

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19591

研究課題名（和文）解析困難領域における変異解析法の開発と小児悪性脳腫瘍に対する新規遺伝子変異の探索

研究課題名（英文）Discovering novel genetic alterations in highly complicated genetic regions of pediatric brain tumors

研究代表者

鈴木 啓道（Suzuki, Hiromichi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：90751024

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、髄芽腫における新しい遺伝子異常が発見された。髄芽腫は4つのサブグループに分類されるが、これまでどのように腫瘍が発生するかわかっていなかったGroup 3およびGroup 4髄芽腫でcore-binding factor alpha (CBFA)複合体に異常が生じていることがわかった。また、これらの異常は菱脳唇という将来小脳の一部になる部位の発達段階の神経前駆細胞に生じることで、神経の分化が停止し髄芽腫になるということがあきらかとなった。また、がんのゲノム内の解析が難しい領域の一部を解析できる手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで発症原因が不明であったGroup 3とGroup 4髄芽腫において新しい遺伝子異常が発見され、なぜ腫瘍が発生するのかが明らかになったことから、今後新しい治療へと繋がる可能性がある。腫瘍化する起源となる細胞も同定されたため、腫瘍に特徴的な遺伝子をターゲットとする治療や予防的な治療への発展が期待できる。また、疾患モデルの構築にもつながるため、基礎研究の発展も促す研究成果である。

研究成果の概要（英文）：In this project, we have discovered new genetic abnormalities in medulloblastoma. Medulloblastomas are classified into four subgroups, but it was previously unclear how Group 3 and Group 4 medulloblastomas develop. We have revealed that neural progenitor cells at the developmental stage of the rhombic lip, which becomes part of the cerebellum in the future, acquire abnormalities in the core-binding factor alpha (CBFA) complex, leading to the cessation of neural differentiation and consequently the development of medulloblastoma. Furthermore, a method has been developed to analyze parts of the cancer genome that are difficult to analyze.

研究分野：神経腫瘍学

キーワード：髄芽腫 ゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児悪性脳腫瘍は小児がんにおいて最大の死亡原因であり新規の治療開発が望まれている疾患である。これまで様々な脳腫瘍に対して、次世代シーケンサーを使用した大規模ゲノム解析が行われてきたが、未だにドライバー変異が同定されず発症機序が不明な疾患も多い。Group 3/Group 4 髄芽腫(G3/4 髄芽腫)、後頭蓋窩上衣腫、脈絡叢腫瘍などの小児悪性脳腫瘍ではドライバー遺伝子異常が未だ同定されていない症例も多くその病態は不明であり、新規治療の開発に至っていない。

2. 研究の目的

本研究では現在最も普及しているショートリードシーケンスデータを用いて新規の遺伝子異常の発見を目指す。これまで解析が十分に行われていない繰り返し領域や相同性の高い領域を解析する手法を確立するなど、従来の方法では遺伝子異常の発見が難しい解析困難なゲノム領域も含めての解析を行う。同手法を用いて、小児悪性脳腫瘍の解析を行い、原因遺伝子変異を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

公開データも含めて以下のショートリードシーケンス由来のデータを収集し解析を行った。髄芽腫(全ゲノムシーケンス 743 例、RNA シーケンス 733 例)、後頭蓋窩上衣腫(全ゲノムシーケンス 24 例、全エクソームシーケンス 42 例)、脈絡叢腫瘍(全ゲノムシーケンス 37 例、全エクソームシーケンス 11 例)。

(1) RNA シーケンスからの変異解析手法の確立と変異の同定：希少疾患の多くは検体の収集が困難なことが多い。脳腫瘍も例外ではなく検体の入手が限られてしまう。また、悪性腫瘍における遺伝子異常解析は、通常腫瘍と正常組織のデータを比較することで腫瘍にのみ生じている遺伝子異常を同定する。腫瘍由来のデータのみを使用した解析では、個人間の多型が含まれてしまうため、悪性腫瘍の発生や進展に関与しているドライバー遺伝子異常を同定することが困難となる。また、RNA シーケンスでは RNA が DNA から転写される際に RNA editing などの修飾が入ることや、スプライシングバリエーションがあり配列に多様性があることなどからゲノム変異解析には適していない。

そこで我々は、腫瘍検体由来の RNA シーケンスデータのみという限られたデータからドライバー遺伝子異常を同定するための解析手法を開発し、遺伝子異常解析を行った。解析手法は broad institute が開発した、GATK を用いて標準設定を使用した変異解析を行い、その結果に追加解析を行うことで精度の高い結果が得られるように解析ワークフローを構築した。具体的には、以下の解析手法を組み込んだ。まず、スプライシングの違いによるエラー除去するため、新規のスプライシングを同定可能な intron-centric スプライシング解析を先に行い、個々の症例におけるスプライシングパターンを網羅的に解析した。個々の症例におけるスプライシングパターンに、スプライシングデータベースを合わせて複数のアイソフォームを用いたリファレンス配列を用意し、そのリファレンス配列に対して異なる mapping 手法を用いて local realignment を行い、解析においてスプライシングに伴うエラーを除去した。RNA-editing や非病的な遺伝子多型を除くため、様々なデータベースを併用し、効率的な除去を行った。シーケンスに伴うエラーに関しては正常細胞由来のデータからベイズ推定を用いた EBCall (Empirical Bayesian mutation Calling) を用いて行った。

(2) 全ゲノムシーケンス・エクソームシーケンスデータにおける解析困難領域の解析：解析が困難な領域における遺伝子異常を解析するため様々な解析手法の開発・応用を行った。繰り返し領域の解析のため、寛容なマッピング(Multiple mapping)を用いた解析困難領域の変異解析手法の開発を行った。STAR アライナーを用いてパラメータ調整を行うことで、適切なマッピング条件を設定し、Genomon2 および bcf tools を用いた変異解析手法を整えた。また、シーケンスリードをマッピングなしにショートタンDEMリピートを解析する TRhist、別のショートタンDEMリピート解析手法である ExpansionHunter、トランスポゾン解析可能な xTea を使用し解析を行った。近年、Telomere-to-Telomere(T2T)コンソーシアムによりギャップのないヒトリファレンスゲノムが解読され、さらに個人・人種間の多様性を考慮した pan-genome 解析が普及してきた。そこで、個人・人種間を含んだ pan-genome リファレンスを用いて解析困難領域である、U1 small nuclear RNA 領域の配列解析と変異同定手法を開発した。

4. 研究成果

(1) RNA シーケンスデータを用いた解析を行ったところ、髄芽腫において *CBFA2T2* と *CBFA2T3* 遺伝子に有意に異常が集積していることを発見した(図 1)。これらは髄芽腫の 4 つの分子サブタイプである Group 4 髄芽腫に有意に認められた。*CBFA2T2* と *CBFA2T3* の遺伝子異常は、既知の遺伝子異常である *PRDM6* と *KDM6A* の異常と相互排他的に生じており、このことから腫瘍の発生に重要な異常であることが示唆された。*CBFA2T2* および *CBFA2T3* の異常は他の悪性腫瘍におい

てはこれまで同定されていないため、細胞内での機能は十分に解明されていない。そのため、髄芽腫検体を用いて、細胞内で CBFA2T2 と相互作用しているタンパク質を TurboID により網羅的に解析した。その結果、CBFA2T2 は PRDM6 と KDM6A と相互作用していることが

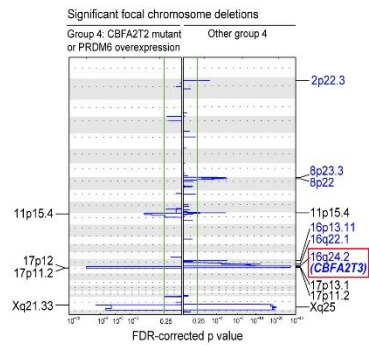
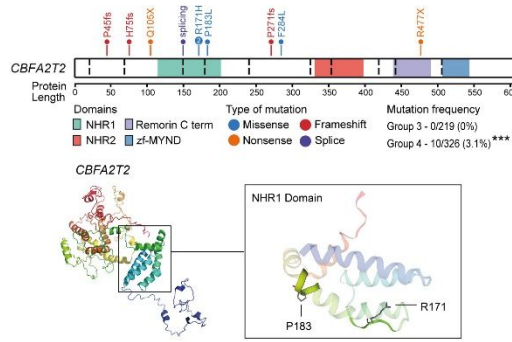


図 1: CBFA2T2 および CBFA2T3 の遺伝子異常

明らかとなった。子の結果から、CBFA2T2, CBFA2T3, PRDM6, KDM6A は細胞内で core-binding factor alpha (CBFA) 複合体を形成し相互作用することで機能を果たしていると考えられ、いずれかの遺伝子に異常が生じることで髄芽腫が発生していることが示唆された。さらに、CBFA2T2 と相互作用するタンパク質に対してパスウェイ解析を行ったところ、後脳の発達とエピゲノム制御に関与するパスウェイに有意集積されたため、CBFA 複合体が神経の分化・発達に関与していることが考えられた。そこで、発達段階の正常小脳を用いて、CBFA2T2 および CBFA2T3 が発現している部位を調べたところ、後脳の菱脳層における脳室下帯で強く発現していた。正常発達脳の一細胞シーケンスデータ

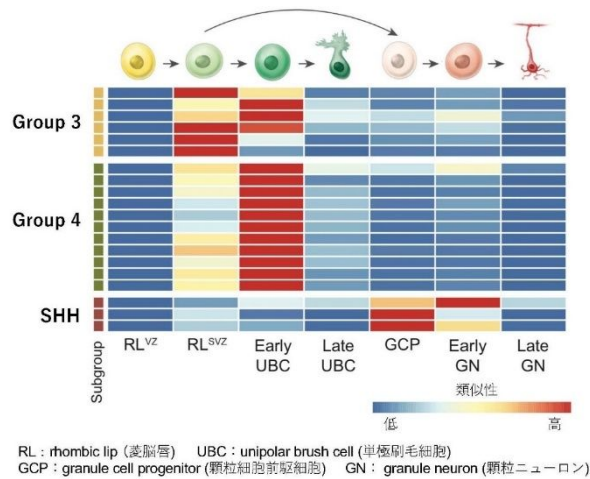


図 2: 髄芽腫と正常発達脳の遺伝子発現

と比較しても、Group 4 髄芽腫は菱脳層の脳室下帯の神経前駆細胞に非常に類似しており、この細胞が Group 4 髄芽腫の起源細胞であると考えられた(図 2)。これまでのマウスの発達脳を用いた解析では、Unipolar brush cell と類似しているとされていたが、ヒトの発達脳と比較することでそれよりも未分化な神経前駆細胞により類似している結果であった。一方、菱脳層脳室下帯の神経前駆細胞から分化した細胞の遺伝子発現とは異なる特徴を有していたため、より分化した細胞からは Group 4 髄芽腫は発生しないと考えられた。正常発達脳との比較では Group 3 髄芽腫はより未分化な神経前駆細胞、Group 4 髄芽腫はそれより分化した神経前駆細胞に類似していた。そこで、Group 3 髄芽腫の細胞株を用いてドライバー遺伝子である OTX2 をノックダウンすると、正常細胞を模倣するように分化し、その過程で CBFA2T2 と CBFA2T3 の遺伝子発現が一時的に上昇することがわかった。このことから、Group 4 髄芽腫は菱脳層の脳室下帯の神経前駆細胞が起源細胞と考えられ、CBFA 複合体に異常が生じることで細胞の分化が阻害され、本来出生時には消失しているべき細胞が遺残し、腫瘍化していることが明らかとなった(図 3)。

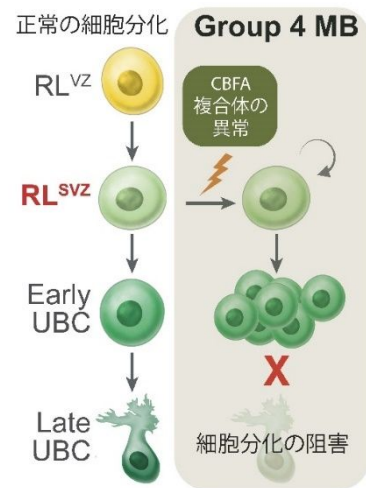


図 3: 髄芽腫発症モデル

(2) 開発および導入した手法を用いて解析困難領域を含めたゲノム解析を行った。解析の結果新規の遺伝子異常の同定には至らず、ショートタンデムリピートおよびトランスポゾンにおいても疾患特異的な異常は観察されなかった。一方、開発した手法を用いても、解析困難領域に存在する U1 small nuclear RNA (U1 snRNA) の遺伝子異常は有意に同定された。また、これまで U1 snRNA の変異が認められないとされていた 2 症例からも新たに変異が同定され、開発手法の有用性が証明された。U1 snRNA 変異の同定感度とその配列特性を理解するため、Pan-genome リファレンスを用いて解析を行った。U1 snRNA は segmental duplication と呼ばれる繰り返し配列上に存在している。Segmental duplication の領域はコピー数の多型が存在することが多い。また、これまでの変異解析から U1 snRNA 変異の変異リードの割合 (variant allele frequency) が症例

によって異なることが分かっており、コピー数多型の存在が示唆された。U1 snRNA 領域を pan-genome リファレンスを用いて多様性の表現が可能なグラフゲノムで再構成すると、U1 snRNA の 4 つは共通配列上に存在し、他の 4 つはノードで分岐していることから、個人間の多様性が高い領域と確認された(図 4 左)。このことからヒトの多

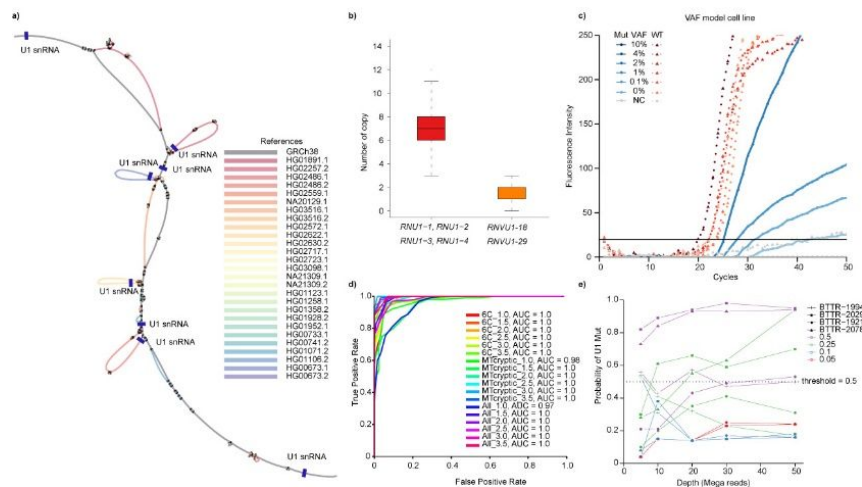


図 4 : U1 snRNA の多様性と診断法の開発

くではゲノム内の片側アレルに 4 から 8 個の U1 snRNA がコードされていると考えられた。また、ショートリードデータの coverage を用いた解析でも、個人間でのコピー数多型の存在が確認でき、同様に 1 アレルにつき 4 から 8 個の U1 snRNA が存在すると考えられた。一方、U1 snRNA のコピー数が髄芽腫の発生に寄与するか明らかにするため、U1 snRNA 変異型髄芽腫の症例とそれ以外の脳腫瘍症例における germline の U1 snRNA コピー数を比較したが、U1 snRNA 変異の有無とコピー数との関連は認められなかった。そのため、U1 snRNA のコピー数多型は髄芽腫発生のリスク因子とはならないと考えられた。U1 snRNA 領域の複雑性が明らかとなったため、変異同定手法の開発も行った。U1 snRNA 変異の検出法として、カスタムキャプチャーパネルを用いた targeted sequence、qPCR とアレル特異的 PCR を基盤とした Genesoc 迅速診断法、RNA シークエンスから異常プライミングパターンを基に random forest 法を用いた機械学習に基づく診断法の開発を行った。いずれの診断法も 100%の精度が認められた(図 4 右)。Genesoc を用いた診断では、正常 DNA との混合により感度の限界点を検索したところ、変異アレル頻度が 1%まで精度よく診断できることを明らかにした。RNA シークエンスデータに対しサブサンプリングを用いて必要な RNA-seq のデータ量と精度の検証も行った。30M リード数があれば髄芽腫における U1 snRNA 変異は RNA-seq から推定可能であると考えられた。これらの手法は今後、U1 snRNA 変異を対象とした臨床試験における診断法として活用が可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Funakoshi Yusuke, Sugihara Yuriko, Uneda Atsuhito, Nakashima Takuma, Suzuki Hiromichi | 4. 巻 114 |
| 2. 論文標題 Recent advances in the molecular understanding of medulloblastoma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 741 ~ 749 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15691 | 査読の有無 無 |
| 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 Hendrikse Liam D., ...Werbowski-Ogilvie Tamra E., Suzuki Hiromichi, Millen Kathleen J., Taylor Michael D. | 4. 巻 612 |
| 2. 論文標題 Author Correction: Failure of human rhombic lip differentiation underlies medulloblastoma formation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature | 6. 最初と最後の頁 E12 ~ E12 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-022-05578-0 | 査読の有無 無 |
| 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21件（うち招待講演 10件／うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 バイオインフォマティクスを用いて脳腫瘍に挑むBioinformatics: indispensable for the latest brain tumor research |
| 3. 学会等名 第42回日本脳神経外科コンgres（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 大規模シーケンスデータを用いた脳腫瘍のゲノム解析 |
| 3. 学会等名 Neuro-oncology Seminar 2022 in 広島（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 脳腫瘍に対するゲノム解析の最前線 |
| 3. 学会等名 第27回北海道脳腫瘍治療研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 脳腫瘍のゲノム解析 |
| 3. 学会等名 第4回学際的がん研究夏の学校別府 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 がんゲノム解析におけるバルクシーケンスとシングルセルシーケンスの融合髄芽腫における起源細胞の同定から腫瘍発生のメカニズムを探る |
| 3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2022（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takuma Nakashima, Yusuke Funakoshi, Shohei Nambu, Atsuhito Uneda, Kotoe Katayama, Ryosuke Hanaya, Seiya Imoto, Shota Tanaka, Ryuta Saito, Koji Yoshimoto, Yoshitaka Narita, Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 Dissecting the molecular complexity underlying glioblastoma by genomic and transcriptome profiling |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| | |
|---------|--|
| 1. 発表者名 | Yusuke Funakoshi, Takuma Nakashima, Shohei Nambu, Atsuhito Uneda, Kotoe Katayama, Seiya Imoto, Ryosuke Hanaya, Shota Tanaka, Ryuta Saito, Koji Yoshimoto, Yoshitaka Narita, Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 | Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling of Astrocytoma, IDH-mutant |
| 3. 学会等名 | 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 | 2022年 |

| | |
|---------|--|
| 1. 発表者名 | Yusuke Funakoshi, Takuma Nakashima, Shohei Nambu, Atsuhito Uneda, Kotoe Katayama, Seiya Imoto, Ryosuke Hanaya, Shota Tanaka, Ryuta Saito, Koji Yoshimoto, Yoshitaka Narita, Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 | Whole genome multi-omics landscape of Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted |
| 3. 学会等名 | 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 | 2022年 |

| | |
|---------|-------------------------|
| 1. 発表者名 | Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 | Nature掲載への道のり |
| 3. 学会等名 | 日本脳神経外科学会第81回学術総会（招待講演） |
| 4. 発表年 | 2022年 |

| | |
|---------|---------------------------|
| 1. 発表者名 | Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 | 脳腫瘍のバイオインフォマティクス |
| 3. 学会等名 | 第56回 慶應ニューロサイエンス研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 | 2022年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 髄芽腫における新規遺伝子変異と起源細胞の同定 |
| 3. 学会等名 ゲノムテクノロジー研究会第2回分科会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 脳腫瘍診断に対する遺伝子検査 |
| 3. 学会等名 第40回 日本染色体遺伝子検査学会総会・学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木 啓道, 中島 拓真, 舟越 勇介, 畝田 篤仁, 杉原 由利子, 南部 翔平, 金森 政之, 隈部 俊宏, 鈴木 智成, 木下 学, 園田 順彦, 荒川 芳輝, 永根 基雄, 田中 将太, 石田 穰治, 齋藤 竜太, 花谷 亮典, 吉本 幸司, 成田 善孝 |
| 2. 発表標題 全ゲノムシーケンスを用いた脳腫瘍の病態解明と患者還元 |
| 3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 啓道, Liam D. Hendrikse, 中島 拓真, 舟越 勇介, 隈部 俊宏, Michael D. Taylor |
| 2. 発表標題 CBFA複合体異常が細胞分化を阻害しGroup 4髄芽腫を引き起こす Failure of differentiation induced by genetic alterations in CBFA complex constitutes Group 4 medulloblastoma |
| 3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 舟越勇介、中島拓真、畝田篤仁、南部翔平、田中將太、石田穰治、齋藤竜太、花谷亮典、吉本幸司、成田善孝、鈴木啓道 |
| 2. 発表標題 全ゲノムシーケンスによるIDH変異型diffuse gliomaの変異・構造異常解析 |
| 3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中島拓真、舟越勇介、畝田篤仁、南部翔平、北原麻衣、柳澤俊介、大野誠、高橋雅道、宮北康二、成田善孝、鈴木啓道 |
| 2. 発表標題 脳腫瘍特化型カスタムパネルによる網羅的迅速分子診断法の確立 |
| 3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中島拓真、舟越勇介、畝田篤仁、南部翔平、田中將太、石田穰治、齋藤竜太、花谷亮典、吉本幸司、成田善孝、鈴木啓道 |
| 2. 発表標題 大規模全ゲノムシーケンスによるGlioblastoma, IDH-wild typeゲノム異常の統合解析 |
| 3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 舟越勇介、中島拓真、畝田篤仁、吉本幸司、成田善孝、鈴木啓道 |
| 2. 発表標題 全ゲノムシーケンスによる髄芽腫の包括的ゲノム解析から明らかになる染色体構造異常 |
| 3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki, Evan Wang, Chai-Jin Lee, Anders Eriksen, Jiao Zhang, Takuma Nakashima, Patryk Skowron, Raul Suarez, Craig Daniels, Michael D. Taylor |
| 2. 発表標題 Genetic analysis of recurrent medulloblastoma |
| 3. 学会等名 Medulloblastoma in the Mountain 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki |
| 2. 発表標題 脳腫瘍のゲノム解析 |
| 3. 学会等名 国際がん研究シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiromichi Suzuki, Takuma Nakashima, Yusuke Funakoshi, Atsuhito Uneda, Shota Tanaka, Joji Ishida, Ryuta Saito, Ryosuke Hanaya, Koji Yoshimoto, Yoshitaka Narita |
| 2. 発表標題 WHOLE-GENOME SEQUENCING ANALYSIS OF ADULT GLIOMAS |
| 3. 学会等名 23rd International Conference on Brain Tumor Research and Therapy (国際学会) |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

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 | The Hospital for Sick Children | | | |