

平成30年6月10日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15533

研究課題名(和文) 二次がんを発症した小児における生殖細胞系列のがん感受性遺伝子変異の同定

研究課題名(英文) Mutation of cancer predisposition genes in children with secondary neoplasms

研究代表者

加藤 元博 (Kato, Motohiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・医長

研究者番号：40708690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：「二次がん」は小児がん克服者の最も重要な晩期合併症のひとつである。一方、近年、小児がんの病態には生殖細胞系列のパリアントの関与が報告されている。そこで本研究では、「小児がん治療後に二次がんを発症した患者」を対象に、全エクソン解析を行い、がんに関与することが報告されている162遺伝子における機能異常をきたしうる生殖細胞系列のパリアントを検出した。二次がん発症者27例のうち5例(18.5%)がパリアントを持っており、対照である非小児がん罹患者の104例中3例(2.8%)に比べて有意に頻度が高いことが示された。小児がん罹患後の二次がんの発症に、遺伝的ながん感受性が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Secondary malignant neoplasms (SMNs) are one of the most important late complication in the treatment of pediatric malignancies. Recently, higher prevalence of germline mutation in cancer-predisposition genes in children with SMNs compared to that in non-cancer population have been reported. Here, we investigated the frequency of genetic mutation in 162 cancer-predisposition genes in 27 cases who suffered SMNs with whole exome sequencing. Germline variants were detected in 5 of the 27 (18.2%) cases with SMNs, and the frequency was higher than that of control cohorts (3 of 104 cases [2.8%]). Germline cancer predisposition affects susceptibility to SMNs in cases with pediatric cancer.

研究分野：小児血液・腫瘍学

キーワード：癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児がん患者の二次がん発症

小児がん患者の長期生存率が向上した結果、小児では成人に比べて治療後の生存期間が長いこともあり、小児がん克服者 (Childhood Cancer survivor) の晩期合併症がより重要視されるようになった。

小児がん治療後の晩期合併症のなかで最も深刻なもののひとつが、「二次がん」の発症である。化学療法・放射線療法を受けた小児がん患者の治療終了後のがんの発症率は一般人口より高いことが報告されており、治療開始から 10 年後では約 1-5%とされている。さらに、二次がんの罹患率は治療終了から 10 年が経過した以降も飽和せずに増加し続け、20 年後は 2-20%まで上昇することが報告されている。

(2) がん発症と生殖細胞系列変異

これまでのがんの分子病態解明を目的とした研究では、がん細胞に後天的に生じた分子遺伝学的異常を主な標的として解析が行われてきた。実際に応募者はがん細胞のゲノム解析を通じ、リンパ腫 (Kato M et al. Nature 2009) や白血病 (Kato M et al. J Pediatr 2013, Kato M et al. Br J Haematol [in press]) など病態の理解につながる成果をあげてきた。一方で、近年では、正常な細胞 (= 生殖細胞系列) の遺伝子変異や多型が、がんの発症や病型・治療経過に影響を及ぼすことが認識され、応募者も同様の成果を報告した (Tanaka Y, Kato M et al. Br J Haematol 2015)。

すなわち、後天的な体細胞変異だけでなく、先天的な生殖細胞系列の変異も含めて包括的にとらえることががんの分子病態の理解に重要と考えられる。実際に、年少児に生じる悪性腫瘍である悪性ラブドイド腫瘍 (MRT) はその約 3 割に原因遺伝子である SMARCB1 遺伝子の生殖細胞系列の変異を認めるという報告もなされている。

この点をさらに演繹し、「小児がん罹患後に二次がんを発症した症例は、がん感受性遺伝子の変異を生殖細胞系列に持つことによって極端に発がんリスクが高い症例、すなわち診断されていない好発がん症候群 (undiagnosed cancer predisposition syndrome) が高密度に濃縮されている」との仮説に至った。実際に、家族のがん罹患が二次がん発症のリスクとなると報告されていることは、この仮説の傍証と考えられる。

2. 研究の目的

上述の仮説を検証するために、二次がん患者を対象に生殖細胞系列のがん関連遺伝子の変異を検出し、二次がんの発症における生殖細胞系列の遺伝的背景の役割を探索する、という計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) 対象

国立成育医療研究センターならびに研究協力施設から得られた 27 例の小児がん発症後の二次がん症例の生殖細胞系列のサンプルを用いて、全エクソーム解析を実施した。対照群として、未診断疾患患者に対する網羅的遺伝子診断プロジェクトである Initiative on Rare and Undiagnosed (IRUD) に登録された、104 名の非がん者のエクソーム解析結果を使用した。

また、生殖細胞系列の変異の検出方法を確認するために、MRT の 14 例を対象に、SMARCB1 の生殖細胞系列の異常を集中的に行った。

(2) 解析対象遺伝子

解析対象の遺伝子として、前述の小児がんの生殖細胞系列変異を報告したコホート研究 (Gröbner SN et al, Nature, 2018) で用いられた、162 の遺伝性がん素因症候群に関連する遺伝子リストを使用した。これらは優性遺伝形式の 110 遺伝子と劣性遺伝形式の 52 遺伝子で構成されている。

(3) データ解析

まず稀少なバリエントを抽出するために、全エクソーム解析の結果得られた遺伝子の中で、1000 ゲノムプロジェクトのデータベースにおける頻度が 0.1% より大きなものを除外した。また、dbSNP と 1000 ゲノムプロジェクトの両方に登録されているバリエントも除外した。

次に病的意義のあるバリエントを抽出するために、コーディング領域またはスプライシング領域にフレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異のあるバリエントを抽出した。その中からインフレーム変異は除外した。抽出したバリエントの情報を、複数の遺伝子特異的オンラインデータベース (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), NCBI ClinVar, International Agency for Research on Cancer TP53 (IARC), Breast Cancer Information Core (BIC), Leiden Open Variation Database (LOVD)) の登録情報と比較した。

このようにして得られたバリエントを、データベースの情報に加え 3 つの In-Silico の機能予測アルゴリズム (SIFT, Polyphen-2, CADD) の結果を用いて、5 つのカテゴリー (Pathogenic, Probably Pathogenic, Uncertain, Probably Benign, Benign) に分類した。Pathogenic には、がん抑制遺伝子のナンセンス変異またはフレームシフト変異などのトランケーション変異、またはデータベースで Pathogenic と登録されているバリエントを分類した。Probably Pathogenic には、データベースで Likely Pathogenic とされているバリエント、または 3 つの In-Silico の機能予測アルゴリズムの全てにおいて機能異常と判定され、かつ COSMIC に既知の変異として登録されているバリエントを分類した。ただし後者の中で、いずれかのデータベースに

Uncertain, Likely Benign, Benign と登録されているものは、Probably Pathogenic から除外した。Probably Benign には Database で Probably Benign または Likely Benign とされているもの、Benign には Database で Benign とされているバリエーションを分類し、その他は Uncertain に分類した。

4. 研究成果

(1) 悪性ラプドイド腫瘍の生殖細胞系列の SMARCB1 変異の頻度

14 例の MRT について、まず腫瘍細胞にみられる SMARCB1 変異を確認した。直接変異解析法、droplet digital PCR、SNP アレイ解析により集中的に変異およびコピー数解析、LOH 解析を行い、13 例で両アレルの SMARCB1 異常を検出した。

これらの検出された SMARCB1 異常について、その由来が生殖細胞系列にあるかどうかを末梢血検体を用いて解析したところ、8 例(57%)が生殖細胞系列の変異に由来することが明らかになった。うち 2 例はモザイクであり、近年進歩した解像度の高いゲノム解析を行うことで、従来報告されているよりも高い割合で生殖細胞系列の異常が検出されることが明らかになった。

(2) 二次がん発症者の生殖細胞系列変異

全エクソーム解析を行った二次がん症例 27 例のうち、最初のがんの診断時年齢の中央値は 4 歳、二次がん診断時の中央値は 11.5 歳だった。最初のがんが血液悪性腫瘍だった症例は 15 例で、そのうち二次がんが血液悪性腫瘍であったものは 11 例、固形腫瘍であったものは 4 例だった。最初のがんが固形腫瘍であった 12 例のうち、二次がんが血液悪性腫瘍であったものと固形腫瘍であったものはそれぞれ 6 例ずつであった。

生殖細胞系列の変異

二次がん 27 例の中で、優性遺伝形式をとるがん関連遺伝子において、Pathogenic または Probably Pathogenic に分類された変異を有する症例は 5 例 (18.5%) であり、TP53 や DICER1 の変異などであった。

これらのうち LZTR1 の変異を有した症例 (症例 9) は、エクソン 7 内のフレームシフト変異ならびにエクソン 19 内のナンセンス変異の、2 つのヘテロ接合体を同時に有していた。対照群の 104 例の中で、Pathogenic または Probably Pathogenic に分類された変異を有する症例は 3 例 (2.8%) であり、有意に二次がん発症者は Cancer predisposition の遺伝的背景を持つことが示された ($P < 0.01$)。

二次がん発症者における Cancer predisposition の頻度は小児がん患者全体の生殖細胞系列の変異頻度を示した既報告 (Zhang J et al. N Engl J Med. 2015, Gröbner SN et al, Nature. 2018) の比率 7.6-8.4% (914 例中 70 例ならびに 1120 例中 95 例) と比して高い傾向にあることが確認さ

れた。

二次がんの背景にある遺伝的素因を特定することで、二次がんのリスクを空いていることが可能になり、放射線照射やアルキル化剤など、二次がんを誘発しやすい治療を避けるなど、より晩期合併症に配慮した治療骨格の個別化が可能になることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Ueno-Yokohata H, Okita H, Nakasato K, Hishiki T, Shirai R, Tsujimoto S, Osumi T, Yoshimura S, Yamada Y, Shioda Y, Kiyotani C, Terashima K, Miyazaki O, Matsumoto K, Kiyokawa N, Yoshioka T, Kato M. *Genes Chromosomes Cancer* [in press]
2. Tsujimoto S, Osumi T, Uchiyama M, Shirai R, Moriyama T, Nishii R, Yamada Y, Kudo K, Sekiguchi M, Arakawa Y, Yoshida M, Uchiyama T, Terui K, Ito S, Koh K, Takita J, Ito E, Tomizawa D, Manabe A, Kiyokawa N, Yang JJ, Kato M. Diplotype analysis of NUDT15 variants and 6-mercaptopurine sensitivity in pediatric lymphoid neoplasms. *Leukemia* [in press]
3. Osumi T, Tsujimoto S, Tamura M, Uchiyama M, Nakabayashi K, Okamura K, Yoshida M, Tomizawa D, Watanabe A, Takahashi H, Hori T, Yamamoto S, Hamamoto K, Migita M, Ogata-Kawata H, Uchiyama T, Kizawa H, Ueno-Yokohata H, Shirai R, Seki M, Ohki K, Takita J, Inukai T, Ogawa S, Kitamura T, Matsumoto K, Hata K, Kiyokawa N, Goyama S, Kato M. Recurrent RARB Translocations in Acute Promyelocytic Leukemia lacking RARA Translocation. *Cancer Res* [in press]
4. Osumi T, Tsujimoto S, Nakabayashi K, Taniguchi M, Shirai R, Yoshida R, Uchiyama T, Nagasawa J, Goyama S, Yoshioka T, Tomizawa D, Kurokawa M, Matsubara Y, Kiyokawa N, Matsumoto K, Hata K, Kato M. Somatic MECOM mosaicism in a patient with congenital bone marrow failure without a radial abnormality. *Pediatr Blood Cancer* 2018 Jan 22[Epub ahead of print]

[学会発表](計 1 件)

1. Yoshida M, Kato M, et al. Germline Genetic Predisposition to Secondary

Malignant Neoplasms in Children. The 50th congress of the International Society of Pediatric Oncology.

2. Shirai R, Kato M, et al. High prevalence of SMARCB1 germline abnormality in rhabdoid tumors. The 50th congress of the International Society of Pediatric Oncology.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 元博 (Kato, Motohiro)

国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・医長

研究者番号：40708690

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉田 仁典 (Yoshida, Masanori)

国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・臨床研究員

白井 了太 (Shirai, Ryota)

国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・臨床研究員

大隅朋生 (Osumi, Tomoo)

国立成育医療研究センター・小児血液・腫瘍研究部・臨床研究員