

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07330

研究課題名（和文）希少がんである脊索腫における腫瘍原生並びに治療標的となるゲノム変異の探索

研究課題名（英文）The whole genome analysis to rule out responsible mutation inducing chordoma

研究代表者

秋山 達（Akiyama, Toru）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：40376471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脊索腫検体12個から全ゲノムを抽出し、遺伝子変異を解析した。既知の遺伝子変異も同定されたが、さらに2つの新しい変異が複数の症例で確認された。ほかの腫瘍ではがん遺伝子として報告されており、脊索腫においても腫瘍原性遺伝子の役割を果たしていることが推定される。現在、in vitroならびにin vivoの解析を進めると同時に論文化を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義
脊索腫発生に係ると思われる未知の遺伝子変異が複数確認された。本データをもとに研究を進めており、今後、新規治療薬や新規治療選択肢の開発に役立つと思われる。

研究成果の概要（英文）：The result of 12 specimens of chordoma revealed novel 2 mutation. These mutations are positive candidates of driver genes of chordoma occurrence. Now, we are writing the paper to report these mutations as driver genes of chordoma occurrence. Furthermore, we are preparing for in vitro and in vivo researches to confirm the oncological functions of these mutations in terms of chordoma occurrence.

研究分野：がん遺伝子

キーワード：脊索腫 希少がん がん遺伝子 創薬 precision medicine 悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

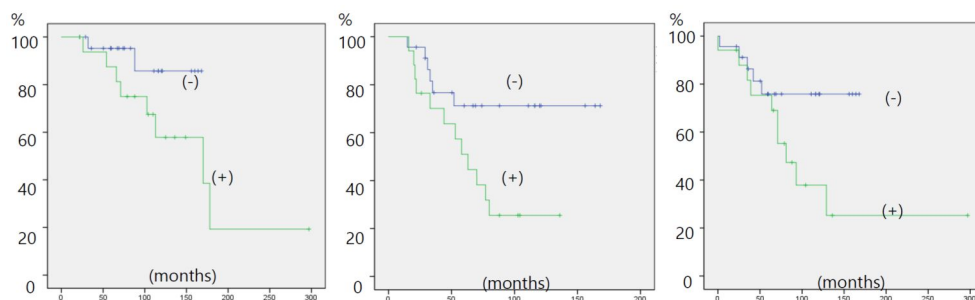
国内の20医療機関、8研究機関からなる骨軟部腫瘍ゲノムコンソーシアムを通じて、希少がんである脊索腫に対して網羅的な全エクソームシーケンス解析(WES)を実施することで、脊索腫特異的なdriver変異・治療標的分子の同定を目指す。解析に際しては脊索腫の良性前駆病変である良性脊索細胞腫と遺伝子変異を比較することでこれまでの解析では行えなかった悪性化分子機構の核心部分の解析を行う。また、脊索腫は低悪性度腫瘍に区分されるが10年生存率・局所再発率はともに約40%と非常に予後が悪く、既存の脊索腫病理評価法の見直しが必要である。本研究では網羅的なWESの結果と臨床情報、病理所見を照合し、脊索腫の病理評価法の再構築も行う。よって、脊索腫治療を大きく前進させることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では希少がんである脊索腫に対し、骨軟部腫瘍ゲノムコンソーシアムのネットワークを通して検体を収集しており、豊富な凍結検体を保有することを特色とする。骨軟部腫瘍の臨床を行っている国内の主要医療機関の大半が参加しており、海外の研究グループと比較しても優位性を持つネットワークの構築が行われている。

本研究では脊索腫の腫瘍原生遺伝子変異と治療に直結しやすい脊索腫特異的なdriver変異・治療標的分子の同定を第一に目指す。脊索腫の良性前駆病変のBNCTに関する遺伝子変異はこれまでに研究されておらず、当然ながらBNCTと脊索腫の遺伝子背景の比較研究は行われていない。今回、BNCTと脊索腫の遺伝子変異を比較し、その差異を解析することで脊索腫の悪性化メカニズムが解明できると考えられる。

脊索腫の病理分類にはこれまでGradeという概念がなかったが、我々の解析データでは微小スキップ転移巣と微小腫瘍塞栓の存在が脊索腫の長期進行性に相関することが明らかである(下図は左から微小スキップ転移の有無と全生存率、局所再発率、遠隔転移発生を示す)。



これらの知見から脊索腫はいくつかの病理組織学的Gradeに区分可能であると思われる。今後明らかになる遺伝子変異パターンからも病理学的診断法を再構築する予定である。病理学的評価が極めて重要であるが、本研究では骨軟部腫瘍の病理診断で実績のある九州大学、都立駒込病院が中央病理施設として診断した本コンソーシアムの検体を、BNCTを同定した分担研究者の山口が再解析をすることで、さらに精度が高い解析が可能になる。

以上のことから本研究グループを通じて中央病理診断、実績あるゲノム解析・情報解析機関が協力体制を取ることで、これまでその希少性故に基礎・臨床研究の両面で遅れ

ていた脊索腫の 1：新たな細胞遺伝学的診断マーカーの確立、2：治療標的の明確化、3：病理診断法の再構築が期待され、新規治療薬の開発や個別化医療につながる基盤の確立が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 本研究で何をどのように、どこまで明らかにしようとするのか

研究計画の全体像と研究者代表者並びに分担者の役割

・ 本研究の主目標は、治療標的分子が未解明な希少肉腫である脊索腫の腫瘍原生遺伝子変異の同定、新規治療標的となりうる分子の探索、病理診断法の再構築である。これを達成するため、本研究グループと骨軟部腫瘍ゲノム解析コンソーシアム、全国の骨軟部腫瘍治療専門施設との連携による、本邦全体での取り組み体制を想定している。

・ コンソーシアムにより収集された臨床検体の病理評価を行い、DNA 精製後に次世代型シーケンサーによるWESとターゲットシーケンス (TS)、情報解析を実施する (担当：松田)。

・ 高頻度に変異を認めた遺伝子変異については、国内の骨軟部腫瘍研究グループに共同研究の提案することでさらに多数の検体を収集し検証を行う。同時収集された臨床情報を元に、本遺伝子変異と臨床病理学的因子との関連を検討する (担当：秋山・山口・川井)。

・ 同定された遺伝子変異について、in vitroとin vivoの機能解析を行う (担当：秋山)。

研究計画および方法

A) BNCTと脊索腫の疾患特異的遺伝子変異の同定： コンソーシアム参加20 施設より収集された正常組織およびBNCTならびに脊索腫検体を用い、DNA の精製を行う。すべての腫瘍組織検体は中央病理診断を経て診断の再確認と検体の評価を行っている。まず腫瘍凍結切片よりHE 染色を実施し、腫瘍細胞の含有率の測定を行う。精製後のgenomic DNA 1-4ug を用いHiSeq2500 にてWESを東京大学医科学研究所にて行う。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ーパーコンピュータを使ってヒトゲノム参照配列に対してマッピングを行い正常組織およびBNCTと脊索腫の遺伝子変異を比較する。また、微小スキップ転移巣ならびに微小腫瘍塞栓に関連する遺伝子変異も解析する。これにより腫瘍特異的な新規遺伝子変異を同定する。すでにコンソーシアム参加20 施設において倫理審査は承認済みである。必要に応じ対象をコンソーシアム外の施設に広げ、検体の提供を募ると同時に、FFPE サンプルから抽出した微量DNA を用いてのWESもしくはTSの実施も考慮に入れる。基本的には網羅的なWESを実施予定であるが、既報や今回のWESの解析結果を踏まえて解析対象遺伝子を選択しTSを行うことも検討する。TSは解析対象配列のリード数が多くなるため、質の劣化したFFPE由来DNAにおいても安定した解析結果が得られることが示されている。脊索腫は人口10万人に対して0.09人以下の発症数と希少であり、FFPE組織を解析対象に含むことで、目標数の解析が達成出来ると考えられる。すでに46例の検体の存在し、前向きに検体の収集を進めており、今後も試料の追加が見込まれている。さらにSanger Instituteが公表している脊索腫WESデータを参照配列にマッピングされた形式(cram形式)で入手する予定である。このデータと我々のデータを同時に解析することで頻度は低いものの臨床的には重要な意味を持つ遺伝子異常を同定することも可能となる。

B) 候補遺伝子変異の多数検体による検証と臨床的意義の検討： 高頻度に変異を認めた遺伝子変異については、国内の骨軟部腫瘍治療専門施設の大多数が参加する骨軟部肉腫治療研究会に共同研究の提案することで、さらに多数の検体を全国の骨軟部腫瘍専門施設より収集し、その存在の検証を行う。候補遺伝子変異の検索は東大医科研で実施する。また同時に収集された臨床情報並びに組織学的所見と遺伝子変異との関連を検討することで治療標的の同定と病理診断再構築が可能になるため、臨床的意義は高いと考えられる。

C) 候補遺伝子変異の機能解析および治療標的分子の探索： 高頻度に変異を認めた遺伝子変異について機能解析を進める。阻害剤などが入手可能な分子や既に治療薬が開発済みの分子については有力な治療標的と考え、臨床研究に向けた検討を開始する。脊索腫細胞株で標的分子が活性化を示す細胞株に対し、阻害剤を加えin vitroでの増殖抑制効果を検討する。効果が認められた薬剤については、nude mice を用いた皮下移植モデルにて増殖抑制効果をin vivo で検討する。既存の治療薬・阻害剤が入手できない分子については、標的分子としてのスクリーニングを進める。まず候補分子について、レトロウイルスを用いた遺伝子導入、及びsiRNAを用いたノックダウンの系にて腫瘍化の促進効果を検討する。このスクリーニングにて有望なターゲットと考えられた分子については、さらなる解析を進める。膜タンパク質、酵素については、抗体薬や阻害剤のスクリーニングを行う。それ以外の分子については下流の増殖シグナルを同定し、その阻害剤を治療薬として用いる。

4 . 研究成果

本研究において二つの脊索腫発生原因となりうる遺伝子変異の候補を複数の症例で見出した。また、染色体転座も見出した。本来であればこのあとin vitro、in vivoの実験系で確認すべきではあるが、世界的な新型コロナ蔓延の影響で研究が著しく遅れ、今後の研究として現在準備しているところである。これらの遺伝子変異は学会発表並びに論文投稿を現在進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	山口 岳彦 (Yamaguchi Takehiko) (80245125)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	川井 章 (Akira Kawai) (90252965)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・科長 (82606)	
研究分担者	松田 浩一 (Koichi Matsuda) (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