

論文の内容の要旨

論文題目 Defective DNA damage response in neuroblastoma

(神経芽腫における DNA 損傷応答機構の破綻)

氏名 吉田美沙

神経芽腫には生物学的に多種多様な腫瘍が含まれるが、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新規治療法の開発が望まれている。神経芽腫に関連するゲノム異常として *MYCN* 増幅は最もよく知られ、予後不良因子として重要とされている。その他 *ALK*、*ATRX*、*PHOX2B* 等の変異、17q の不均衡増幅、1p、3p、あるいは 11q の欠失等が知られている。

中でも 11q Loss of Heterozygosity (LOH)、すなわち欠失ないし片親二倍体は非進行例に比べ進行例に多く、予後不良に関連するとされている。*MYCN* 増幅とは排他的傾向を示すため *MYCN* 増幅例とは異なる病態が推測されるが、11q の標的遺伝子については解明が不十分である。11q22.3 の *ATM* は DNA 損傷応答の中心を担い、その異常の病態への関与が多種の悪性腫瘍において知られているが、神経芽腫との関連については十分に解明されていない。*ATM* のホモ接合性生殖細胞変異を有する ataxia telangiectasia (AT) では神経芽腫の報告はまれである。近年、11q 欠失神経芽腫では *ATM* の発現量が低く、*ATM* の haploinsufficiency が高悪性度に関与している可能性があることが報告された。進行神経芽腫の全エクソン解析を行った報告では、アミノ酸変化を伴う *ATM* 変異は 2 例のみ報告されている。腫瘍の変異解析では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ている場合には、アレル頻度の低い変異は全エクソン解析の深度では同定されない可能性も考えられる。AT では神経芽腫がまれであることから、神経芽腫において *ATM* は発症のドライバー変異というよりは進展や耐性等の高悪性度への関与が推察され、*ATM* 変異は発症時にはアレル頻度の低い変異である可能性も推測される。十分な読み取り深度で多数例の *ATM* 変異解析を行った報告は検索可能な範囲でこれまでにないため、本研究では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行うことを計画した。加えて、コピー数解析、健常人の *ATM* や *ATM* 経路上遺伝子の変異解析も行い、さらに共同研究によって機能解析を行い、より詳細な解明を試みた。

対象は神経芽腫細胞株 45 株と神経芽腫臨床検体 159 検体とした。臨床検体は international neuroblastoma staging system の stage4 83 例、stage3 28 例、stage2 18 例、stage4S 7 例、stage1 23 例であった。臨床検体は全国多施設で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。変異の起源を検討するため臨床検体 9 例の非腫瘍組織を用いた。ATM 変異の病的意義を検討するため健常日本人ボランティア 171 名の末梢血を用いた。これらの検体から DNA を抽出し解析に用いた。

コピー数解析では SNP アレイを用いた網羅的解析 (Affymetrix GeneChip 50K/250K array) を行った。変異解析は対象遺伝子の全エクソントラゲットアンプリコンシーケンスを行った。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。SNP 登載とそのアレル頻度の確認には NCBI dbSNP 131/132、1000 Genomes Project、Human Genetic Variation Database (HGVD)を用いた。機能解析では、変異型 ATM を SV40 導入 ATM 欠損線維芽細胞 GM05849C (AT 細胞株)に導入し、薬剤選択後ウェスタンブロット法により遺伝子発現を確認し、放射線感受性を観察した。また、Direct repeat-green fluorescent protein (DR-GFP) 相同組み換えアッセイを用いて ATM の神経芽腫細胞株における相同組み換え修復への関与を検討した。さらに神経芽腫細胞株に poly ADP ribose polymerase (PRAP)阻害剤を作用させコロニー数を観察し感受性を検討した。

結果、コピー数解析では臨床検体の 24%に 11q LOH が検出された。11q LOH の共通領域には ATM のほか、ATM 経路の DNA 損傷応答関連遺伝子である MRE11A、H2AFX、CHEK1 も存在し、これらについて神経芽腫細胞株における発現を確認した。また、250K を用いた検体では Genomic Identification of Significant Targets in Cancer (GISTIC) 解析も行った。これはがんにおいてコピー数変動が有意である領域を抽出し標的遺伝子同定を試みる解析であるが、11q22.1-11q24.3 の q 値が低く、同領域に前述の 4 つの遺伝子が含まれた。これらの結果は ATM が神経芽腫における 11q 欠失の標的遺伝子である可能性を裏付けた。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等から解析対象に加えた。

ATM 変異は臨床検体の 5.6%に同定され、そのほとんどは生殖細胞起源の変異であった。健常人の ATM 変異解析を腫瘍と同一の方法で行い、変異としての採用基準も同一とした結果、変異頻度は 5.2%で、腫瘍と同一の変異はほとんど認めなかった。ATM 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子変異は臨床検体の 20%に検出され、ほとんどが生殖細胞起源であった。

ゲノム異常の相互関係としては、11q 欠失と *ATM* 変異は相互排他的であり、*ATM* 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子についても変異遺伝子どうし相互排他的であり、変異と欠失も排他的傾向を示した。DNA 損傷応答関連遺伝子の変異あるいは欠失を有する症例は全体の 48% を占め、進行例は非進行例と比較して 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) であった。

予後との関連性としては、生存曲線では DNA 損傷応答関連遺伝子異常陽性群は予後不良傾向を示したが、有意差は認められなかった。

ATM の発現に関しては *ATM* ハプロイドの神経芽腫細胞株では低下傾向を認めた。*ATM* の下流分子であるリン酸化 *SMC1* の発現は *ATM* ハプロイドの細胞株の大部分で放射線照射後に減弱した。*ATM* 変異株を用いた機能解析では、腫瘍に検出された変異は *ATM* 欠損細胞の放射線高感受性を修復しない傾向が、健常人に検出された変異は修復する傾向がそれぞれ観察され、腫瘍に検出された変異だけが *ATM* の機能障害をもたらす可能性が示唆された。DR-GFP 相同組み換えアッセイにより、*ATM* 阻害剤添加神経芽腫細胞株における相同組み換え修復効率の低下が観察された。さらに、神経芽腫細胞株への *PARP* 阻害剤添加によって大部分の細胞株でコロニー数減少が観察された。

ATM の機能障害をもたらす生殖細胞変異が健常人と比較し臨床検体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* に神経芽腫が高頻度ではないことから *ATM* 変異は他の因子と関連して病態に関与すると考えられる。慢性リンパ球性白血病では *ATM* の両アレル異常は予後不良因子であり片アレルの欠損や変異は発症後に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と報告されている。本研究で用いた検体は未治療生検あるいは初発時治療後の検体である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。

11q 欠失と *ATM* 変異は相互排他的であったことから、*ATM* はがん抑制遺伝子とされているものの、*ATM* の片アレル欠損ないし変異のいずれか一方だけでも神経芽腫の病態に関与する可能性が示唆された。*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* の変異は腫瘍に検出された変異だけが *ATM* の機能障害をもたらす可能性が示唆され、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。ただし本研究の機能解析では正常片アレル残存時の *ATM* 機能は不明である。

ATM 経路の *ATM* 以外の遺伝子についても、変異遺伝子どうし相互排他的であり、変異と欠

失も排他的傾向を示したため、*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、変異の起源の多くは生殖細胞であったことから、これら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。

予後に関しては、DNA 損傷応答関連遺伝子異常陽性群の方が予後不良傾向を示したものの有意差は認められなかった。本コホートの症例数が少ないことや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結果を得、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可能性が示唆された。

神経芽腫において *MYCN* の過剰発現は *miR-421* の発現を誘導し *miR-421* は *ATM* の発現を抑制することが知られている。*MYCN* 増幅群と 11q 欠失群は排他的傾向を示すとされているがいずれの群でも DNA 損傷応答障害の関与が推察される。本研究では臨床検体の 48% に DNA 損傷応答関連遺伝子の片アレル異常が同定されたが、本研究で対象としなかった DNA 損傷応答関連遺伝子についても神経芽腫における変異の報告が認められる。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。

PARP 阻害剤は 1 本鎖 DNA 切断を修復する *PARP* の機能を阻害するため、相同組み換え修復機能欠損細胞に加えると DNA 損傷が修復されず細胞死が誘導される。*BRCA1* あるいは *BRCA2* 機能不全の乳がん等では臨床試験が進んでいる。子宮頸癌等の細胞株において *ATM* は相同組み換え修復に関与することや、*ATM* 機能不全の白血病やリンパ腫に対する *PARP* 阻害剤の有効性も報告されている。神経芽腫細胞株においても *PARP* 阻害剤の有効性が報告されている。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。さらに、*ATM* に異常が同定されなかった株も含め大部分の細胞株の *PARP* 阻害剤感受性を確認し、この結果からも *ATM* 以外の DNA 損傷応答関連遺伝子異常が示唆された。進行神経芽腫の多くが 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する *PARP* 阻害剤を用いた治療法の開発が予後の改善に寄与する可能性が期待された。

本研究により、*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している可能性と、*ATM* 経路の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が新たに示され、難治例の治療への利用も期待された。