | 0 | 4S | D | M | V31I | 7579705 | C>T | G | 0.47 |
| | NB_024 | 7 | 3 | A | M | V31I | 7579705 | C>T | G | 0.45 |
| | NB_078 | 5 | 4 | A | M | D49H | 7579542 | C>G | G | 0.50 |
| | NB_088 | 0 | 1 | A | M | D49H | 7579542 | C>G | G | 0.48 |
| | NB_027 | 24 | 4 | D | M | K132N | 7578534 | C>A | G | 0.86 |
| | NB_149 | U | 4 | U | M | C275F | 7577114 | C>A | G* | 0.50 |
| <i>BRCA1</i> | NB_014 | 25 | 3 | U | M | L52F | 41258531 | G>A | G | 0.46 |
| | NB_143 | 0 | 4S | A | M | L52F | 41258531 | G>A | G* | 0.50 |
| | NB_089 | 0 | 1 | A | M | P209L | 41247907 | G>A | G | 0.45 |
| | NB_050 | 34 | 4 | A | M | S1577P | 41223202 | A>G | G | 0.46 |
| | NB_071 | 2 | 4S | D | M | S1577P | 41223202 | A>G | G | 0.46 |
| | NB_080 | 2 | 1 | A | M | S1577P | 41223202 | A>G | NA | NA |
| <i>CHEK2</i> | NB_066 | 52 | 4 | D | F | F238fs | 29107975 | >+AA | G | 0.49 |

† 診断時月齢; ‡ Position in NCBI reference sequence; INSS, international neuroblastoma staging system; U, unknown; A, alive; D, dead; M, missense mutation; F, frameshift mutation; S, splice site mutation; NA, not available; G, germline; S, somatic.

Reference sequence: *BARD1*, NM_000465; *MRE11A*, NM_005590; *H2AFX*, M_002105; *CHEK1*, NM_001114121; *TP53*, NM_000546; *BRCA1*, NM_007294; *CHEK2*, NM_001005735.

*は正常検体で起源を確認した。*印のない変異はアレル頻度から起源を推測した (0.4 以上を germ line とした)。プールシーケンス後、変異を有する個体の同定を Sanger シーケンスを用いて行った検体では変異のアレル頻度が不明のため変異起源を NA と記載した。

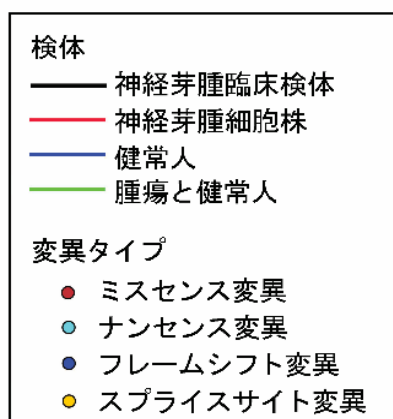
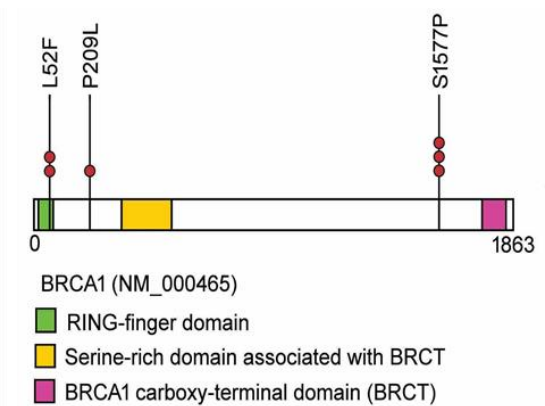
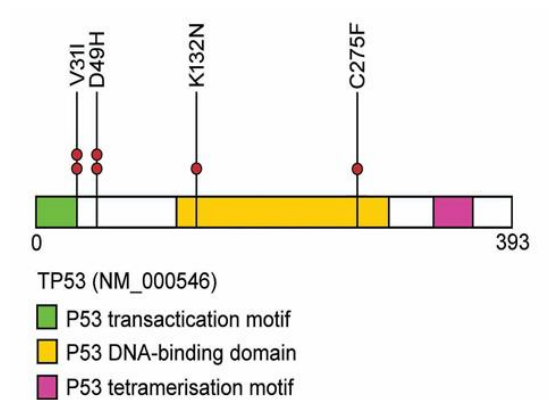
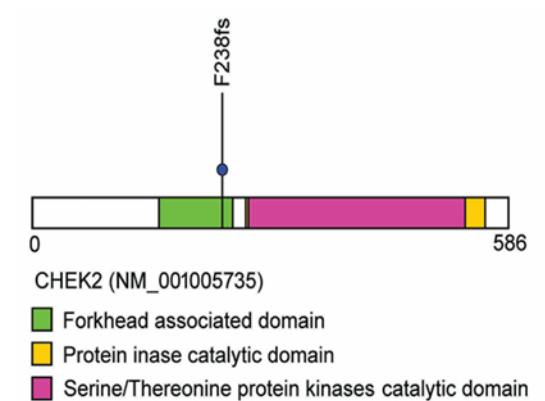
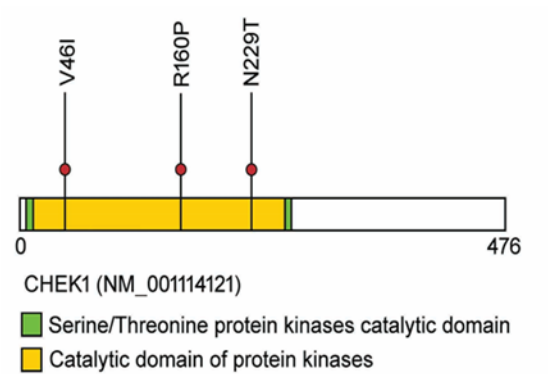
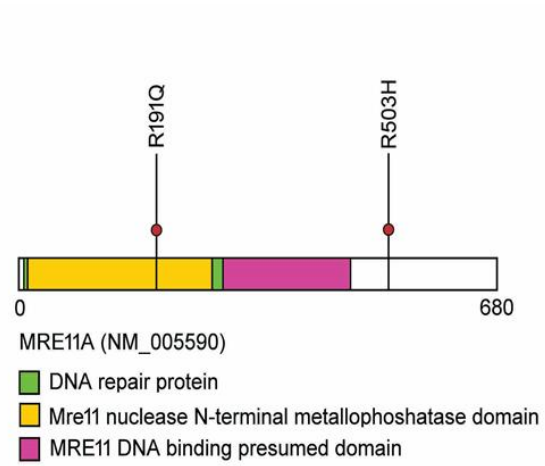
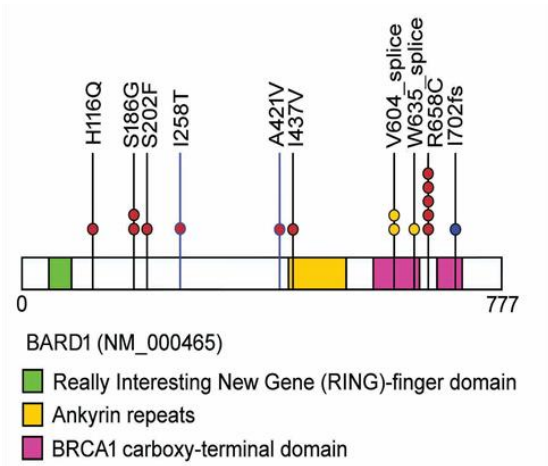


図5 DNA 損傷応答関連遺伝子の変異の分布
 変異のタイプは呈示した色の丸によって示した。検体の種類は呈示した色の線によって示した。これらの図は Protein painter (<http://explore.pediatriccancergenomeproject.org>)を用いて作成した。

表 8 健常人における *BARD1* 変異(NM_000465)

| 変異型 | アミノ酸変化 | 検出された人数 | 位置* | アレル変化 |
|-----|--------|---------|-----------|-------|
| M | I258T | 1名 | 215645825 | T>C |
| M | A421V | 1名 | 215645336 | C>T |

* Position in NCBI reference sequence. M, missense mutation.

生物学的因子の相互関係の全体像

本研究のコホートの臨床検体においては、11q 欠失群と *ATM* 変異群は相互排他的であった (図 6)。 *ATM* 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子変異についても、変異遺伝子どうし相互排他的であり、遺伝子欠損とも排他的な傾向を示した。DNA 損傷応答関連遺伝子の変異あるいは欠失 (*MDM2* は増幅) を有する症例は全症例の 48%

(77/159 検体) を占めた。進行例では 54.9% (61/111 検体) の症例が DNA 損傷応答関連遺伝子異常を有していた。 *MYCN* 増幅と DNA 損傷応答関連遺伝子異常は相関関係が見られなかった (Pearson の積率相関係数 0.048、p 値 0.54)。なお本コホートでは *MYCN* 増幅と 11qLOH についても有意な関係を見いだせなかった (Pearson の積率相関係数-0.079、p 値 0.32)。 *ATM* 経路として見ると遺伝子異常の種類や頻度は図 7 のようになり、変異よりも欠損の頻度の方が高かった。

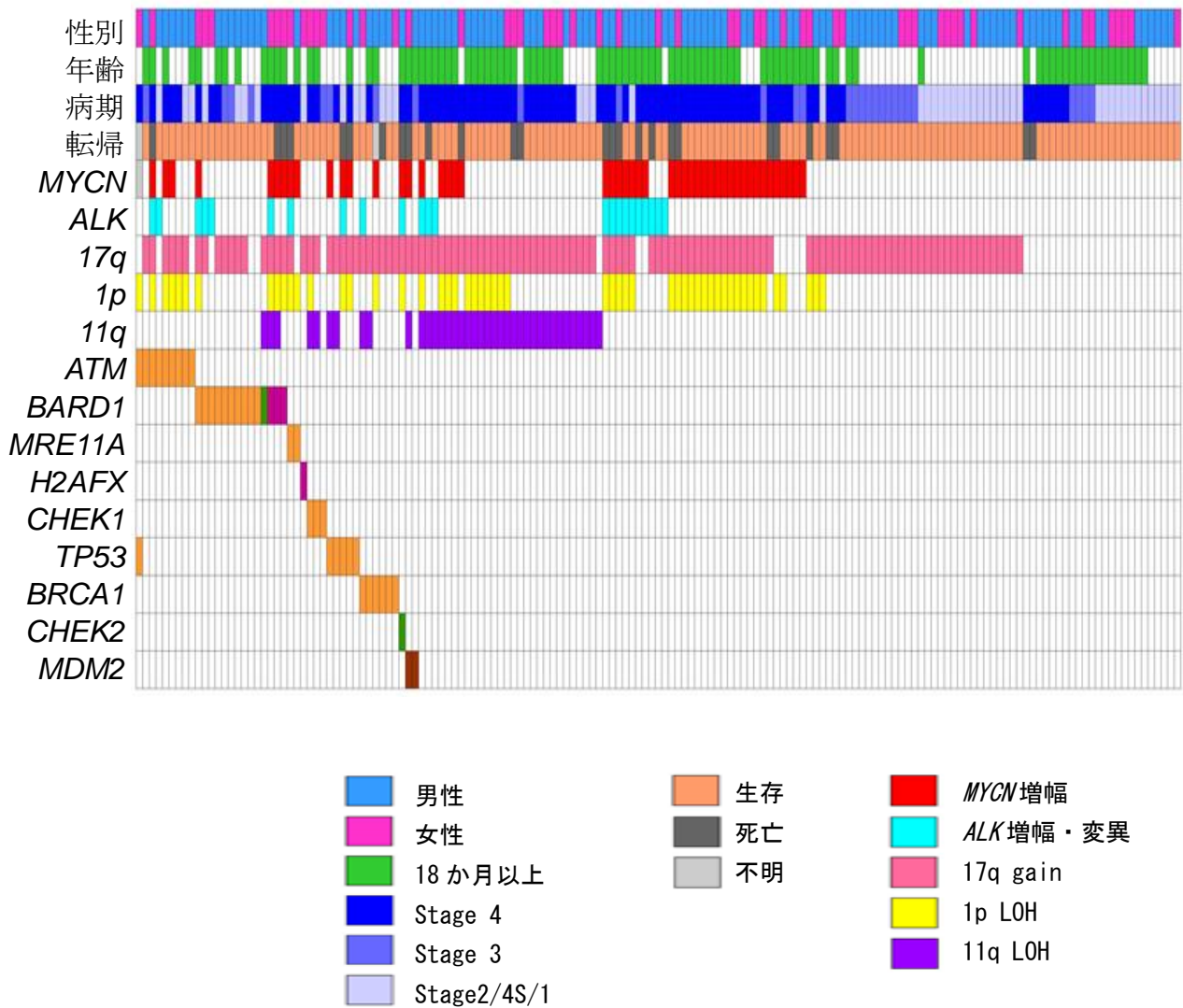


図 6 生物学的因子の相互関係の全体像

横軸に神経芽腫 159 検体の各症例を示した。縦軸に臨床的特徴〔性別、診断時月齢、international neuroblastoma staging system (INSS) 病期、転帰〕と遺伝子異常を示した。各パラメータは呈示した色で区別した。

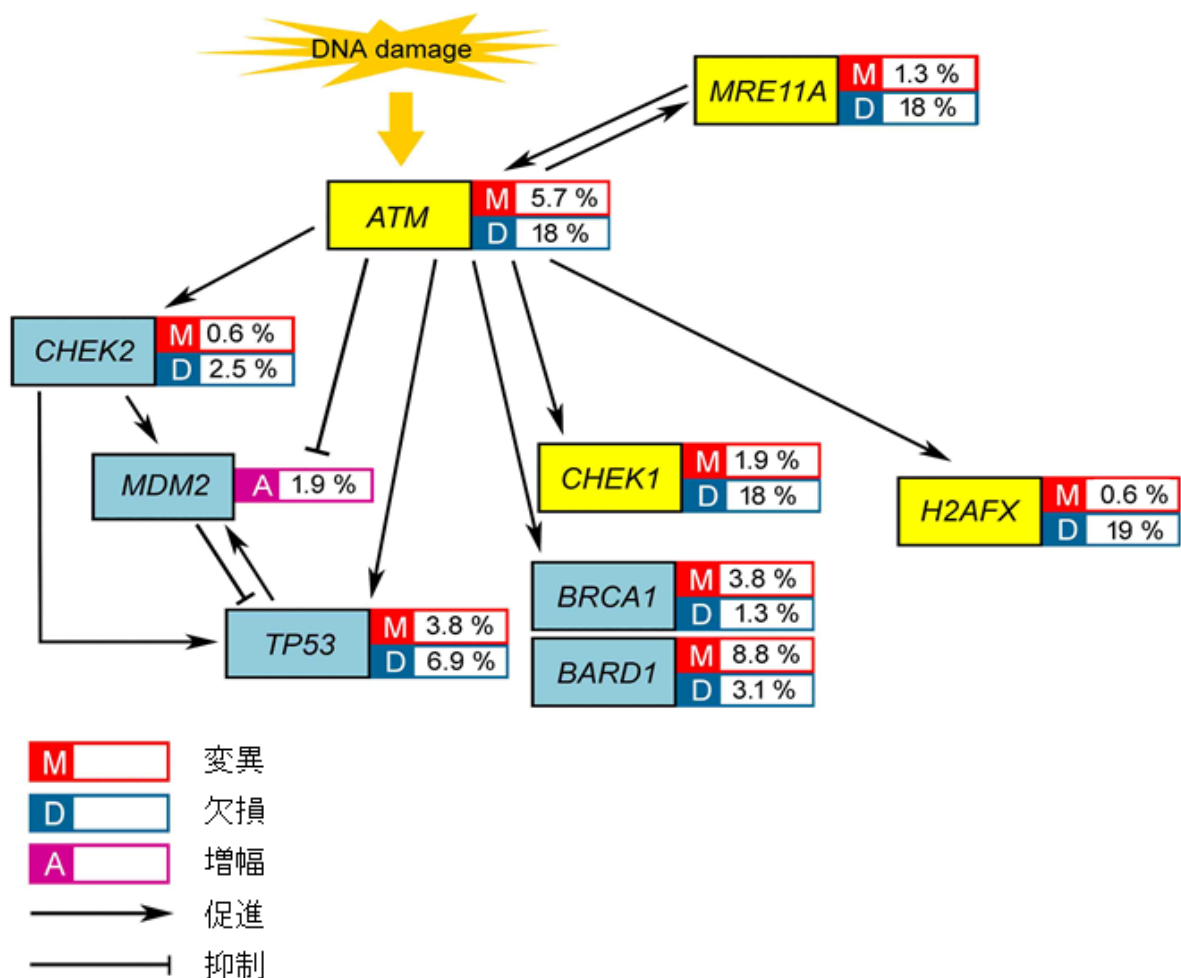


図7 ATM経路と臨床検体における同遺伝子群の異常の頻度

本研究で解析したDNA損傷応答関連遺伝子のうち、11qに位置する遺伝子を黄色で示し、その他の染色体上に位置する遺伝子を水色で示した。異常のタイプとその頻度を各遺伝子名の右側に示した。

DNA 損傷応答関連遺伝子の異常と予後

DNA 損傷応答関連遺伝子の異常と予後の関連性について検討を行った。全臨床検体の生存曲線では、DNA 損傷応答関連遺伝子異常の有無によって全生存率に有意差は認められなかったが、異常陽性群の方が予後不良な傾向を示した (図8)。

11qLOH 陽性例では診断後5年までは生存率が変動するため打ち切り例の影響が大きくなることを考慮し、5年以上観察した打ち切り例 (24例) と全死亡例 (27例)

合計 51 例の生存曲線も作成したが同様に有意差は認められなかった (図 9a)。なお、*MYCN* 増幅は既知の予後不良因子であるが、本コホートにおいても同様の結果が得られ (図 9b)、本コホートにおける解析の信頼性が確認できた。また、進行例は非進行例に比べて DNA 損傷応答関連遺伝子異常陽性のオッズ比は 2.44 (p 値 0.015) であり、進行例に DNA 損傷応答関連遺伝子異常が見られやすいことが判明した。発症時の年齢に関しては、18 か月以上では DNA 損傷応答関連遺伝子異常陽性のオッズ比は 1.49 (p 値 0.22) であり、有意差は認められなかった。

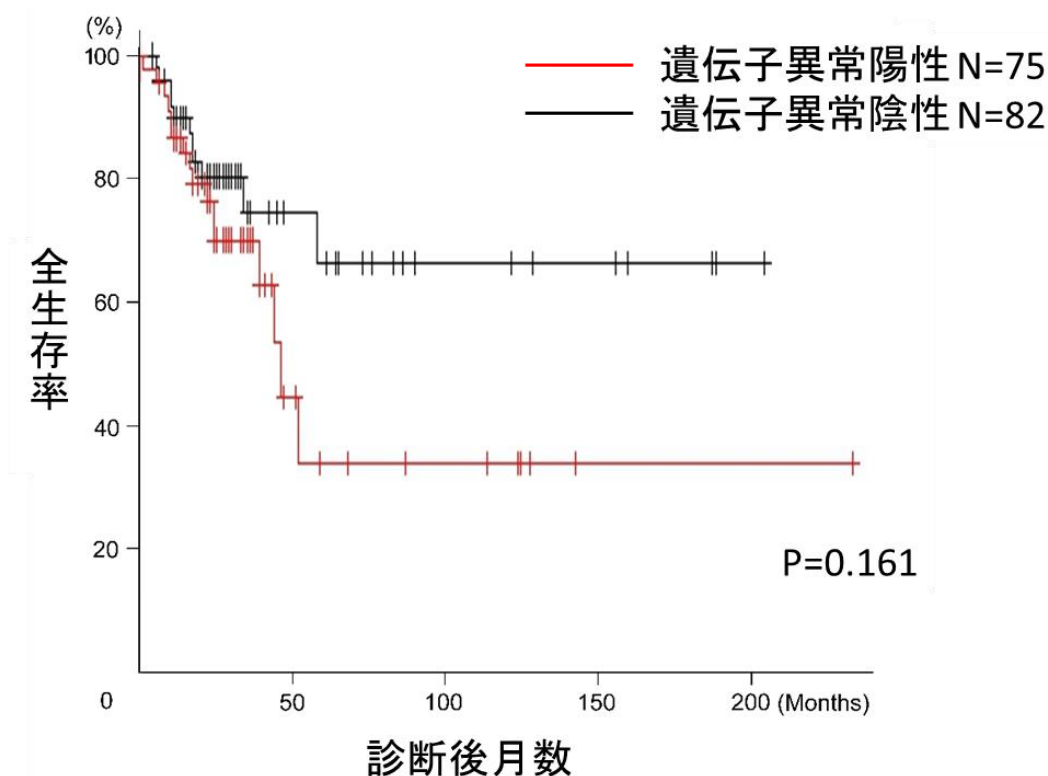
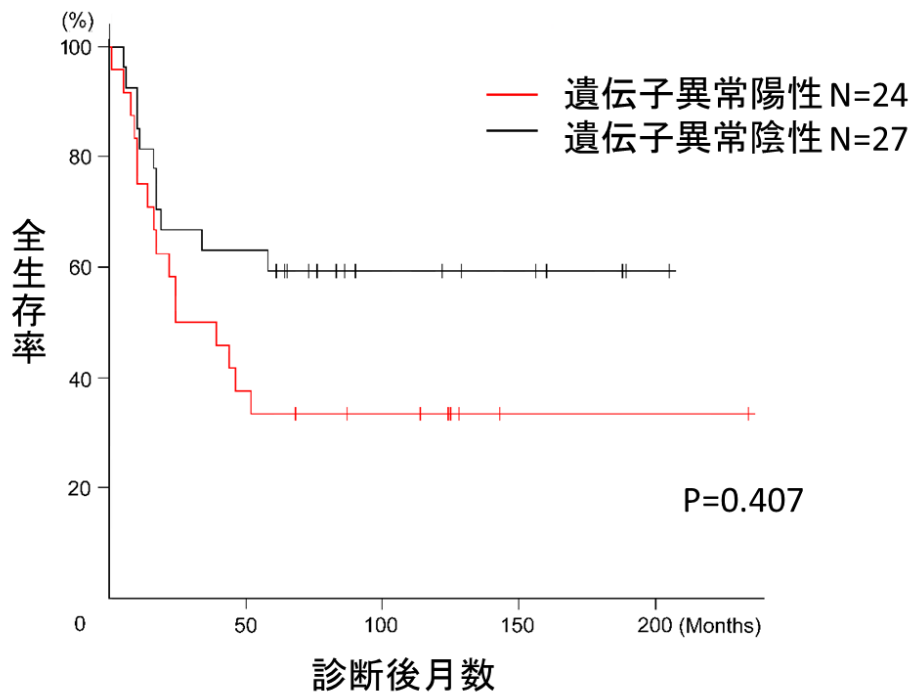


図 8 全臨床例の Kaplan-Meier 曲線

DNA 損傷応答関連遺伝子異常の有無は赤線と黒線でそれぞれ示した。臨床検体 159 検体のうち、転帰不明の 2 検体を除いた 157 検体の生存曲線。log-rank 検定の p 値を示した。有意差は認められなかった。ここでは「遺伝子異常」とは *ATM* 経路の遺伝子変異あるいは欠損 (*MDM2* は増幅) を指している。

a



b

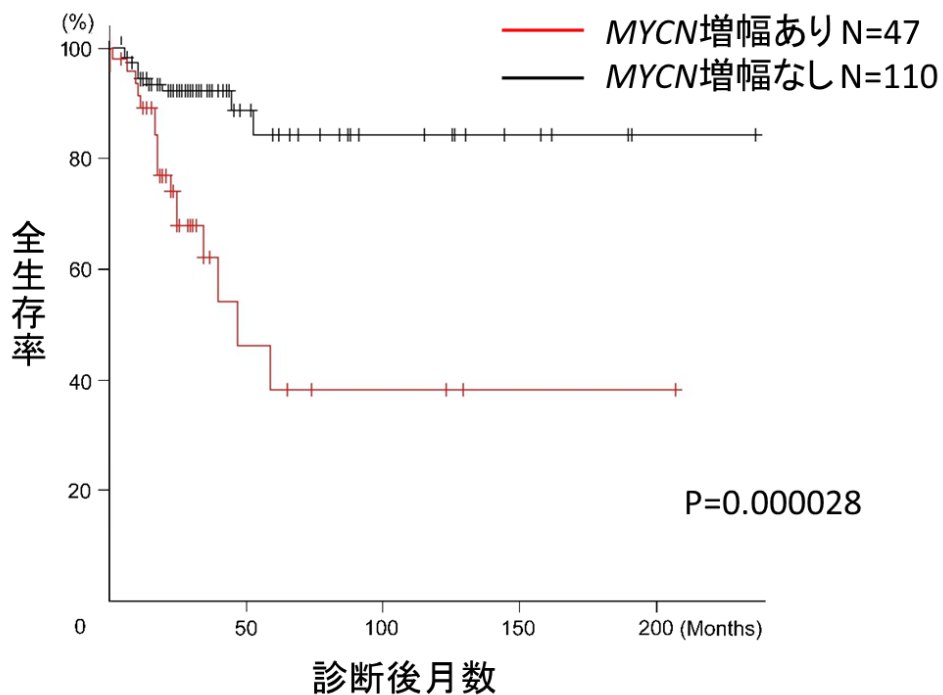


図 9 Kaplan-Meier 曲線

(a) 5年以上観察した打ち切り例 (n=24) と全死亡例 (n=27) 合計 51 例の Kaplan-Meier 曲線。DNA 損傷応答関連遺伝子異常の有無は赤線と黒線でそれぞれ示した。

(b) 臨床検体 159 検体のうち転帰不明の 2 検体を除いた 157 検体の、MYCN 増幅の有無による Kaplan-Meier 曲線。MYCN 増幅の有無を赤線と黒線で示した。

ATM の発現と ATM 経路の活性化状態

ウェスタンブロット解析を用いて神経芽腫細胞株における ATM の発現を観察した。コピー数解析で ATM ハプロイドであった細胞株では ATM は低発現の傾向であった (図 10a)。次に、神経芽腫細胞株に 2Gy の放射線を照射し、1 時間後に ATM の下流分子であるリン酸化 SMC1(pSMC1)の発現を観察した (図 10b)。pSMC1 発現減弱は ATM 経路の活性化が不十分であること、すなわち DNA 損傷応答障害の存在を示唆する。pSMC1 は ATM ハプロイドの細胞株の大部分と ATM 欠損細胞である GOT0、11qUPD と V2716A ホモ接合性変異が同定された IMR-32 において発現が減弱しており、DNA 損傷応答障害が示唆された。なお、CHP-134 と NB-9 では ATM の発現減弱は認められなかったが、pSMC1 の発現が減弱しており、ATM 以外の因子の関与が示唆された。

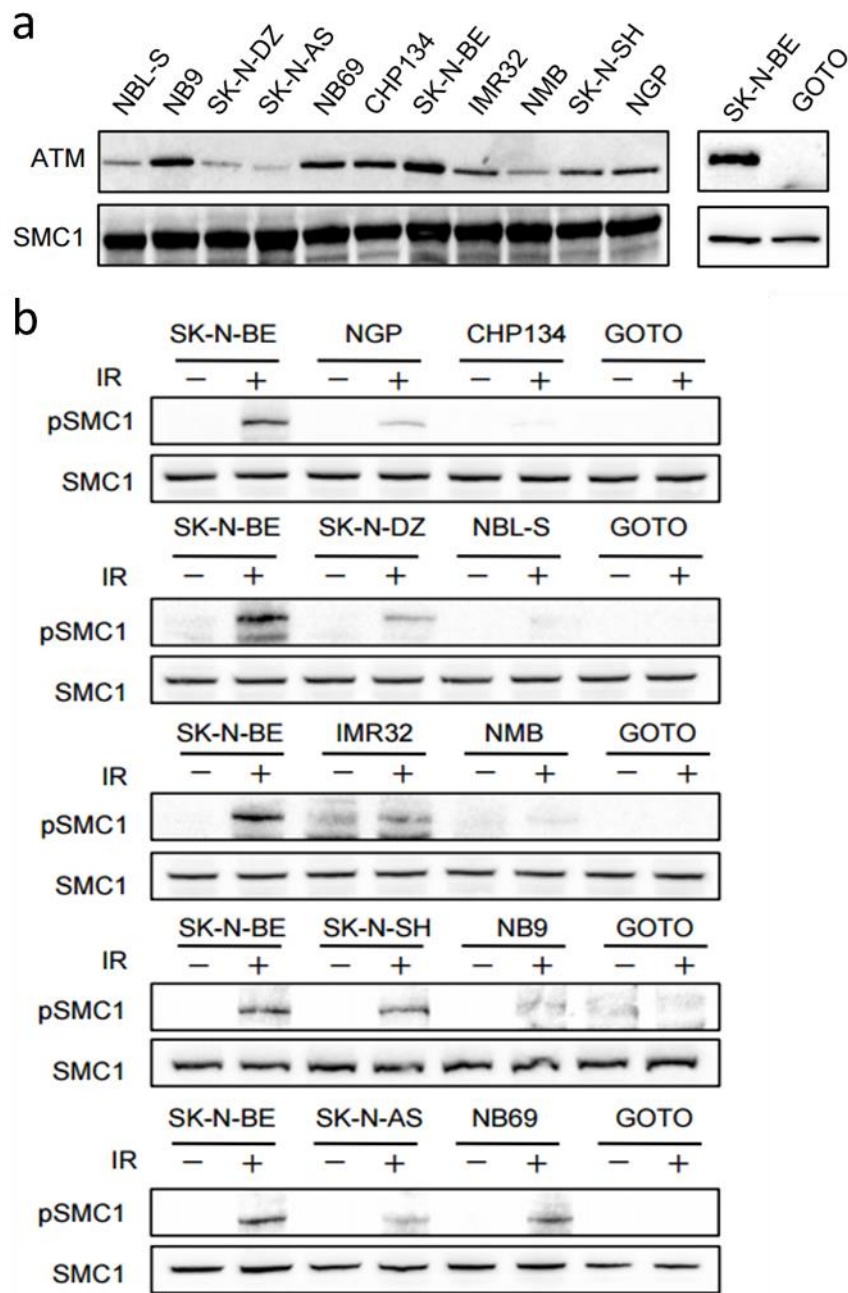
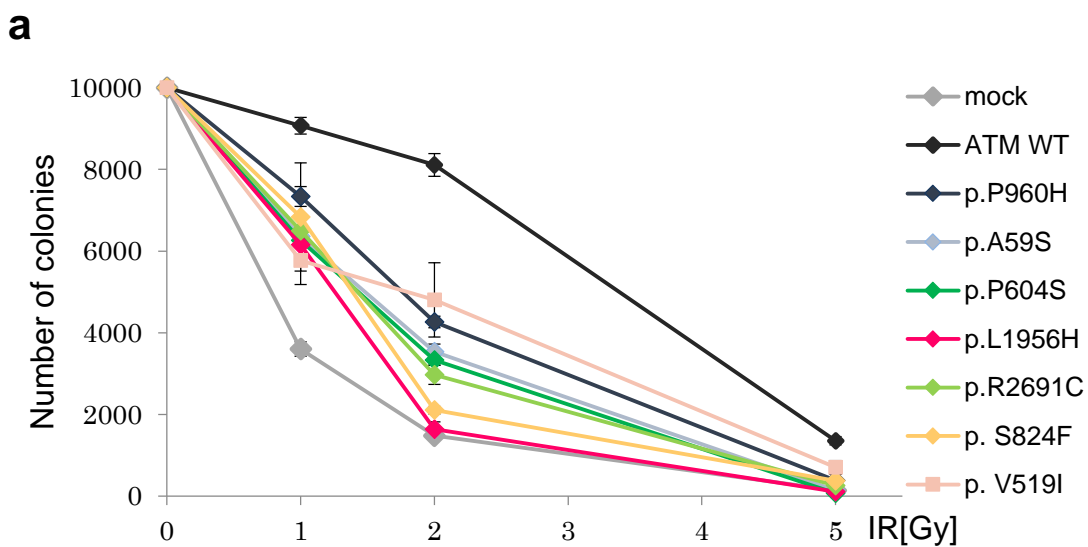


図 10 神経芽腫細胞株におけるウェスタンブロット法を用いた解析

(a) 神経芽腫細胞株の ATM 発現。SMC1 の発現も示した。(b) 放射線照射後の ATM 経路の活性化状態。細胞株に 2Gy の放射線照射を行い、1 時間後にリン酸化 SMC1(pSMC1)の発現を観察した。SK-N-BE は ATM の gain、GOTO は ATM の欠損を示す細胞株である。

ATM 変異の機能

腫瘍と健常人に検出された ATM 変異の性質を検討するために、ATM 変異を発現するベクターを構築し、ATM 欠損線維芽細胞 (AT 細胞株 GM05849C) に導入し、1Gy、2Gy、5Gy の X 線照射を行い、コロニー数の変化を観察した。一般に、ATM 機能障害を有する細胞は放射線に対して高感受性を示すが、腫瘍 (臨床検体あるいは細胞株) にのみ検出された ATM 変異を導入した細胞株と、健常人と腫瘍の両方に検出された ATM 変異を導入した細胞株は ATM 欠損細胞の放射線高感受性を修復しない傾向を示した。したがって、これらの変異は ATM 機能に障害をもたらすことが示唆された (図 11a,b)。これに対して健常人にのみ検出された他のすべての変異は ATM 欠損細胞の放射線高感受性を修復する傾向を示し、ATM の機能障害をもたらさないことが示唆された (図 11c)。



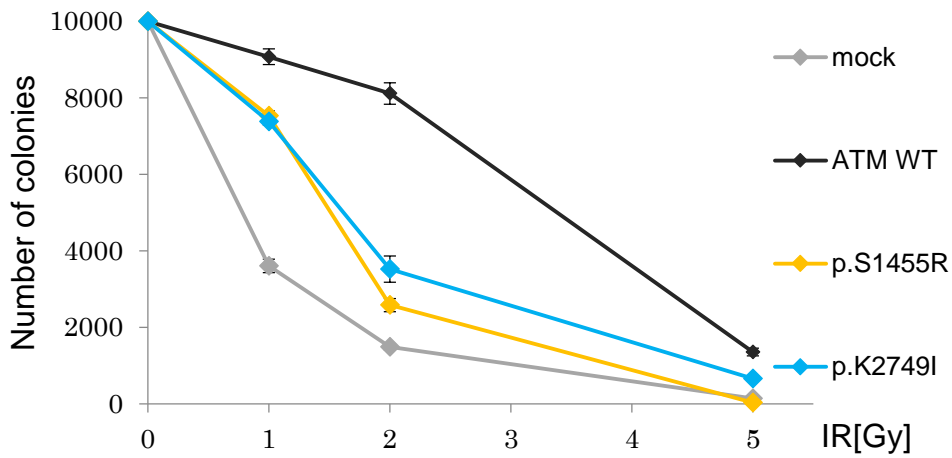
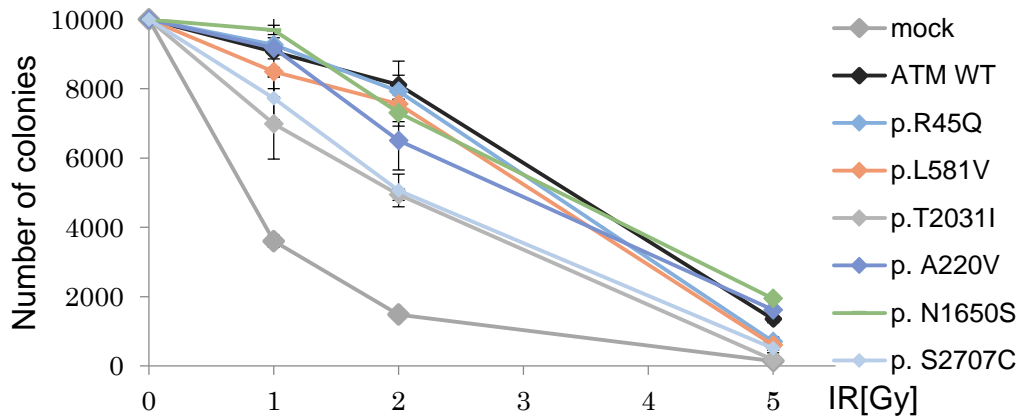
b**c**

図 11 ATM 変異を有する細胞の X 線照射後の生存率

偽の、野生型の、あるいは変異を有する *ATM* を導入した細胞に対して、1Gy、2Gy、5Gy の X 線照射を行った。3~6 回の実験によるデータを示した。(a) 腫瘍（臨床検体あるいは細胞株）にのみ検出された *ATM* の一塩基変異を導入した細胞のコロニー数の変化。(b) 健常人と腫瘍の両方に検出された *ATM* の一塩基変異を導入した細胞のコロニー数の変化。(c) 健常人だけに検出された *ATM* の一塩基変異を導入した細胞のコロニー数の変化。野生型 *ATM* を導入した細胞と偽の *ATM* を導入した細胞をそれぞれ陽性コントロール、陰性コントロールとして示した。

神経芽腫細胞株の相同組み換え修復への関与と PARP 阻害剤感受性の検討

ATM 阻害剤の KU55933 を神経芽腫細胞株 SK-N-BE 細胞に添加したところ、相同組み換え修復効率の低下が観察された (図 12)。次に、神経芽腫細胞株に PARP 阻害剤を添加し、コロニー数を観察したところ、SK-N-SH と SK-N-BE を除くすべての細胞株でコロニー数が減少し PARP 阻害剤への感受性が示唆された (図 13)。

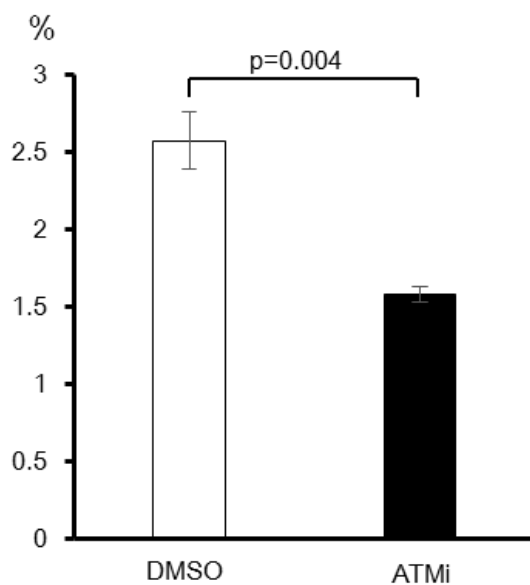


図 12 ATM 阻害剤を用いた **Direct repeat-green fluorescent protein (DR-GFP)** 相同組み換えアッセイ

ATM の相同組み換え修復への関与を調べるために、ATM 阻害剤 (KU-55933) を SK-N-BE 細胞株に添加後、ベクターを用いて DNA 二本鎖切断を誘導し、72 時間後にフローサイトメトリーを用いて green fluorescent protein (GFP) 陽性細胞の割合をモニターした。DMSO, Dimethyl sulfoxide; ATMi, ATM inhibitor。

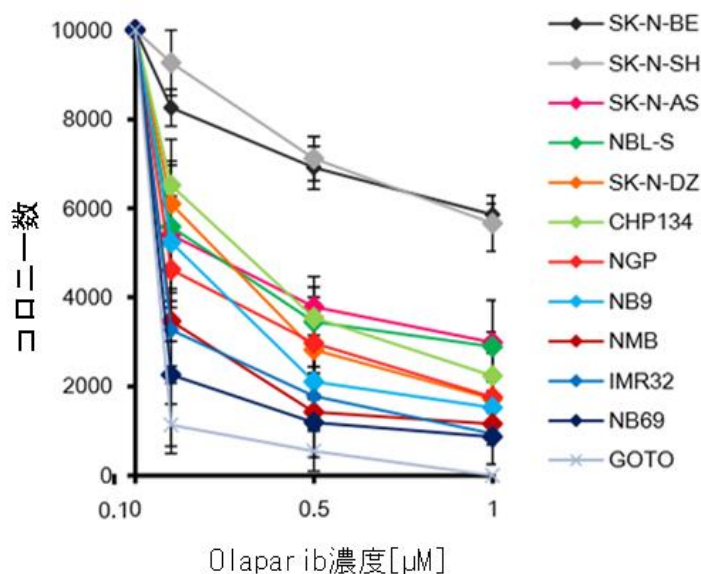


図 13 神経芽腫細胞株の PARP 阻害剤感受性

神経芽腫細胞株に PARP 阻害剤 Olaparib を添加し、コロニー数を観察した。

考察

これまでに 11q LOH は進行神経芽腫の 3 割程度に見られ予後不良に関与することが知られており、11q 上の標的遺伝子については過去にも検討されてきたが決定的な標的は判明していない。11q 上の *ATM* は標的候補の一つとされてきたが、*ATM* 経路と神経芽腫の関連性は十分に解明されておらず、全エクソンのターゲットアンプリコンシーケンス解析を多数例に行った報告は見られない。本研究では *ATM* の全エクソンのターゲットアンプリコンシーケンス解析を多数例に行った。結果をより詳細に解釈するために、網羅的コピー数解析、*ATM* 経路上の他の DNA 損傷応答関連遺伝子のコピー数と変異、*ATM* の発現、*ATM* 経路の活性化状態、*ATM* 変異株の放射線感受性、神経芽腫細胞株の PARP 阻害剤の感受性についても合わせて検討を行った。

まずコピー数解析では、臨床検体の 24%に 11qLOH を認め、その多くが 11q 上の *ATM* を含めた DNA 損傷応答関連遺伝子を欠損していた。

次に、アミノ酸変化を伴う *ATM* の変異は、日本あるいは海外の SNP データベースで SNP の報告の有無とその頻度を確認し、SNP データベースに登載がある場合は、頻度が低い場合は病的意義を有する可能性を否定できないと考え、頻度 1%以下のものに限り「変異」として採用するという条件の下で、臨床検体の 5.6%に同定され、そのほとんどはヘテロ接合性生殖細胞変異であった。神経芽腫 222 症例の全エクソン解析の報告では、アミノ酸変化を伴う *ATM* の変異は 2 例のみであったので(13)、ターゲットアンプリコンシーケンス解析によってより深い深度で変異解析を行ったことは有意義であったと考えられる。腫瘍における *ATM* 変異の部位は *ATM* タンパク質の全長にわたっており、機能喪失型の変異であることが示唆された。健常人の血液について臨床検体と同一の方法で変異解析を行い、臨床検体と同一の基準で変異候補を採用した結果、その頻度は臨床検体と同等であった。しかしながら、臨床検体と健常人の間で変異の種類に関して重複はほとんどなかった。変異の性質としては、AT 細胞株を用いた変異 *ATM* 導入による機能解析の結果、腫瘍に検出された変異は *ATM* の機能障害をもたらす、健常人だけに検出された変異は機能障害をもたらさないことが示唆された。ただし本研究の限界点として、変異 *ATM* を遺伝子導入した細胞株は神経芽腫由来ではなかったため、神経芽腫ではその他のゲノム異常の影響でこれらの *ATM* 変異によらず放射線感受性が変化する可能

性も考えられることから、これらの変異が真に神経芽腫の病態に関与しているかどうかは解明の余地がある。さらに、変異遺伝子導入後の *ATM* の発現量そろえる作業をしていないため、発現量の差による機能の差をみている可能性も否定できない。

続いて、コピー数解析と変異解析の結果を統合し、ゲノム異常の相互関係について検討したところ、11q 欠失群と *ATM* 変異群は相互排他的であった。本研究で対象とした症例数は限られており、とくに *ATM* 変異例は少ないため、正確な検討をするには限界があるが、この観察結果が別のコホートでも再現性のあるものであるとすると、*ATM* の片アレル異常、すなわち片アレルの *ATM* 欠損ないし変異のいずれか一方を有するだけでも神経芽腫の病態に関係があることが示唆された。近年同様の報告がある通り(38)、本研究においても *ATM* の片アレル欠損は *ATM* の発現量を低下させ *ATM* 経路の活性化を低下させる傾向が観察され、*ATM* の haploinsufficiency が病態に関与することが示唆された。*ATM* 欠損は 11q 欠失に伴うものであるため、*ATM* が 11q 上の他の多くのアレル欠損を伴うことにより神経芽腫の高悪性度に関与している可能性も考えられる。*ATM* の変異については、本研究の機能解析では正常片アレルの残存時にこれらの変異が機能に与える影響は不明であるので、ヘテロ接合性変異が病態に関与するかどうかは解明の余地があるが、欠失と変異が排他的であることから dominant negative により病態に関与している可能性も考えられる。実際に *ATM* の dominant negative 変異については報告が認められる(50)。

様々な腫瘍において *ATM* の生殖細胞のミスセンス変異は易発がん性に関与するとされている(27, 29, 30)。本研究の症例数は限られているものの、*ATM* の機能障害を来す生殖細胞変異が健常人と比較し神経芽腫症例に多かったことから、*ATM* の生殖細胞変異は神経芽腫発症の遺伝的リスクとなることが示唆された。AT 患者に神経芽腫が高頻度ではないことから、*ATM* 変異は神経芽腫の発症を来す唯一のドライバー変異ではなく、他の因子と関連して病態に関与すると考えられる。今後症例数を増やしてさらに詳細が解明されれば、遺伝カウンセリングの必要性や、二次癌予防のために放射線を用いた画像検査を最小限にするなどの検討が必要になるかもしれない。

ATM 変異と予後との関連性については、本コホートの *ATM* 変異例が少ないため、正確な解釈は困難であるが、*ATM* 変異は進行例に偏っていなかったため、そのすべてが予後不良とはならないと考えられる。慢性リンパ球性白血病においては *ATM* の両アレルの異常は予後不良因子であり、ヘテロ接合性生殖細胞変異や 11q 片アレル欠損は発症後残アレルの異常が発生した場合に病態の進展に関与することが報告されている(31)。本研究で用いた腫瘍は治療前生検あるいは初発時治療後の検体であり、再発腫瘍組織は含まれていないため、両アレル異常が検出されにくかった可能性も考えられ、神経芽腫においても治療の過程で両アレル異常を獲得した場合には高悪性度に関与するとも考えられる。

なお、本研究では運動失調の既往や家族歴の情報は得られていないが、*ATM* の生

殖細胞変異を認めた症例は AT のキャリアと考えられ、後年まで生存した場合には運動失調を発症する可能性も考えられる(51)。

ATM 以外の遺伝子変異は合計 20%の検体に認められ、変異遺伝子どうしは相互排他的であり、変異と欠失も相互排他的であった。このことから ATM 経路遺伝子の片アレル異常が病態に関与する可能性が示唆された。また、変異のほとんどは生殖細胞起源であった。このことから ATM 経路上の ATM 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子変異も神経芽腫発症の遺伝的リスクとなることが示唆された。

DNA 損傷応答関連遺伝子異常の有無と予後に関しては、異常陽性例の方が予後不良傾向を示したものの、本研究では有意差が認められなかった。本コホートの症例数が少ないこと、観察期間が短いものが含まれることから、正確な関係を知るには限界があると考えられる。病期に関しては進行例において異常が見られやすいことが証明され、このことから DNA 損傷応答関連遺伝子の片アレル異常が神経芽腫の進展に関与することが示唆された。

このような DNA 損傷応答関連遺伝子の片アレル異常は本研究ではすべての臨床検体のうちの 48%に同定された。本研究のコホートでは、MYCN 増幅群と 11q 欠失群の排他的な関係は示されなかったものの、過去の報告では両者は排他的傾向があるとされている(18)。神経芽腫において MYCN の過剰発現は miR-421 の発現を誘導し、さらに miR-421 は ATM の発現を抑制することが知られている(52)。そのため、いずれの群においても ATM の機能が抑制されている可能性が考えられる。さらに、

本研究で解析対象としなかった *FANCM*、*FANL*、*PALB2* 等の DNA 損傷応答関連遺伝子の異常についても文献報告が認められ(6, 13)、それらの症例でも *ATM* 経路が抑制されている可能性が考えられる。したがって進行神経芽腫の多くが様々な形で DNA 損傷応答障害を有する可能性も考えられる。

ATM 経路異常群への治療としては、放射線感受性が高いことを考慮し、集学的治療の中に放射線治療を優先的に取り入れた層別化治療も将来的には検討可能かもしれない。ほかに、DNA 損傷応答障害を利用した治療薬として、*PARP* 阻害剤が挙げられる。神経芽腫における *PARP* 阻害剤の有用性について述べられた文献も散見される。Norris らは神経芽腫を含む小児固形腫瘍の細胞株に抗がん剤と *PARP* 阻害剤を添加し、腫瘍発育抑制効果を認めたことを報告した(53)。Muller らは神経芽腫細胞株に *PARP* 阻害剤と放射線照射を併用し有効性を確認したと報告した(54)。*ATM* の同組み換え修復への関与は過去に報告されているが(42)、神経芽腫細胞株を用いた報告はこれまでにない。本研究では神経芽腫細胞株において初めて、*ATM* が相同組み換え修復に関与することを確認した。また、神経芽腫細胞株の *PARP* 阻害剤に対する感受性については、本研究では *ATM* に異常が同定されなかった細胞株を含めてほとんどの細胞株で感受性が認められた。たとえば CHP-134 と NB-9 は *ATM* の発現低下を示さず、pSMC1 の発現低下を示し、*PARP* 阻害剤感受性を示した。このことから *ATM* 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子異常の関連も示唆された。なお、CHP-134、SK-N-AS、NB-69、SK-N-DZ における *BRCA2*、*ATR*、*BARD1*、*BRCA 1* の一塩

基変異は COSMIC に登載されている（表 9）。

表 9 COSMIC 登載の神経芽腫細胞株の *ATM* 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子変異

| 細胞株名 | 遺伝子名 | アミノ酸変化 | 一塩基変異 | 位置 |
|---------|--------------|----------|-----------|-----------|
| CHP-134 | <i>BRCA2</i> | p.L2180F | c.6540G>C | 32915032 |
| SK-N-AS | <i>ATR</i> | p.V2158F | c.6472G>T | 142188259 |
| NB-69 | <i>BARD1</i> | p.Q237E | c.709C>G | 215645889 |
| SK-N-DZ | <i>BRCA1</i> | p.T539M | c.1616C>T | 41245932 |

COSMIC, catalogue of somatic mutations in cancer.

進行神経芽腫の多くが様々な形で DNA 損傷応答障害を有する可能性を考慮すると、難治性神経芽腫に対して PARP 阻害剤を用いた新規治療法の開発が予後の改善に寄与する可能性があることが期待された。

結論

ATM と神経芽腫との関連性について検討するために、*ATM* のプールシーケンス法を用いた全エクソターゲットアンプリコンシーケンス解析を行い、合わせて、網羅的コピー数解析、健常人の *ATM* 変異解析、*ATM* 経路上の遺伝子の変異解析、*ATM* の機能解析、PARP 阻害剤の使用検討等も行い、統合的解釈を試みた。その結果、*ATM* のヘテロ接合性生殖細胞変異が神経芽腫の病態に関与する可能性が新たに示された。また、*ATM* をはじめ、*ATM* 経路上の DNA 損傷応答関連遺伝子の片アレル異常が病態に関与し特に進行神経芽腫に認められやすい可能性も示され、難治例の治療への利用、中でも PARP 阻害薬の実用の可能性が期待された。

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、機能解析をご担当いただきました東京医科歯科大学医学部小児科の高木正稔先生、SNP アレイ、ターゲットシーケンスのラン・解析を行っていただきました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、関正史先生、瓜生久美子先生、同小児外科の星野論子先生、京都大学腫瘍生物学の吉田健一先生、佐藤悠佑先生、藤井陽一先生、片岡圭亮先生、佐藤亜以子先生、鈴木啓道先生、名古屋大学医学部小児科の奥野友介先生、群馬県赤十字血液センターの林泰秀先生、成育医療研究センターの加藤元博先生、東京医科歯科大学の水谷修紀先生、森尾友宏先生、土田里香先生、根本佳乃先生、西井理菜先生、宮本智史先生、小山高敏先生、順天堂大学の玉一博之先生、斎藤正博先生、清水俊明先生、長良医療センターの金子英雄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、JNBSG（日本神経芽腫研究グループ）佐賀県医療センターの中川原章先生・埼玉県立がんセンターの大平美紀先生、埼玉県立小児医療センターの花田良二先生、太田西の内病院小児科の生井良幸先生、また次世代シーケンサーに関する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ヒトゲノム解析センターの宮野悟先生、白石友一先生、千葉健一先生、田中洋子先生に深謝いたします。

引用文献

1. G. M. Brodeur, J. Pritchard, F. Berthold, N. L. Carlsen, V. Castel, R. P. Castelberry, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot, F. Hedborg, Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**, 1466-1477 (1993).
2. J. M. Maris, Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **362**, 2202-2211 (2010).
3. C. U. Louis, J. M. Shohet, Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annual review of medicine* **66**, 49-63 (2015).
4. Y. Chen, J. Takita, Y. L. Choi, M. Kato, M. Ohira, M. Sanada, L. Wang, M. Soda, A. Kikuchi, T. Igarashi, A. Nakagawara, Y. Hayashi, H. Mano, S. Ogawa, Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* **455**, 971-974 (2008).
5. Y. P. Mosse, M. Laudenslager, L. Longo, K. A. Cole, A. Wood, E. F. Attiyeh, M. J. Laquaglia, R. Sennett, J. E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N. J. Schork, G. M. Brodeur, G. P. Tonini, E. Rappaport, M. Devoto, J. M. Maris, Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **455**, 930-935 (2008).
6. J. J. Molenaar, J. Koster, D. A. Zwijnenburg, P. van Sluis, L. J. Valentijn, I. van der Ploeg, M. Hamdi, J. van Nes, B. A. Westerman, J. van Arkel, M. E. Ebus, F. Haneveld, A. Lakeman, L. Schild, P. Molenaar, P. Stroeken, M. M. van Noesel, I. Ora, E. E. Santo, H. N. Caron, E. M. Westerhout, R. Versteeg, Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* **483**, 589-593 (2012).
7. N. K. Cheung, J. Zhang, C. Lu, M. Parker, A. Bahrami, S. K. Tickoo, A. Heguy, A. S. Pappo, S. Federico, J. Dalton, I. Y. Cheung, L. Ding, R. Fulton, J. Wang, X. Chen, J. Becksfort, J. Wu, C. A. Billups, D. Ellison, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. R. Downing, M. A. Dyer, Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *Jama* **307**, 1062-1071 (2012).
8. Y. P. Mosse, M. Laudenslager, D. Khazi, A. J. Carlisle, C. L. Winter, E. Rappaport, J. M. Maris, Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *American journal of human genetics* **75**, 727-730 (2004).
9. D. Trochet, F. Bourdeaut, I. Janoueix-Lerosey, A. Deville, L. de Pontual, G. Schleiermacher, C. Coze, N. Philip, T. Frebourg, A. Munnich, S. Lyonnet, O. Delattre, J. Amiel, Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *American journal of human genetics* **74**, 761-764 (2004).
10. M. Capasso, M. Devoto, C. Hou, S. Asgharzadeh, J. T. Glessner, E. F. Attiyeh, Y. P. Mosse, C. Kim, S. J. Diskin, K. A. Cole, K. Bosse, M. Diamond, M. Laudenslager, C. Winter, J. P. Bradfield, R. H. Scott, J. Jagannathan, M. Garris, C. McConville, W. B. London, R. C. Seeger, S. F. Grant, H. Li, N. Rahman, E. Rappaport, H. Hakonarson, J. M. Maris, Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* **41**, 718-723 (2009).
11. J. M. Maris, Y. P. Mosse, J. P. Bradfield, C. Hou, S. Monni, R. H. Scott, S. Asgharzadeh, E. F. Attiyeh, S.

- J. Diskin, M. Laudenslager, C. Winter, K. A. Cole, J. T. Glessner, C. Kim, E. C. Frackelton, T. Casalunovo, A. W. Eckert, M. Capasso, E. F. Rappaport, C. McConville, W. B. London, R. C. Seeger, N. Rahman, M. Devoto, S. F. Grant, H. Li, H. Hakonarson, Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **358**, 2585-2593 (2008).
12. K. Wang, S. J. Diskin, H. Zhang, E. F. Attiyeh, C. Winter, C. Hou, R. W. Schnepf, M. Diamond, K. Bosse, P. A. Mayes, J. Glessner, C. Kim, E. Frackelton, M. Garris, Q. Wang, W. Glaberson, R. Chiavacci, L. Nguyen, J. Jagannathan, N. Saeki, H. Sasaki, S. F. Grant, A. Iolascon, Y. P. Mosse, K. A. Cole, H. Li, M. Devoto, P. W. McGrady, W. B. London, M. Capasso, N. Rahman, H. Hakonarson, J. M. Maris, Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature* **469**, 216-220 (2011).
 13. 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. Peadarallu, 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. Guidry 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).
 14. R. Spitz, B. Hero, K. Ernestus, F. Berthold, Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 52-58 (2003).
 15. E. F. Attiyeh, W. B. London, Y. P. Mosse, Q. Wang, C. Winter, D. Khazi, P. W. McGrady, R. C. Seeger, A. T. Look, H. Shimada, G. M. Brodeur, S. L. Cohn, K. K. Matthay, J. M. Maris, Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **353**, 2243-2253 (2005).
 16. R. E. George, E. F. Attiyeh, S. Li, L. A. Moreau, D. Neuberg, C. Li, E. A. Fox, M. Meyerson, L. Diller, P. Fortina, A. T. Look, J. M. Maris, Genome-wide analysis of neuroblastomas using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *PloS one* **2**, e255 (2007).
 17. F. Mertens, B. Johansson, M. Hoglund, F. Mitelman, Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer research* **57**, 2765-2780 (1997).
 18. C. Guo, P. S. White, M. J. Weiss, M. D. Hogarty, P. M. Thompson, D. O. Stram, R. Gerbing, K. K. Matthay, R. C. Seeger, G. M. Brodeur, J. M. Maris, Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* **18**, 4948-4957 (1999).
 19. E. Michels, J. Hoebeeck, K. De Preter, A. Schramm, B. Brichard, A. De Paepe, A. Eggert, G. Laureys, J. Vandesompele, F. Speleman, CADM1 is a strong neuroblastoma candidate gene that maps within a 3.72 Mb critical region of loss on 11q23. *BMC cancer* **8**, 173 (2008).
 20. K. Ando, M. Ohira, T. Ozaki, A. Nakagawa, K. Akazawa, Y. Suenaga, Y. Nakamura, T. Koda, T. Kamijo, Y. Murakami, A. Nakagawara, Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to

- chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *International journal of cancer* **123**, 2087-2094 (2008).
21. M. B. Kastan, J. Bartek, Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-323 (2004).
 22. J. Bartkova, Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldborg, M. Sehested, J. M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas, J. Bartek, DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864-870 (2005).
 23. V. G. Gorgoulis, L. V. Vassiliou, P. Karakaidos, P. Zacharatos, A. Kotsinas, T. Liloglou, M. Venere, R. A. Ditullio, Jr., N. G. Kastrinakis, B. Levy, D. Kletsas, A. Yoneta, M. Herlyn, C. Kittas, T. D. Halazonetis, Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907-913 (2005).
 24. S. Horibe, M. Takagi, J. Unno, M. Nagasawa, T. Morio, A. Arai, O. Miura, M. Ohta, M. Kitagawa, S. Mizutani, DNA damage check points prevent leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **21**, 2195-2198 (2007).
 25. M. Takagi, M. Sato, J. Piao, S. Miyamoto, T. Isoda, M. Kitagawa, H. Honda, S. Mizutani, ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in chronic myelogenous leukemia. *DNA repair* **12**, 500-507 (2013).
 26. R. A. Gatti, A. Tward, P. Concannon, Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Molecular genetics and metabolism* **68**, 419-423 (1999).
 27. S. V. Tavtigian, G. Chenevix-Trench, Growing recognition of the role for rare missense substitutions in breast cancer susceptibility. *Biomarkers in medicine* **8**, 589-603 (2014).
 28. T. Stankovic, G. S. Stewart, P. Byrd, C. Fegan, P. A. Moss, A. M. Taylor, ATM mutations in sporadic lymphoid tumours. *Leukemia & lymphoma* **43**, 1563-1571 (2002).
 29. N. J. Roberts, Y. Jiao, J. Yu, L. Kopelovich, G. M. Petersen, M. L. Bondy, S. Gallinger, A. G. Schwartz, S. Syngal, M. L. Cote, J. Axilbund, R. Schulick, S. Z. Ali, J. R. Eshleman, V. E. Velculescu, M. Goggins, B. Vogelstein, N. Papadopoulos, R. H. Hruban, K. W. Kinzler, A. P. Klein, ATM mutations in patients with hereditary pancreatic cancer. *Cancer discovery* **2**, 41-46 (2012).
 30. N. J. Roberts, A. L. Norris, G. M. Petersen, M. L. Bondy, R. Brand, S. Gallinger, R. C. Kurtz, S. H. Olson, A. K. Rustgi, A. G. Schwartz, E. Stoffel, S. Syngal, G. Zogopoulos, S. Z. Ali, J. Axilbund, K. G. Chaffee, Y. C. Chen, M. L. Cote, E. J. Childs, C. Douville, F. S. Goes, J. M. Herman, C. Iacobuzio-Donahue, M. Kramer, A. Makohon-Moore, R. W. McCombie, K. W. McMahon, N. Niknafs, J. Parla, M. Pirooznia, J. B. Potash, A. D. Rhim, A. L. Smith, Y. Wang, C. L. Wolfgang, L. D. Wood, P. P. Zandi, M. Goggins, R. Karchin, J. R. Eshleman, N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, R. H. Hruban, A. P. Klein, Whole Genome Sequencing Defines the Genetic Heterogeneity of Familial Pancreatic Cancer. *Cancer discovery* **6**, 166-175 (2016).
 31. A. Skowronska, A. Parker, G. Ahmed, C. Oldreive, Z. Davis, S. Richards, M. Dyer, E. Matutes, D. Gonzalez, A. M. Taylor, P. Moss, P. Thomas, D. Oscier, T. Stankovic, Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund

- Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 4524-4532 (2012).
32. D. Berrebi, M. N. Lebras, N. Belarbi, J. Couturier, S. Fattet, A. Faye, M. Peuchmaur, P. de Lagausie, Bilateral adrenal neuroblastoma and nephroblastoma occurring synchronously in a child with Fanconi's anemia and VACTERL syndrome. *Journal of pediatric surgery* **41**, e11-14 (2006).
 33. A. Serra, K. Eirich, A. K. Winkler, K. Mrasek, G. Gohring, G. Barbi, H. Cario, B. Schlegelberger, B. Pokora, T. Liehr, C. Leriche, D. Henne-Bruns, T. F. Barth, D. Schindler, Shared Copy Number Variation in Simultaneous Nephroblastoma and Neuroblastoma due to Fanconi Anemia. *Molecular syndromology* **3**, 120-130 (2012).
 34. A. Compostella, T. Toffolutti, P. Soloni, P. Dall'Igna, M. Carli, G. Bisogno, Multiple synchronous tumors in a child with Fanconi anemia. *Journal of pediatric surgery* **45**, e5-8 (2010).
 35. H. Bissig, F. Staehelin, M. Tolnay, P. Avoledo, J. Richter, D. Betts, E. Bruder, T. Kuhne, Co-occurrence of neuroblastoma and nephroblastoma in an infant with Fanconi's anemia. *Hum Pathol* **33**, 1047-1051 (2002).
 36. J. R. Antonio, A. C. Fett-Conte, J. A. Thome, A. E. Silva, E. M. Pozetti, P. C. Nakaoshi, E. C. Toledo, P. G. Leser, D. Sole, C. K. Naspitz, [Familial Bloom's syndrome associated with neuroblastoma]. *Revista paulista de medicina* **108**, 9-16 (1990).
 37. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Archives of disease in childhood* **82**, 400-406 (2000).
 38. S. J. Mandriota, L. J. Valentijn, L. Lesne, D. R. Betts, D. Marino, M. Boudal-Khoshbeen, W. B. London, A. L. Rougemont, E. F. Attiyeh, J. M. Maris, M. D. Hogarty, J. Koster, J. J. Molenaar, R. Versteeg, M. Ansari, F. Gumy-Pause, Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) silencing promotes neuroblastoma progression through a MYCN independent mechanism. *Oncotarget* **6**, 18558-18576 (2015).
 39. T. Stankovic, A. Skowronska, The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* **55**, 1227-1239 (2014).
 40. H. E. Bryant, N. Schultz, H. D. Thomas, K. M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N. J. Curtin, T. Helleday, Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913-917 (2005).
 41. H. Farmer, N. McCabe, C. J. Lord, A. N. Tutt, D. A. Johnson, T. B. Richardson, M. Santarosa, K. J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N. M. Martin, S. P. Jackson, G. C. Smith, A. Ashworth, Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917-921 (2005).
 42. A. Bakr, C. Oing, S. Kocher, K. Borgmann, I. Dornreiter, C. Petersen, E. Dikomey, W. Y. Mansour, Involvement of ATM in homologous recombination after end resection and RAD51 nucleofilament formation. *Nucleic acids research* **43**, 3154-3166 (2015).
 43. V. J. Weston, C. E. Oldreive, A. Skowronska, D. G. Oscier, G. Pratt, M. J. Dyer, G. Smith, J. E. Powell, Z. Rudzki, P. Kearns, P. A. Moss, A. M. Taylor, T. Stankovic, The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* **116**, 4578-4587 (2010).

44. C. H. Mermel, S. E. Schumacher, B. Hill, M. L. Meyerson, R. Beroukhir, 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 (2011).
45. K. Yoshida, M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W. K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H. P. Koeffler, L. Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano, S. Ogawa, Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64-69 (2011).
46. M. Seki, R. Nishimura, K. Yoshida, T. Shimamura, Y. Shiraishi, Y. Sato, M. Kato, K. Chiba, H. Tanaka, N. Hoshino, G. Nagae, Y. Shiozawa, Y. Okuno, H. Hosoi, Y. Tanaka, H. Okita, M. Miyachi, R. Souzaki, T. Taguchi, K. Koh, R. Hanada, K. Kato, Y. Nomura, M. Akiyama, A. Oka, T. Igarashi, S. Miyano, H. Aburatani, Y. Hayashi, S. Ogawa, J. Takita, Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun* **6**, 7557 (2015).
47. Y. Ziv, A. Bar-Shira, I. Pecker, P. Russell, T. J. Jorgensen, I. Tsarfati, Y. Shiloh, Recombinant ATM protein complements the cellular A-T phenotype. *Oncogene* **15**, 159-167 (1997).
48. I. Demuth, V. Dutrannoy, W. Marques, Jr., H. Neitzel, D. Schindler, P. S. Dimova, K. H. Chrzanowska, V. Bojinova, H. Gregorek, L. M. Graul-Neumann, A. von Moers, I. Schulze, M. Nicke, E. Bora, T. Cankaya, E. Olah, C. Kiss, B. Bessenyei, K. Szakszon, U. Gruber-Sedlmayr, P. M. Kroisel, S. Sodja, T. O. Goecke, T. Dork, M. Digweed, K. Sperling, J. de Sa, C. M. Lourenco, R. Varon, New mutations in the ATM gene and clinical data of 25 AT patients. *Neurogenetics* **12**, 273-282 (2011).
49. S. P. Scott, R. Bendix, P. Chen, R. Clark, T. Dork, M. F. Lavin, Missense mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patients with breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 925-930 (2002).
50. V. Navrkalova, L. Sebejova, J. Zemanova, J. Kminkova, B. Kubsova, J. Malcikova, M. Mraz, J. Smardova, S. Pavlova, M. Doubek, Y. Brychtova, D. Potesil, V. Nemethova, J. Mayer, S. Pospisilova, M. Trbusek, ATM mutations uniformly lead to ATM dysfunction in chronic lymphocytic leukemia: application of functional test using doxorubicin. *Haematologica* **98**, 1124-1131 (2013).
51. R. Saunders-Pullman, D. Raymond, A. J. Stoessl, D. Hobson, K. Nakamura, S. Pullman, D. Lefton, M. S. Okun, R. Uitti, R. Sachdev, K. Stanley, M. San Luciano, J. Hagenah, R. Gatti, L. J. Ozelius, S. B. Bressman, Variant ataxia-telangiectasia presenting as primary-appearing dystonia in Canadian Mennonites. *Neurology* **78**, 649-657 (2012).
52. H. Hu, L. Du, G. Nagabayashi, R. C. Seeger, R. A. Gatti, ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 1506-1511 (2010).
53. R. E. Norris, P. C. Adamson, V. T. Nguyen, E. Fox, Preclinical evaluation of the PARP inhibitor, olaparib, in combination with cytotoxic chemotherapy in pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* **61**, 145-150 (2014).
54. S. Mueller, S. Bhargava, A. M. Molinaro, X. Yang, I. Kolkowitz, A. Olow, N. Wehmeijer, S. Orbach, J.

Chen, K. K. Matthay, D. A. Haas-Kogan, Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibitor MK-4827 together with radiation as a novel therapy for metastatic neuroblastoma. *Anticancer research* **33**, 755-762 (2013).