

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861670

研究課題名(和文) ATRX/DRXX遺伝子変異による神経芽腫のテロメア伸長機序と臨床応用

研究課題名(英文) Telomere elongation mechanisms by ATRX/DRXX gene alterations and their clinical application

研究代表者

鬼武 美幸 (ONITAKE, Yoshiyuki)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：10448269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫組織及び細胞株のうち、テロメアが伸長しているALT (Alternative Length of Telomere)の活性化では、FISHにてテロメアシグナルはヘテロな構造であった。これらの腫瘍は、ATRXの変異16例、欠失6例、DAXX変異2例で全例に変異または欠失を認め、DAXX/ATRXタンパク発現が抑制されていた。DAXX/ATRX遺伝子変異・欠失を認める腫瘍は年長時の進行例が多く、MYCN増幅は1例を除いて認められなかったが、化学療法抵抗性で有意に予後不良であった。ALT活性化した神経芽腫は、頻度が少ないが予後不良な特異な群であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In neuroblastomas with elongated telomeres by ALT (alternative lengthening of telomere) mechanism, telomere signals by FISH were heterogeneous. In these 24 tumors, 16 had ATRX mutations, 6 had ATRX deletions, and the remaining 2 had DRXX mutations. Clinically, the children with such tumors were advanced stage ones without MYCN amplification except for one case. These tumors showed chemotherapeutic resistant and poor outcome significantly. Such ALT activated neuroblastoma is rare but a discriminate tumor group with poor prognosis.

研究分野：小児外科学

キーワード：神経芽腫 テロメア ATRX DRXX 伸長 変異 悪性度 予後

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は自然退縮するような予後良好な腫瘍がある一方、寛解しても高頻度に再発する予後不良の一群がある。申請者の教室では、従来から、細胞寿命を規定しているテロメアバイオロジーに注目し、テロメラーゼの活性化が腫瘍特性と大きく関わっていることを世界に先駆けて報告した。その後、本邦の大規模な神経芽腫スクリーニング事業で予後良好な腫瘍を数多く診療した結果として、これらのほとんどが有限寿命であり、予後不良腫瘍の早期例が判別できないこととともにスクリーニングの結果予後不良な腫瘍が減少したことを報告し、分化異常によって予後良好腫瘍(Favorable 腫瘍)が発生した後にその一部にこうした不死化が生じて、予後不良の腫瘍(Unfavorable 腫瘍)となる経路が見えてきた。しかし、予後不良腫瘍の不死化に必須であるテロメア維持機構としてテロメアを伸長するテロメラーゼが必ずしも全例に活性化していない。そこで、申請者は、ALT 機構に着目し、神経芽腫で検討した結果、テロメラーゼが活性化していない予後不良腫瘍ではテロメアが通常よりかなり延長し ALT 機構の存在が示唆され、これらが年長児に多く化学療法が抵抗性であることを示した。

ALT 機構の活性化については従来不明な点が多かったが、最近、膵内分泌腫瘍の検討から、高頻度に *ATRX*, *DAXX* 遺伝子の変異が報告され、これらは DNA 修復に関わっていることから、ALT 機構との関連が強く示唆されている。そこで、本研究では、すでに蓄積された神経芽腫腫瘍検体を用いて、*ATRX*, *DAXX* 遺伝子の変異を中心に検討し、既に検討されているテロメア長、テロメラーゼ活性などのテロメアバイオロジーとの関連とともに、神経芽腫の生物学的特性との関連を検討して、化学療法抵抗性で年長児に多い ALT 活性化腫瘍のサブグループを明らかにする。さらに、こうしたグループへの新たな悪性度診断法と治療法に結びつけることが期待されていた。

2. 研究の目的

神経芽腫は、予後が腫瘍の生物学的特性に大きく依存し、その一つとして細胞寿命に関連したテロメア維持機構が重要で、特に、テロメアを伸長するテロメラーゼの活性化が腫瘍特性と大きく関連している。申請者は、テロメラーゼ非依存的テロメア維持機構(ALT)の存在に注目し、神経芽腫の一部に ALT が活性化した症例があり、化学療法抵抗性であることを報告した。最近、ALT 活性化腫瘍では、高頻度に *ATRX*, *DAXX* 遺伝子の変異が報告された。そこで、本研究では神経芽腫でのこれらの遺伝子変異を検討し、テロメア長、ALT の関連、さらに生物学的特性との関連を検証して、ALT 腫瘍に対する分子標的を見出し、新たな治療戦略の基礎データとすることを目的とした。

3. 研究の方法

予後が判明し、約 900 の神経芽腫の凍結組織と正常体細胞のペアと約 30 の神経芽腫細胞株を有しており、テロメアが正常範囲以上 (>15kb) に伸長している 24 検体を中心に以下の検討を行った。

1) テロメア伸長例の検討

テロメア配列オリゴプローブを用いたサンプリング法による二本鎖テロメア長の測定に加え、テロメア相補鎖配列オリゴプローブを用いた液相ハイブリによる一本鎖突出長測定を行い、テロメアの伸長形態を検索した。さらに、FISH 法にてテロメアシグナルを検索し、さらに、PML body のシグナルとの局在を検証した。

2) *DAXX/ATRX* 遺伝子検索

上記のテロメアが伸長した腫瘍に加えて、テロメア長が短縮、正常の腫瘍を用いて、これらの遺伝子の変異を以下の方法で検索した。*ATRX* 遺伝子は 35 のエクソンをもち 0.2M を超える巨大な遺伝子であることから、*DAXX* 遺伝子とともに、これらの遺伝子と関連する遺伝子のシーケンス配列に対するライブラリーを作成し、現有の機器 (Illumina Miseq または IonPGM シーケンサー) を用いて、遺伝子変異あるいは欠失を検索した。

これらの 2 遺伝子に対して見出された変異や欠失は、従来のサンガー法にて確認するとともに、多型を分類し、多型についてもその関与を検索した。しかし、欠失についての検索があきらかでなかった。*ATRX* 遺伝子は、35 エクソンを有する巨大な遺伝子であることから、MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification)法にて、検索した。さらに、*DAXX/ATRX* 遺伝子発現の検討について、この 2 遺伝子産物に対する抗体を用いて、上記のテロメアが伸長した腫瘍とそれ以外の腫瘍を染色し、発現レベルと遺伝子変異・欠失さらにテロメア長との関連を検索した。

上記の結果と臨床病理因子との関連を検討した。従来の検討で、テロメアが伸長した腫瘍は年長児の進行例に多く、さらに化学療法抵抗性で予後不良であることを示してきたが、*DAXX/ATRX* 遺伝子変化やこれらの関連遺伝子の異常の有無、さらに、*DAXX/ATRX* 発現の有無と臨床病理学的因子との関連を検討した。また、*DAXX/ATRX* 変異や発現低下と臨床的因子である年齢、病期分類さらに予後との関連についても検討した。

4. 研究成果

予後が判明している 800 余りの神経芽腫凍結検体と正常体細胞のペアと 26 の神経芽腫細胞株のうち、テロメアが正常範囲以上 (>15kb) に伸長して ALT (Alternative

Length of Telomere)の活性化した 24 検体を中心に以下の検討を行った。

テロメア相補鎖配列オリゴプローブを用いた液相ハイブリによる一本鎖突出長測定を行ったが、テロメア長が伸長してない症例に比べ明らかに伸長はなかった。また、FISHにてテロメアシグナルはヘテロな構造で一部は巨大化し、PML body のシグナルと一部がマージした。これらの腫瘍の *DAXX/ATRX* 遺伝子の変異を次世代シーケンサーで、欠失を Multiplex ligation probe amplification (MLPA)法にて検索したところ、*ATRX* の変異 16 例、欠失 6 例、*DAXX* 変異 2 例で全例に変異または欠失を認めた。*DAXX/ATRX* 遺伝子の変異・欠失のスクリーニング法として、*DAXX/ATRX* タンパクに対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、テロメアが伸長した腫瘍とそれ以外の腫瘍の発現レベルと遺伝子変異・欠失、テロメア長との関連を検索すると、それぞれの変異あるいは欠失を認めた腫瘍では発現が抑制されていた。臨床病理因子との関連を検討すると、*DAXX/ATRX* 遺伝子変異・欠失を認める腫瘍は年長時の進行例が多く、*MYCN* 増幅は 1 例を除いて認められなかったが、化学療法抵抗性で有意に予後不良であった。これらから、ALT やこれらの関連遺伝子の異常の有無、さらに、*DAXX/ATRX* 発現の有無と臨床病理学的因子との関連を検討した。*DAXX/ATRX* 変異や発現低下による ALT 活性化した神経芽腫は、頻度が少ないが神経芽腫の中で特異な群であることが示され、細胞分裂はさほど高くないが、悪性度は高い腫瘍と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Kurihara S, Hiyama E, Onitake Y, Yamaoka E, Hiyama K, Clinical features of *ATRX* or *DAXX* mutated neuroblastoma, *Journal of Pediatric Surgery*, 49, 査読有, 2014, pp1835-1838, 10.1016/j.jpedsurg.2014.09.029.
2. Kojima M, Hiyama E, Fukuba I, Yamaoka E, Ueda Y, Onitake Y, Kurihara S, Sueda T, Detection of *MYCN* amplification using blood plasma: noninvasive therapy evaluation and prediction of prognosis in neuroblastoma, *Pediatric Surgery International*, 29, 査読有, 2013, pp1139-1145, 10.1007/s00383-013-3374-9.
3. Hiyama E, Ueda Y, Onitake Y, Kurihara S, Watanabe K, Hishiki T, Tajiri T, Ida K, Yano M, Kondo S, Oue T; Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor, A cisplatin plus pirarubicin-based JPLT2

chemotherapy for hepatoblastoma: experience and future of the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT), *Pediatric Surgery International*, 29, 査読有, 2013, pp1071-1075, 10.1007/s00383-013-3399-0.

4. 鬼武美幸, 檜山英三, 小倉 薫, 上田祐華, 外傷性脾損傷後に発症した鼠径ヘルニアの 1 例, *小児外科*, 45, 査読有, 2013, pp1260-1262.

[学会発表](計 15 件)

1. Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Ueda Y, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kobayashi MK, Surgical managements for refractory neuroblastoma in young children, BAPS61st Annual Congress, 22-25 Jul 2014, Edinburgh Scotland.

2. Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Yamaoka E, Fukuba I, Hiyama K, Clinical feature of *ATRX* or *DAXX* mutated neuroblastoma, PAPS2014, 25-29 May 2014, Calgary Canada.

3. Kurihara S, Hiyama E, Onitake Y, Miki M, Nakamura K, Kawaguchi H, Kobayashi M, Central venous catheter-related complications in children with malignancy, PAPS2014, 25-29 May 2014, Calgary Canada.

4. 小倉 薫, 檜山英三, 鬼武美幸, 上田祐華, 千々松郁枝, 世羅康彦, 小林正夫, Wilms 腫瘍を合併した縦隔奇形腫の 1 例, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月 29~12 月 1 日, 福岡市.

5. 斎藤聡志, 松本惇子, 坂田園子, 千々松郁枝, 三木瑞香, 世羅康彦, 川口浩史, 中村和洋, 上田祐華, 鬼武美幸, 小倉 薫, 檜山英三, 小林正夫, 腹腔内 Desmoplastic small round cell tumor の 1 小児例, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月 29~12 月 1 日, 福岡市.

6. 江藤昌平, 古江 綾, 千々松郁枝, 三木 瑞香, 世羅康彦, 川口浩史, 中村和洋, 上田祐華, 鬼武美幸, 小倉 薫, 檜山英三, 小林正夫, 高用量シスプラチン療法後に腫瘍全摘を行った門脈浸潤を伴う肝芽腫の 1 例, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月 29~12 月 1 日, 福岡市.

7. 鬼武美幸, 檜山英三, 小倉 薫, 上田祐華, 外傷性脾損傷後に発症した鼠径ヘルニアの 1 例, 第 29 回日本小児外科学会秋季シンポジウム, 2013 年 10 月 26 日, 東京都.

8. 栗原 将, 鬼武美幸, 小倉 薫, 上田祐華, 檜山英三, 世羅康彦, 三木瑞香, 中村

和洋, 小林正夫, 肺転移巣手術のタイミングに苦慮した高リスク肝芽腫の一例, 第2回せとうち小児がんセミナー, 2013年10月5日, 岡山市.

9. Hiyama E, Ueda Y, Onitake Y, Ida K, Ogura K, Kondo S, Kamijyo T, Watanabe K, Oue T, Hishiki T, Tajiri T, Horie H, Inoue T, Tanaka Y, FURTHER STUDY: IDENTIFICATION OF NEW CANDIDATE GENES IN PROGRESSION OF HEPATOBLASTOMA USING GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY, 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology, 25-28 Sep 2013, Hong Kong China.

10. Hiyama E, Kamimatsuse A, Onitake Y, Ueda Y, Watanabe K, Hishiki T, Tajiri T, Ida K, Yano M, Kondo S, Oue T, Survival, surgical respectability, and late effects in the hepatoblastoma patients treated by cisplatin plus pirarubicin(CITA) chemotherapy, ASCO Annual '13 Meeting, 31 May-4 Jun 2013, Chicago U.S.A.

11. 小倉 薫, 檜山英三, 上松瀬新, 鬼武美幸, 上田祐華, 術後に心不全の改善を認めた静脈管開存症の1例, 第50回日本小児外科学会学術集会, 2013年5月30~6月1日, 東京都.

12. 鬼武美幸, 檜山英三, 小倉 薫, 上松瀬新, 中村和洋, 古江 綾, 18トリソミーに合併した肝芽腫の1例 染色体異常を合併したJPLT登録症例の検討を併せて, 第50回日本小児外科学会学術集会, 2013年5月30~6月1日, 東京都.

13. 檜山英三, 児島正人, 河島茉澄, 上田祐華, 鬼武美幸, 上松瀬新, 小倉 薫, 末田泰二郎, 血中 DNA を用いた神経芽腫の分子診断: 予後予測と治療効果判定, 第50回日本小児外科学会学術集会, 2013年5月30~6月1日, 東京都.

14. 小倉 薫, 檜山英三, 鬼武美幸, 上田祐華, 谷 守通, 2度の再発を来した脂肪芽腫の1例, 第54回中国四国小児がん研究会, 2013年5月11日, 山口県岩国市.

15. Hiyama E, Ueda Y, Kamimatsuse A, Onitake Y, Ogura K, Hiyama K, Wnt Signaling and telomerase activation in hepatoblastoma, AACR Annual Meeting 2013, 6-10 Apr 2013, Washington U.S.A.

6. 研究組織

(1)研究代表者

鬼武 美幸(ONITAKE YOSHIYUKI)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号: 10448269