

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10992

研究課題名(和文) 難治性希少肉腫である淡明細胞肉腫の治療標的となるゲノム異常の探索

研究課題名(英文) Genomic analysis for detecting therapeutic targets in clear cell sarcoma

研究代表者

岩田 慎太郎 (Iwata, Shintaro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：90549685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：希少がんの一種である明細胞肉腫における治療標的となりうる遺伝子異常を同定するため、国内の肉腫専門施設より腫瘍検体を収集し、次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を行った。明細胞肉腫における特異的融合遺伝子が同定された症例においては、遺伝子変異数が多い群で予後不良であること、また一部の症例に共通の遺伝子変異が存在することが明らかとなった。さらにはこの融合遺伝子によりその下流にあるMiTF及びc-METの発現量は増大しており、これにより腫瘍細胞の増殖が促進することが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

その希少性ゆえに新規薬剤の開発が進まない希少がんにおいて、貴重な組織検体を施設の垣根を超えて持ち寄り解析を行うことは大変重要である。我が国の誇る遺伝子解析技術を利用した遺伝子解析により、難治性疾患である明細胞肉腫の治療標的が同定されることで、有効な薬剤がない本疾患への新たな治療戦略が構築されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to identify genetic aberrations that may be therapeutic targets in clear cell sarcoma, we collected tumor specimens from sarcoma centers in Japan and performed genomic analysis using next-generation sequencers.

In cases where a specific fusion gene was identified in clear cell sarcoma, the prognosis was worse in the group with a higher number of gene mutations, and some cases harbored a recurrent mutation. Furthermore, the expression of MiTFs and c-METs downstream of the fusion gene was increased, which was expected to promote tumor cell growth of clear cell sarcomas.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：遺伝子解析 融合遺伝子 発現解析 明細胞肉腫

## 1. 研究開始当初の背景

淡明細胞肉腫 (Clear cell sarcoma, CCS) は稀な軟部肉腫の一種であり、全軟部肉腫の1%以下である。主に四肢の腱や筋膜などの深部軟部組織に発生し、高率に局所再発・所属リンパ節転移および遠隔転移をきたすことが知られている。本腫瘍は皮膚腫瘍である悪性黒色腫との病理学的近似性を示しており、またいずれもS-100、HMB-45、メラニンが陽性であることから、CCSは悪性黒色腫の軟部の counterpartとも言われている。しかしながら遺伝学的にはCCSは悪性黒色腫とは異なる特徴を持つことが知られている。CCSは特異的な融合遺伝子を高頻度に持ち、t(12;22)(q13;q12)相互転座により*EWS-ATF1*融合遺伝子を形成する。一方悪性黒色腫は特異的遺伝子変異として*BRAF*変異が約半数に、*KIT*変異は2-6%に認められ、これらの遺伝子変異は悪性黒色腫のtumorigenesisへの強い関与が示唆されているが、しかしCCSにおけるこれらの遺伝子変異の発生率は非常に低いことが知られている。CCSに対する治療は局所治療としての広範切除術が基本である。一方遠隔転移や局所進行病変に対する全身治療としての化学療法は悪性黒色腫においてはその有効性が認められているのに対し、CCSは薬剤抵抗性腫瘍と認識されている。近年悪性黒色腫においては*BRAF*、*KIT*変異を標的とした分子標的治療薬 (*BRAF* inhibitor, *MEK* inhibitor, c-*KIT* inhibitorなど) がすでに臨床試験の実施へと進んでいる。しかしながらその希少性から、CCSにおけるまとまった症例数での変異解析の報告は未だ無い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床検体を用いたCCSの網羅的変異及び発現解析を行うことで、治療標的となりうるような遺伝子変異を同定することである。具体的には国内施設より収集した臨床検体を用いての次世代型シーケンサーによるwhole exome sequence及びRNA-sequenceを実施し、CCSの治療標的となりうる疾患特異的遺伝子変異を同定した上で、本遺伝子変異の臨床的意義の確認および発現解析を通じての治療標的としての可能性の探索を目的とする。本研究の成果は、未だ難治性である本疾患に対する新たな治療の提供に繋がると期待される。

## 3. 研究の方法

### A) CCS における融合遺伝子の同定

希少疾患である骨軟部腫瘍に対して中央病理診断、ゲノム解析、情報解析が一体として実施可能な骨軟部腫瘍ゲノム解析コンソーシアム参加施設より収集された腫瘍組織および正常組織(もしくは末梢血)の一部を収集し、試料として用いた。すべての検体は骨軟部腫瘍病理専門家による中央病理診断を経て診断の再確認と検体の評価を行った。既に共同研究機関において採取され施設内に保存されている検体についても、本人もしくは家族から文書による同意が得られた場合に、研究利用を行なうこととした。但し死亡や転居などで本人、家族とどうしても連絡がとれない場合については、本疾患の希少性を鑑みて、試料を連結不可能匿名化した上で解析を行なう事とした。

CCSでは腫瘍特異的融合遺伝子である*EWSR1-ATF1*が90%以上の症例で認められることが知られており、また形態病理診断だけでは確定診断が困難であることもあるため、*EWSR1-ATF1*融合遺伝子を検出することで診断確定とし、本研究対象とすることとした。具体的には、*EWSR1*プローブを用いたFISH/CISH解析を行うこと、及びRNA-sequenceによる融合遺伝子の同定を行った。

### B) 臨床検体を用いた CCS の疾患特異的遺伝子変異の同定

CCS腫瘍凍結切片よりHE染色を実施し、腫瘍細胞の含有率の測定を行ったうえで、腫瘍および正常組織よりDNA、RNAを精製後、次世代シーケンサー(Hiseq2500)にてwhole exome sequence(WES)を東京大学医科学研究所にて行なった。解析によって得られた配列データは東京大学医科学研究所のスパコンを使ってヒトゲノム参照配列に対してマッピングを行った。これにより腫瘍特異的な新規遺伝子変異を同定することを試みた。

### C) RNA-sequence による CCS の遺伝子発現プロファイルの解明

CCS では腫瘍特異的融合遺伝子である *EWSR1-ATF1* によってコードされる蛋白は、メラノサイト分化のマスター転写因子である microphthalmia-associated transcription factor (MiTF) 遺伝子のプロモーター領域に結合してこれを活性化し、CCS の持つ特徴的なメラニン産生を誘導する他、CCS 細胞の腫瘍性増殖に関与すると考えられている。本研究では、収集された腫瘍凍結組織より RNA を抽出し、RNA-sequence による遺伝子発現プロファイル、特に MiTF 関連遺伝子群の発現プロファイルに注目して解析を行った。また同時に収集された臨床情報を元に、本遺伝子変異や MiTF 関連遺伝子発現と臨床病理学的因子(予後や化学療法奏効性など)との関連を検討した。

## 4. 研究成果

### A) CCS における融合遺伝子の同定

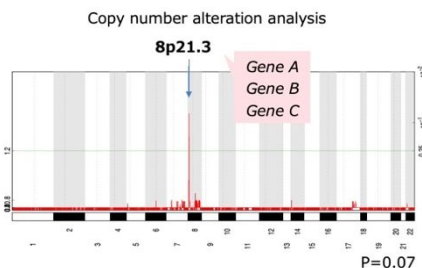
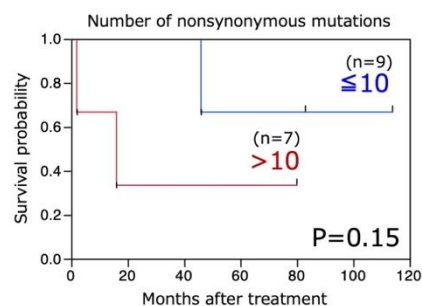
CCS の臨床検体(腫瘍組織及び正常組織あるいは末梢血検体)は骨軟部腫瘍ゲノム解析コンソーシアム参加施設 10 施設から、合計 27 症例 56 検体が収集された。このうち骨軟部腫瘍専門病理医による病理診断レビューが実施され、形態から 1 例が CCS とは言えず除外となった。また *EWSR1* プローブを用いた FISH/CISH 解析では実施可能であった 26 例中 14 例で break-apart が確認されるにとどまった。通常 CCS における *EWSR1* 融合遺伝子の FISH/CISH での検出率は 90%以上と報告されていることから、病理学的に CCS と判定された対象症例中での、真の CCS の特定を行う必要が生じた。そこで、*EWSR1-ATF1* を対象とした targeted RNA-sequence を実施し、融合遺伝子の有無を解析したところ、26 例中 21 例(80.7%)においてのみ *EWSR1* 融合遺伝子が同定できた。この内訳としては、20 例(95%)に *EWSR1-ATF1* を認めたが、1例のみに *EWSR1-CREB1* を認めた。FISH/CISH 解析と targeted RNA-sequence による解析の結果は、1例以外は一致した。以上より、形態病理診断に加え遺伝子的診断を組み合わせることで CCS の正診率は上昇すると考えられた。

### B) 臨床検体を用いた CCS の疾患特異的遺伝子変異の同定

上記より遺伝子的にも CCS と診断された症例のうち 16 例で WES が実施され、得られた遺伝子変異候補を IGV で検証した結果、合計 151 個の nonsynonymous SNV(1~42 個、1 症例あたり平均 9.4 個)を同定した。また indel は 13 個、stopgain は 7 個であった。一塩基置換のパターンは C>T が最も高頻度であり(43%)、T>A が最も低かった(9%)。

WES 実施 16 例における生存曲線による予後因子解析の結果、1 症例あたりの mutation 数が 10 個以上の症例(7 症例)で予後不良である傾向があることがわかった(P=0.15)。また 16 例中 3 例(19%)に遺伝子 X の recurrent mutation が認められたが、本遺伝子変異と予後との相関は認められなかった。

コピー数異常解析では 16 症例中 9 例で 8p21.3 の gain を認めたが、RNA-seq の結果では、この領域内に存在する 3



### C) RNA-sequence による CCS の遺伝子発現プロファイルの解明

26 例の対象症例において RNA-sequence を実施し、MiTF に加え HGF と c-MET の発現量をそれぞれ算出した。c-MET は MiTF の下流に存在し、HGF と MiTF にその発現が制御されている。targeted RNA-sequence にて *EWSR1-ATF1* を認めた 21 例と、*EWSR1-ATF1* が認められなかった 5 例との間で MiTF、HGF、c-MET の発現量を比較したところ、*EWSR1-ATF1* を持つ症例は有意に MiTF 及び c-

MET の発現量が高かった ( $P=0.038$ ,  $P=0.048$ )。これに対し、*EWSR1-ATF1* の影響を受けない HGF の発現量は、両者の間で有意な差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩田慎太郎
2. 発表標題 進捗報告「明細胞肉腫」
3. 学会等名 第8回骨軟部腫瘍ゲノムコンソーシアム班会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田慎太郎
2. 発表標題 進捗報告「明細胞肉腫」
3. 学会等名 第10回骨軟部腫瘍ゲノムコンソーシアム班会議
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	巽 康年  (TATSUMI YASUTOSHI)  (00450578)	千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター 腫瘍ゲノム研究室・研究員   (82504)	
研究分担者	松田 浩一  (MATSUDA KOICHI)  (90401257)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授   (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------