

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03440

研究課題名(和文) 網羅的ゲノム解析と生殖細胞発生機構の理解に基づく中枢神経系胚細胞腫発生機序の解明

研究課題名(英文) A comprehensive genomic analysis of central nervous system germ cell tumors and generation of their cellular model

研究代表者

市村 幸一 (ICHIMURA, KOICHI)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：40231146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系胚細胞腫は本邦に多い小児脳腫瘍であるが、その病態と発生機序は不明である。本研究では、中枢神経系胚細胞腫の亜型であるジャーミノーマ15例に対して、次世代シーケンスによる全ゲノム解析を行った。その結果、すべての症例で多数の体細胞性変異が認められ、特にKITやMTORといった中枢神経系胚細胞腫の発生に関わることが示唆されている遺伝子については、全例において何らかの変異が見られた。さらにナノポアシーケンスを用いたロングリード解析では、レトロトランスポソンの活性化を示唆する所見が得られた。またiPS細胞に変異KITを導入して始原生殖細胞に誘導し、胚細胞腫のモデルの作成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児脳腫瘍は小児の病死の最大の原因の一つである。中枢神経系胚細胞腫は本邦において2番目に多い小児脳腫瘍であるが、その発生機序はいまだ不明である。中枢神経系胚細胞腫には多くの亜型があり、中には治療抵抗性で予後不良の腫瘍も多い。この発生機序を明らかにすることは、診断や治療の開発につながり、治療成績の向上に結び付くことが期待される。中枢神経系胚細胞腫は欧米で少ないため研究が進んでおらず、日本発の研究を世界に向けて発信する機会となる。また胚細胞腫は精巣を始め他の臓器にも発生するため、本研究の成果は小児脳腫瘍にとどまらずがん研究の発展に広く貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Central nervous system germ cell tumors (CNSGCT) are common pediatric brain tumors in Japan. However, their pathogenesis is unknown. We performed a whole genome sequencing for 15 germinomas, the most common subtype of CNSGCTs, and found a large number of somatic mutations. In particular, all germinoma had mutations in the genes involved in the MAPK/PI3K pathways, such as KIT or MTOR, confirming their significance in the pathogenesis of CNSGCTs. We also performed nanopore sequencing, a novel method to enable a long-range sequencing, in 2 germinomas and found an evidence of retrotransposon activation in one case. In order to generate a model for CNSGCT, we introduced a KIT mutation in a human iPS cell, and induced differentiation into primordial germ cell-like cells (PGCLC). The mutant KIT-harboring iPS cells maintained pluripotency and had constitutionally active KIT and AKT.

研究分野：神経腫瘍学

キーワード：中枢神経系胚細胞腫 全ゲノム解析 iPS細胞 ロングリード解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系胚細胞腫(CNSGCT)は本邦においては小児脳腫瘍の14%を占め、小児悪性脳腫瘍の中では2番目に頻度が高い。CNSGCTは欧米では頻度が低く手術も避けられる傾向にあるため、ゲノム解析が進んでいない。一方我が国ではCNSGCTの頻度が高く、症例の集積が進んでいる。CNSGCTはWHO脳腫瘍分類によりgerminoma, embryonal carcinoma, yolk sac tumor, choriocarcinoma, teratomaなどの亜型に分類されているが、約30%に複数の亜型が混在する混合型を認め、また時に異なる組織型で再発することもある。我々はCNSGCTの病態解明と新規治療の開発を目的に、頭蓋内胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアム(iGCT Consortium)を2012年に設立し、266症例におよぶ世界最大のCNSGCTコホートが集められた。先行研究では、これらの検体を用いてまず様々な亜型のCNSGCT 124例と精巣胚細胞腫(tGCT) 65例に対して全エクソシークエンスと標的シークエンスを行った。その結果、GCTは発生臓器・組織型に関わらずKITおよび下流のMAPK/PI3K経路の遺伝子変異が高頻度に認められることを発見した。一方約50%のCNSGCTはこれらの変異を持たず、その発生機序は依然不明である。従って、CNSGCTの発生機序解明のためには構造異常を含めた網羅的な全ゲノム解析が必要である。また61例のCNSGCTに対しゲノムワイドにDNAメチル化解析を行ったところ、germinomaにゲノム全体の広範な低メチル化を認めた。このメチル化プロファイルは遊走期の始原生殖細胞(PGC)のそれと極めて近似しており、germinomaがPGC由来である可能性を強く示唆した。さらに混合性胚細胞腫においてgerminomaとteratomaをmicrodissectionにより別々に抽出して調べたところ、両者とも同じMTOR変異(c.6725A>G)を認めたが、germinomaは低メチル化、teratomaは高メチル化を示した。以上の所見に基づきCNSGCTはPGCにMAPK/PI3K経路の変異が起こることにより発生し、その後メチル化の獲得の有無によりgerminomaに発達するか、分化が進みNGGCTへ発達するというモデルを提唱した。本仮説の検証には実験的にCNSGCTを再構築する必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、CNSGCTのドライバーイベントとなるゲノム異常の全ゲノム解析による網羅的な解明、およびCNSGCTがPGCに生じたゲノム異常を起因とし、エピゲノムの変化により様々な亜型に発達していくという仮説の検証である。

3. 研究の方法

脳腫瘍-血液ペアDNAが揃ったgerminoma 15サンプルに対し、筑波大学プレジジョン・メディシン研究開発センター全自動ロボットシステム「まほろ」を用いてLibrary作成を行い、NovaSeq 6000(Illumina)を用いてpaired-end read sequencingを行った。解析は、GATK Best Practice Workflowsに従い、trim galore、BWAmem、MarkDuplication、BaseRecallibratorを用いてFASTQファイルからBAM/SAM/CRAMファイルを作成し、Manta (version 4.1.9.0)、Delly (version 0.8.7)によりSomatic structural variant (SV) calling、Mutect2 (gatk version 4.1.9.0)、SnPEff (version 5.0c)、Mutect2 (gatk version 4.1.9.0)によりsomatic short variant callingを行った。

また、上記の症例のうち、余剰DNAが確保できた2サンプルに対し、共同研究機関である東京大学大学院新領域創生科学研究科生命科学観測分野鈴木研究室所有のPromethIONを用いてNanopore sequencingを行った。得られたFAST5/FASTQデータは、Minimap2 (version 2.17-r941)にてアライメントを行い、nanomonsvでトランスポゾンの転移によるSV callを行った。

hiPSCを用いたCNSGCTモデルの構築のため、CNSGCTで頻度の高いKIT D816V変異を生殖細胞特異的なBLIMP1-tdTomatoとTFAP2C-EGFPの2種の蛍光レポーターを導入したhiPSCにCRISPRを用いて導入したのち、始原生殖細胞様細胞(PGC like cells; PGCLCs)や内胚葉など、KITを発現する細胞種に分化させ、KITチロシン残基のリン酸化や、KIT下流のAKTやERKのリン酸化が、KITリガンドであるSCFの有無に関わらず見られることをウェスタンブロットにより確認した。

4. 研究成果

Somatic SVとして、一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism: SNPs) 114,178~1,283,875、挿入(insertion: INS) 24,943~141,988、欠失(deletion: DEL) 27,768~157,375が検出された(図1)。SVの

図 2. Type of somatic SV call

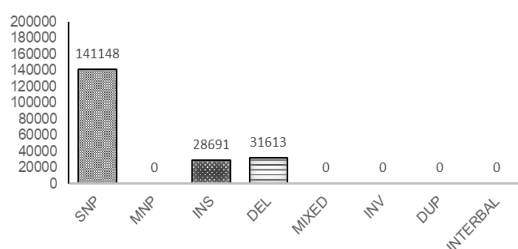
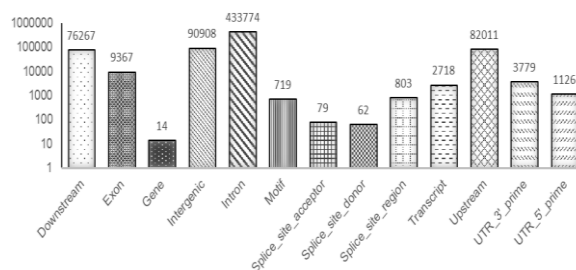


図 1. Region of somatic SV call



生じた region は、Intron 領域が最も多く 361,827~3,299,164 であり、ついで Intergenic 領域 78,404~752,025、Upstream 領域 66,677~517,679 であった。Exon 領域の Somatic SV は 8,311~67,216 であった (図 2)。Somatic short variant call の結果、Missense/Silent ratio (K_a/K_s ratio) 2.45 であり、腫瘍発生に variant が寄与しているものと推察された。Exome 領域の variant call は、先行して行われたエクソーム解析と一致する結果であった。さらに、KIT や MTOR など胚細胞腫瘍の発生において、特に重要と考えられている遺伝子は、intron 領域を含めると全てのサンプルにおいて

何らかの variant が見られることが明らかになった (図 3)。Intron 領域の variant が coding region にどのような影響を及ぼすかは追加解析が必要だが、全てのサンプルで腫瘍発生として重要な遺伝子領域に何らかの variant が見られたことは、興味深い結果であった。

また GCT157、GCT159 の 2 サンプルを用いて Nanopore sequencing を行った。Guppy (version 5.0.11)を用いた basecaller での検証の結果、convert rate 99.9~100%、N50 7491~8359、1d average qscore 14.7~15.4、depth 6~8 と、LINE-1 をはじめとするトランスポゾン転移を評価する上で十分なアセンブルが行われている

ことが確認された。Nanomonsv(version 0.4.0)を用いたレトロトランスポゾン転移による structural variant の検証を行った。GCT157 は 59、GCT159 は 87 の structural variant がコールされ (表 1)、それぞれ 1 つの LINE1 転移を検出した (表 2, 3)。しかし、特定の遺伝子に対する再現性のあるイベントは現時点では検出されていない。今後は、さらにサンプル数を重ね、再現性のあるイベントの検証、Illumina 解析データによる TraFicmem を用いたトランスポゾン転移による SV 解析の結果との比較を行い、トランスポゾン転移が gemrinoma 発生に関わる機序の解明を進める。また BTAG 細胞 (iPS 細胞) の endogeneous の KIT 遺伝子に CRISPR を用いて D816V をヘテロまたはホモに導入した株を樹立した。変異 KIT を持つ iPS 細胞は親株同様 POU5F1, NANOG, SOX2 の発現などを示し、多能性が保たれていることが示された (図 4)。また変異 KIT を持つ iPS 細胞は SCF リガンドなしに KIT と AKT の恒常的リン酸化が見られ、さらに PGCLC に誘導することができた。今後は免疫不全動物への変異 KIT を発現する PGCLC の移植に向けて準備を進める予定である。

図 3. Landscape of somatic variant call

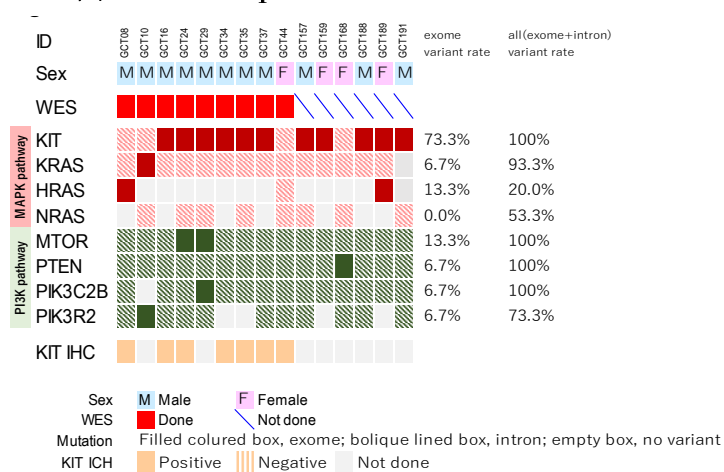


表 1. Number of SVs (nanomonsv)

	GCT157	GCT159
DEL	8	8
DUP	10	0
INS	36	62
INV	4	9
TRA	1	8
total	59	87

表 2. Number of insertion type(nanomonsv)

	GCT157	GCT159
Alu	4	5
LINE1	1	1
Orphan TD	0	1
SVA	3	2
Unclassified	27	38
total	34	47

図 4. iPS 細胞の多能性マーカーの発現. 表 3. Mobile elements insertion site (nanomonsv)

(qPCR)



Sample name	Chromosome	Position	Type	Gene
GCT157	14	94,379,744	LINE1	SERPINA1
GCT157	16	34,114,782	Alu	Intergenic
GCT157	19	22,343,659	Alu	Intergenic
GCT157	19	3,909,243	Alu	ATCAY
GCT159	6	29,796,164	Alu	LOC554223
GCT159	12	87,749,392	LINE1	Intergenic
GCT159	1	173,622,656	Alu	ANKRD45
GCT159	19	35,689,986	Alu	Intergenic
GCT159	4	75,861,870	Alu	PPEF2
GCT159	5	3,383,809	Alu	Intergenic
GCT159	X	1,088,161	Alu	Intergenic

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takami Hirokazu, Elzawahry Asmaa, Mamatjan Yasin, Fukushima Shintaro, Nishikawa Ryo, Matsutani Masao, Ichimura Koichi, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcriptome and methylome analysis of CNS germ cell tumor finds its cell-of-origin in embryogenesis and reveals shared similarities with testicular counterparts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuonc/noac021	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 該当する

1. 著者名 Satomi Kaishi, Takami Hirokazu, Fukushima Shintaro, Yamashita Satoshi, Matsutani Masao, Nishikawa Ryo, Ichimura Koichi, et al.	4. 巻 24
2. 論文標題 12p gain is predominantly observed in non-germinomatous germ cell tumors and identifies an unfavorable subgroup of central nervous system germ cell tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 834 ~ 846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuonc/noab246	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Sakura Kuzuoka, Yoji Kojima, Koichi Ichimura and Mitinori Saitou
2. 発表標題 Modeling germ cell tumors with KIT mutant hiPSCs
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Yamagishi, Hirokazu Takami, Daichi Narushima, Yuko Matsushita, Eiji Sugihara, Ryo Nishikawa, Mamoru Kato and Koichi Ichimura
2. 発表標題 Elucidation of the mechanisms of tumorigenesis in intracranial germ cell tumor by whole genome sequence
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakura Kuzuoka, Yoji Kojima, Koichi Ichimura and Mitinori Saitou
2. 発表標題 Modeling germ cell tumors with KIT mutant hiPSCs
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Yamagishi, Hirokazu Takami, Daichi Narushima, Yuko Matsushita, Eiji Sugihara, Ryo Nishikawa, Mamoru Kato and Koichi Ichimura
2. 発表標題 Elucidation of the mechanisms of tumorigenesis in intracranial germ cell tumor by whole genome sequence
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koichi Ichimura
2. 発表標題 Oncogenesis of CNS germ cell tumors
3. 学会等名 The 6th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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	加藤 護 (KATO MAMORU) (40391916)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・部門長 (82606)	

6. 研究組織（つづき）

	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	杉原 英志 (SUGIHARA EISHI) (50464996)	筑波大学・プレジジョン・メディシン開発研究センター・准教授 (12102)	
研究分担者	小島 洋児 (KOJIMA YOJI) (70720811)	京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教 (14301)	

	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	鈴木 穣 (SUZUKI YUTAKA)		

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		
カナダ	MacFeeters Hamilton Centre		