

令和 2 年 7 月 12 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15230

研究課題名（和文）ゲノムワイド関連解析を用いた中枢神経系胚細胞腫瘍の発がんリスク遺伝子の解明

研究課題名（英文）Genome-Wide Association Study for Central Nervous System Germ Cell Tumor

研究代表者

寺島 慶太（Terashima, Keita）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児がんセンター・診療部長

研究者番号：70649681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、ゲノムワイド関連解析による、中枢神経系胚細胞腫瘍の疾患感受性遺伝子の同定である。全国の8つの医療機関において研究参加同意を得られた、患者・サバイバー138名の末梢血検体から、DNAの抽出が行われた。DNA検体は、研究協力機関の大阪大学に送付され、日本人用にカスタマイズされた1塩基多型アレイを用いた遺伝子解読が行われた。現在、本疾患の発生と関連する遺伝子型や遺伝子を同定するためのデータ解析が行われている。また、検体はコネチカット大学に送付され、全ゲノム解読法という新しい技術を用いた遺伝子解析が進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感受性遺伝子の解明によって、本腫瘍の、個人の遺伝情報に応じた発がん機構をつきとめることが可能となる。その分子機構を阻害する分子標的薬によって、従来の非特異的治療を代替・補完するオーダーメイド治療の開発が成功すれば、本腫瘍に罹患した子どもや若者の生存率の向上のみならず、生存者の晩期合併症を軽減し、良好な成長発達と充実した社会活動を得ることができる。胚細胞腫瘍には家族内発生例があることから、患者家族の生殖細胞系列において感受性遺伝子の変異を調べることで、個人の遺伝情報に応じた発症予測が可能となり、スクリーニング検査による早期発見早期治療といった2次予防に活用することができる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to identify disease susceptibility genes in central nervous system germ cell tumors by genome-wide association analysis. DNA was extracted from 138 peripheral blood samples of patients and survivors who obtained consent to participate in the study at 8 medical institutions nationwide.

The DNA sample was sent to Osaka University, which is a research cooperation institute, and subjected to gene decoding using a single nucleotide polymorphism array customized for Japanese population. Currently, data analysis is being performed to identify the genotypes and genes associated with the development of this disease.

In addition, the sample was sent to the University of Connecticut, and gene analysis using a new technique called whole genome sequencing is in progress.

研究分野：小児脳腫瘍

キーワード：中枢神経胚細胞腫瘍 GWAS WGS SNPアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CNSGCTは、主として思春期小児や若年成人の松果体部またはトルコ鞍上部に発生する、比較的まれな悪性脳腫瘍である。発生頻度が欧米よりも日本をはじめとするアジアで高く、2009年版脳腫瘍全国集計調査報告 (Neurologia medico-chirurgica, 2014)によると、15歳未満の小児脳腫瘍の14.4%を胚細胞腫瘍が占め、これは米国の3.6%(Central Brain Tumor Registry of the United States: Neuro-Oncology, 2012)を大きく上回る。また、発生の男女比が約3対1と特徴的であることや家族例が存在することから、その発生に遺伝学的要因が強く関係していることが示唆される。しかしながら現在、本腫瘍の発生しやすさに関連した感受性遺伝子は同定されていない。

CNSGCTは細胞傷害性化学療法や放射線療法への感受性が比較的高い。ジャーミノーマの生存率は良好であるが、放射線療法に伴う合併症が生存者の成長発達・社会復帰に与える影響は甚大である。一方、再発率生存率が高い、悪性非ジャーミノーマ性GCTの標準治療や再発腫瘍の治療法は確立していない。CNSGCTの発症メカニズムの解明は、分子標的薬による新規治療開発に必須である。

2009年に発表された精巣のGCTの2つの独立したGWASで見つかったKITLGのvariationのオッズ比は2.5-3と、これまで報告された多くのがん関連遺伝子よりも高く、そのリスク遺伝子多型の民族差が精巣GCTの発生率の民族差と関連していることが示唆された(Nature Genetics, 2009)。その後も欧米のGWAS研究によって、DMRT1、TERT、ATF7IP(Nature Genetics 2010)、DAZL、PRDM14(Nature Genetics 2013)と精巣GCTの興味深い感受性遺伝子の同定が相次いだ。しかしながら、これらの知見が、CNS GCTに当てはまるかどうかは、まだ検証されていない。

研究代表者らが、CNS GCTの腫瘍ゲノムの網羅的解析研究において、生殖系列ゲノムも同時に解析を行ったところ、JMJD1C遺伝子配列上に新規のまれな生殖系列変異が、日本人患者において有意に多く存在していることを報告した(Nature, 2014)。JMJD1Cはヒストン脱メチル化酵素デメチラーゼをコードし、アンドロゲン受容体のコアアクチベーター活性補体である。本遺伝子が、CNS GCTの発生しやすさに関連した感受性遺伝子の一つであることが示唆された結果である。それ以外にも、対照群よりも患者群において高頻度に認められたエクソン上の稀な変異が発見されており、これらが真に感受性遺伝子なのであるかどうかを、大規模なコホートで検証する必要がある。

既知のCNSGCTとの関連が予想される遺伝子以外にも、本疾患の疫学的事実が示唆する遺伝的背景の強さ、および精巣GCTにおいて複数の関連遺伝子が同定されていることより、CNSGCTの未知の関連遺伝子の存在が予想され、それをゲノムワイドな手法で発見できるかどうか、本研究課題の最も核心をなす学術的な問いである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ゲノムワイド関連解析(GWAS)による、中枢神経系胚細胞腫瘍(CNSGCT)の疾患感受性遺伝子の同定である。個体の生殖細胞系列ゲノムに認める疾患感受性と、すでに研究が先行している腫瘍細胞のゲノムおよびエピゲノムに高頻度で認められる特徴を複合的に解析することによって、本腫瘍の発症メカニズムを解明し、個人の遺伝情報に応じた本腫瘍の新規治療法や予防法の標的を定めることが、研究開発の狙いである。

CNSGCTの基礎研究については、これまで腫瘍細胞の性質、特に近年はゲノム解析が世

界中で行われ、KIT、KRAS、AKT、MTOR などの癌遺伝子異常が解明されつつある。しかしながら、生殖細胞系のゲノムに注目した研究の報告はなく、本腫瘍の発生しやすさに関連した感受性遺伝子は同定されていない。

GWAS のための genotyping の方法として SNP アレイを用いた手法が確立しているが、次世代シーケンス技術の進歩に伴い、whole exome および whole genome sequencing の効率が飛躍的に向上し費用も劇的に低下した。本研究において、生殖細胞系の genotyping に、次世代シーケンスを用いて、直接的に候補遺伝子を探索するのは創造的な試みであり、本手法によって行われる GWAS 研究、発がん機序において遺伝性要素が強いと考えられる小児がんであり、少ない患者数で GWAS が可能な本テーマにおいて施行されるべき独自性の高い試みであると考ええる。また、SNP アレイについても、本研究費採択後に新たに研究協力者となった、大阪大学遺伝統計学の岡田らが開発した、多くの疾患と関連がある HLA タイピングを含めた、日本人向けにカスタマイズされた、SNP アレイを用いて日本人に多い本腫瘍の関連遺伝子探索に活用する。

同定された感受性遺伝子と、研究者らの先行研究で明らかになっている腫瘍細胞に高頻度で認める癌遺伝子異常の相互作用を、分子生物学的手法によって解明し、本腫瘍の、個人の遺伝情報に応じた発がん機構をつきとめることが可能となる。その分子機構を阻害する分子標的薬によって、従来の非特異的治療を代替・補完するオーダーメイド治療の開発が成功すれば、本腫瘍に罹患した子どもや若者の生存率の向上のみならず、生存者の晩期合併症を軽減し、良好な成長発達と充実した社会活動を得ることができる。

CNSGCT や他の GCT には家族内発生例があることから、患者家族の生殖細胞系列において感受性遺伝子の変異を調べることで、個人の遺伝情報に応じた GCT の発症予測が可能となり、スクリーニング検査による早期発見早期治療といった 2 次予防に活用することができる。

CNSGCT はアジアの子どもや若者において発症頻度が高く、多くの若年人口を抱える他のアジアの国の医療レベルが向上されるのに従い、CNSGCT と診断されるアジアの若者が急増することが予想される。本研究を通じて、この腫瘍のオーダーメイド治療が普及すれば、より多くの患者の生存率と QOL を向上させることができる。

3. 研究の方法

サンプル収集に際しては、現在 10 の脳腫瘍診療施設が各施設の倫理審査を通したのちに検体収集を行っている。対象の数については、一般に小児疾患の場合成人期の疾患と比較して患者が暴露する環境要因が多様でなく、かつ病因において遺伝要因の占める割合が高いと想定されること、欧米人と比較し遺伝学的に homogeneous な日本人集団を対象とすることから比較的少ない対象者の解析で関連する遺伝要因を検出可能であることを勘案し、先行する欧米成人における精巢 GCT のふたつの GWAS 研究の患者数 (730 人および 277 人) を参考に算出した。研究協力医療機関は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠した研究計画の倫理審査を受ける。書面にてインフォームド・コンセントを本人または代諾者から取得したのちに、CNS GCT の診断がついている患者から採血された末梢血 2-3ml が、連結可能匿名化後に委託機関を通じて収集・DNA 抽出され、連結可能匿名化された診療情報とともに国立成育医療研究センター (成育) に送付保管される。

収集された Discovery cohort150 人の DNA サンプルを用い、成育および研究協力機関において生殖細胞系ゲノム解析を行う。既知の候補遺伝子の多型・変異の解析は Ion Torrent

Custom Ampliseq を用いた targeted sequencing を行い (国立がん研究センター、市村幸一) unbiased な GWAS には次世代シーケンサーによる whole genome sequencing を用いる (Jackson Laboratory Genomic Medicine、Ching C. Lau)。当初の計画にはなかったが、unbiased な GWAS の手法として、日本人向けにカスタマイズされた SNP アレイも行う (大阪大学 遺伝統計学、岡田随象)。公的データベースより得た非患者の対照ゲノムと患者ゲノム上に観察されるゲノム変異の頻度を比較し、 p 値 $< 10^{-7}$ - 10^{-8} レベルという強い相関関係を示す 遺伝子変異多型を探索する。そのゲノム変異について、CNS GCT の発生や病態と関連があるかどうか、遺伝子の機能、腫瘍の生物学的特性、expression quantitative trait locus 解析結果などを総合的に分析し、これまでの知見と照らし合わせて検討し、感受性遺伝子を同定する。次年度、引き続き収集中である 150 人の replication cohort の DNA サンプルを用い、候補となった感受性遺伝子変異の頻度を targeted sequencing によって調べて確認を行う。

4. 研究成果

1. 本研究計画に賛同し倫理審査を通過した全国の **10** のうち **8** 施設の医療機関において、**CNSGCT** の患者・サバイバー**150** 名から研究参加の同意を得られた。

表 1 . 研究参加・検体提供施設一覧

岐阜大学医学部附属病院
慶應義塾大学病院
国立成育医療研究センター
埼玉医科大学国際医療センター
静岡県立こども病院
兵庫県立こども病院
和歌山県立医科大学附属病院
北海道大学病院

2. 実際に採血された末梢血検体は、委託機関エス・アール・エルに送付され、その後 **DNA** の抽出が行われ、成育に集められた。成育で行われた **DNA** のクオリティコントロールの結果、ゲノタイピングに十分な質と量が得られた **DNA** 検体は合計で **138** 件であった。

表 2 . **138** 検体の **DNA** 抽出結果

	抽出後検体量(ul)	DNA 濃度(ug/ul)	DNA 量(ug)
平均値	524	0.339	146
中央値	550	0.309	139

3. はじめに、抽出・分注された **DNA** 検体 **138** 人分が、研究協力機関のひとつである大阪大学遺伝統計学教室 (岡田随象教授) に送付された。岡田研究室では、日本人用にカスタマイズされた **SNP** アレイを用いたゲノタイピングが行われた。現在、**CNSGCT** 発生と関連する **HLA** タイプおよび遺伝子を同定するためのデータ解析を行っている。
4. 一方、**DNA** 検体 **138** 人分は同様に、もうひとつの研究協力機関であるコネチカット大学 (**Ching Lau** 教授) に送付された。**Lau** 研究室では、全ゲノム解析 (**whole genome**

sequencing)を用いたゲノタイピングが進行中である。今後その結果は解析され、**CNSGCT** 患者に高頻度に起こる **variation** および **mutation** を同定していく。

5. さらに、残余検体を国立がん研究センター（市村幸一教授）に送り、**pilosequencing** 法によって、既知の **GCT** 関連遺伝子を **targeted sequencing** によって確認することを予定している。
6. また、上記 **10** の協力施設では、引き続き患者・サバイバーのリクルートが行われており、上記の実験で同定された、関連遺伝子、その変異および **HLA** タイプを確認するための **validation** コホートサンプルを収集している。
7. 新しい **SNP** アレイプラットフォームの追加および、米国施設との契約の遅れのために、予定よりも **genotyping** 解析が遅れているが、今年度中には解析が終わり、**CNSGCT** 関連遺伝子の絞り込みまで進められる見込みである。
8. 本研究と関連して、本研究代表者が同様に研究代表者として準備を進めている **CNSGCT** の日本小児現研究グループ(**JCCG**)全国多施設共同研究が、今年度中に開始される予定である。本研究に参加する施設にもあらためて **GWAS** 研究への参加を募り、新規患者から **validation** コホートへの参加者を募ることが可能となり、**GWAS** の結果を多くの症例で確認できることになる。

<引用文献>

- Ostrom Q, Cioffi G, Gittleman H, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. Neuro-Oncology, Volume 21, Issue Supplement_5, October 2019, Pages v1–v100**
- Committee of Brain Tumor Registry of Japan. Report of Brain Tumor Registry of Japan (2001-2004) 13th Edition. Neuro Med Chir (Tokyo) 54 Suppl: 1-102, 2014.**
- Rapley EA, Turnbull C, Al Olama AA, et al. A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. Nat Genet. 2009;41(7):807-810**
- Kanetsky PA, Mitra N, Vardhanabhuti S, et al. Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. Nat Genet. 2009;41(7):811-815**
- Turnbull C, Rapley EA, Seal S, et al. Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer. Nat Genet. 2010;42(7):604-607**
- Ruark E, Seal S, McDonald H, et al. Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near DAZL and PRDM14. Nat Genet. 2013;45(6):686-689**
- Wang L, Yamaguchi S, Burstein MD, Terashima K, et al. Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours. Nature. 2014;511(7508):241-245**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naito Y, Mishima S, Akagi K, Igarashi A, Ikeda M, Okano S, Kato S, Takano T, Tsuchihara K, Terashima K, Nishihara H, Nishiyama H, Hiyama E, Hirasawa A, Hosoi H, Maeda O, Yatabe Y, Okamoto W, Ono S, Kajiyama H, Nagashima F, Hatanaka Y, Miyachi M, Kodera Y, Yoshino T, Taniguchi H	4. 巻 25
2. 論文標題 Japan society of clinical oncology/Japanese society of medical oncology-led clinical recommendations on the diagnosis and use of tropomyosin receptor kinase inhibitors in adult and pediatric patients with neurotrophic receptor tyrosine kinase fusion-positive advanced solid tumors, cooperated by the Japanese society of pediatric hematology/oncology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 403 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-019-01610-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirai R, Osumi T, Terashima K, Kiyotani C, Uchiyama M, Tsujimoto S, Yoshida M, Yoshida K, Uchiyama T, Tomizawa D, Shiota Y, Sekiguchi M, Watanabe K, Keino D, Ueno-Yokohata H, Ohki K, Takita J, Ito S, Deguchi T, Kiyokawa N, Ogiwara H, Hishiki T, Ogawa S, Okita H, Matsumoto K, Yoshioka T, Kato M	4. 巻 Mar
2. 論文標題 High prevalence of SMARCB1 constitutional abnormalities including mosaicism in malignant rhabdoid tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41431-020-0614-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Guerreiro Stucklin A., Ryall S, Fukuoka K, Terashima K, Bartels U, Ramaswamy V, Bouffet E, Taylor M, Tabori U, Hawkins C, et al. (total 63 authors)	4. 巻 10
2. 論文標題 Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12187-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 寺島慶太
2. 発表標題 脳腫瘍の標準治療開発
3. 学会等名 平成30年度がん研究シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terashima K
2. 発表標題 CNS Germ Cell Tumors: Where do we come from? Where are we going?
3. 学会等名 Korean Society for Pediatric Neuro-Oncology Annual Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 一般社団法人日本癌治療学会、公益社団法人日本臨床腫瘍学会	4. 発行年 2019年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 92
3. 書名 成人・小児進行固形がんにおける臓器横断的ゲノム診療のガイドライン	

〔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
研究協力者	市村 幸一 (Itimura Koichi) (40231146)	国立研究開発法人国立がん研究センター・脳腫瘍連携研究分野・分野長 (82606)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ラウ チン (Lau Ching)	コネチカット大学医学部・小児血液腫瘍学・主任教授	
研究協力者	岡田 随象 (Okada Yukinori) (70727411)	大阪大学大学院医学系研究科・遺伝統計学・教授 (14401)	