

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462721

研究課題名(和文) 網羅的ゲノム・エピゲノム解析による神経芽腫再発・治療抵抗性獲得のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Unveiling the mechanism of recurrence and chemoresistance in neuroblastoma using genomewide and epigenomewide analysis

研究代表者

菱木 知郎 (Hishiki, Tomoro)

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・医長

研究者番号：00375776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高リスク神経芽腫の5年生存率は40%前後と不良である。初発時転移のある神経芽腫の7割は初回治療に反応し、一旦Complete remissionとなるが、その後やく半数が再発する。一旦再発した腫瘍は治療抵抗性を獲得することが多く、不幸な転帰をたどる。我々は初発時の腫瘍と再発時の腫瘍に明らかな治療反応性の差異があることに着目し、網羅的遺伝子解析により治療抵抗性獲得のメカニズムの解明を試みた。初発・再発の腫瘍がセットで存在する高リスク神経芽腫について、各々の腫瘍組織の全エクソーム解析をおこない、すでに報告のあるRas-MAPK経路以外の分子にあらたな体細胞遺伝子変異が生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of patients with high-risk neuroblastoma is extremely poor with a 5-year survival of 40%. Approximately 70% respond to chemotherapy but half of these patients experience recurrence. Once the tumor relapses, it gains chemoresistance and the outcome of relapsed patients is dismal. We hypothesized that tumors at diagnosis and recurrent tumors have different biological features based on different genomic and epigenetic rearrangements. We thus conducted a whole exome sequence for the tumors at diagnosis and tumors at recurrence in the identical patient. In one case, we found a novel somatic mutation in the recurrent tumor in a molecule that is not involved in the Ras-MAP kinase cascade, in which molecules has previously shown to be frequently mutated in recurrent tumors. This finding suggests that a somatic mutation in a molecule distinct from the Ras-MAPK cascade could also trigger relapse and chemoresistance in neuroblastoma.

研究分野：小児外科学

キーワード：神経芽腫 再発 網羅的ゲノム解析 全エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

【研究の背景】

神経芽腫は脳腫瘍について多い小児悪性固形腫瘍であり、年間におよそ 200 例前後の発生があるとされる。乳児期に神経芽腫を発症した患児の予後は一般に良好であり、なかには無治療で分化成熟・自然退縮がみられるものもある。一方、1 歳以上で発症した神経芽腫の多くは初発時すでに遠隔転移を来しており、造血幹細胞移植併用大量化学療法を含む集学的治療の進歩にも関わらず今なおその予後は著しく不良である。本来神経芽腫は化学療法に対する感受性が高く、進行神経芽腫の 7 割で一旦腫瘍がほぼ消失し完全寛解となるが、その後約半数の症例が再発を来し不幸な転帰をたどる。再発腫瘍の治療反応性は著しく不良であり、種々のセカンドライン治療がなんらかの効果を示す確率は半分に満たない。

再発・難治性腫瘍の多くは化学療法・放射線療法への治療抵抗性を獲得している。それだけでなく、従来の治療法により強い骨髄抑制のほか腎機能障害、肝障害、心筋障害など様々な副作用が引き起こされ、副作用により治療継続が困難となるケースも少なくない。

そこで我々は再発・難治性神経芽腫に対する新規治療の開発をめざし、神経芽腫が再発に至る分子レベルのメカニズムの解明に取り組む必要があると考えた。がん細胞の内で起きている遺伝子レベル・分子レベルの異常を網羅的に探索し、異常をあぶり出すことにより効率よくその異常を標的とした新規治療法を開発する方法が有効であり、これまでも精力的に神経芽腫のがん化・増悪のプロセスに関わる遺伝子異常の探求が行われて来た。しかし膨大なゲノム情報の中から網羅的に遺伝子異常を拾い出す作業は容易ではなく、時間と労力を費やすものであった。数年来の次世代シーケンサーの革命的な進化によりゲノムに関する膨大な情報基盤の整備が飛躍的に進み、かつてはほぼ不可能であったゲノムの網羅的解析が実現可能となって来た。さらにはゲノムの変異ばかりでなく、エピゲノム解析、ゲノムのコピー数解析、RNA-seq 解析などが従来よりもはるかに短時間で解析可能となった。がん細胞の体細胞変異乃網羅的に解析は、細胞のがん化のプロセスに決定的な変化をもたらす点突然変異を全ゲノムレベルでの探索を可能とした。また遺伝子のプロモーター領域の修飾クロマチンを探索し、がん化のプロセスで発現制御がなされる分子を解明することも可能である。このような網羅的解析はがん細胞の発生と維持にきわめて重要な標的遺伝子を同定し、これらを手がかりにして新規分指標的療法の基盤を築くことを可能とする。神経芽腫の研究においてもこの数年で次世代シーケンサーの技術を用いたゲノム・エピゲノム解析が内外の研究機関で行われており、その成果に関する報告が散見されるようになって

ている。

2. 研究の目的

本研究は、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により神経芽腫が再発に至るメカニズムを解明することを目的とする。これまで再発神経芽腫に的を絞った網羅的解析の報告はなく、本研究において得られる知見は神経芽腫増悪のメカニズムを知る上できわめて重要であると考えられる。初発時および再発時の検体がセットで存在する神経芽腫症例につき、2 点間のゲノム・エピゲノムレベルの変化を解析することによりクローン進化の機序を明白にし、神経芽腫が再発に至るプロセスで鍵となる分子の同定を目指す。

3. 研究の方法

解析の対象となる症例の選択：倫理審査承認の取得および検体の収集：各機関において過去に得られた検体の余剰サンプル使用につき倫理審査委員会の承認を得、初発・再発双方の検体がペアで存在する症例につき、DNA の抽出を行う。

アレイ CGH (従来施行されてきた網羅的ゲノム解析法) により MYCN 増幅、1p, 11q, 17q 等のゲノム増減の解析を行う。

全エクソームシーケンサー解析条件検討
次世代シーケンサーを用いた神経芽腫細胞株の全エクソーム解析にて条件検討を行う。
細胞株から抽出した DNA を Covaris 社 DNA Shearing システムで 200bp 程度に断片化し、これを AMPure XP ビーズ精製した。クオリティチェックには電気泳動システム Agilent 4200 TapeStation を用いた。Agilent 社 SureSelect ターゲットエンリッチシステム、Human All Exon V5+UTRs を用いて全エクソーム領域のライブラリー調製を行う。

臨床検体における全エクソーム解析

4. 研究成果

対象症例の選択

神経芽腫の再発は稀ではないものの、再発時は通常腫瘍マーカーの上昇と MIBG シンチの集積により診断可能な場合が多いこと、さらに再発部位は圧倒的に骨髄が多く、組織採取の可能な部位の再発が非常に少ないことから、今回解析の対象となりうる初発時および再発時のセット検体がそろった症例は少なく、二つの共同研究施設で 25 年前の症例までさかのぼって候補症例を探索したところ、候補として抽出されたのは 6 症例のみであった。いずれも stage 4 で、4 例はすでに腫瘍死、2 例は再発生存中であった。

アレイ CGH による網羅的ゲノム解析

上記のうち MYCN 増幅は 5 例にみとめた。Genomic signature (アレイ CGH 解析; Tomioka ら、Oncogene 2008) を 4 例に対しておこなった。1p LOH は 3 例、11q LOH は 2 例、17q partial gain は 2 例に認められた。いずれも 5 年生存率 30% 以下と非常に予後の不良なグループに属する腫瘍であることがわかった。

全エクソーム解析の条件検討 (神経芽腫細胞株)

シーケンサーには Illumina 社 MiSeq を使用し、Reagent Kit v2, 7.5Gb を試薬として用いることで平均 100 reads 程度の depth を得ることができた。得られたシーケンスデータは CLC Genomics workbench を用いて参照配列 (hg19) にマッピングし、変異解析を行った。Non-synonymous 変異、細胞株であることから変異頻度が 30%以上、多型頻度が 1%未満、蛋白質の機能に影響すると予想される (PROVEAN, Polyphen, Shift による解析) 変異や、これまでに腫瘍において報告されている変異を候補遺伝子とした。以上、全エクソーム解析に十分な解析結果を得ることができた。

対象症例のうち年代の古いものはホルマリン固定病理組織検体 (FFPE) のみ利用可能であったため、FFPE 検体からの核酸抽出を試みたが、保存状態不良のため全エクソーム解析に耐えうる質の核酸抽出は不可能であった。

凍結検体を用いた初発時・再発時サンプルの全エクソーム解析

初発凍結検体、再発凍結検体およびコントロールとして末梢血 DNA がそろった 2 症例に対して、上記で検討した条件にてそれぞれエクソームシーケンスを実施した

1 症例は MYCN 増幅腫瘍であり、残りの 1 症例は MYCN 非増幅腫瘍であった。このうち MYCN 非増幅腫瘍において CLC Genomic workbench を用いて参照配列 (hg19) にマッピングし体細胞変異解析を行った。初発検体では 26 遺伝子で再発検体では 77 遺伝子でアミノ酸置換をともなう体細胞遺伝子変異を見出し、17 遺伝子が初発再発両腫瘍で共通していた。このうち初発の 14 遺伝子および再発の 21 遺伝子は以前に腫瘍で変異が報告されている遺伝子であった。これまでの報告から再発を呈する神経芽腫において RAS-MAPK シグナルを活性化すると予測される遺伝子異常 (ALK・NF1・PTPN11・FGFR1・NRAS・KRAS・HRAS・BRAF) が見出されているが、本症例ではこれらの遺伝子には変異を生じていなかった。したがって、この症例は RAS-MAPK シグナルの活性化とは異なるメカニズムによって治療抵抗性を獲得し再発に至ったと考えられた。

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)

- 1 Hishiki T, Horie H, Higashimoto Y, Yotsumoto K, Komatsu S, Okimoto Y, Kakuda H, Taneyama Y, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Ochiai H, Hino M, Ando K, Yoshida H, Iwai J. (2014) Histological features of primary tumors after induction or high-dose chemotherapy in high-risk neuroblastoma. *Pediatr Surg Int.* 30, 919-926.
- 2 Shiohama T, Ochiai H, Hishiki T,

Yoshida H, Kohno Y. Coexistence of neuroblastoma detected on staging of Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Int.* 2014 Aug;56(4):608-10. doi: 10.1111/ped.12292.

- 3 Sun Y, Furihata T, Ishii S, Nagai M, Harada M, Shimozato O, Kamijo T, Motohashi S, Yoshino I, Kamiichi A, Kobayashi K, Chiba K. Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers. *Clin Transl Med.* 2014 Nov 18;3:37. doi: 10.1186/s40169-014-0037-y. eCollection 2014.
- 4 Shimozato O, Waraya M, Nakashima K, Souda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, Nakagawara A, Ozaki T, Kamijo T (corresponding author). Receptor-type protein tyrosine phosphatase κ (PTPRK) directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene.* 2015 Apr 9;34(15):1949-60. doi: 10.1038/onc.2014.141. Epub 2014 Jun 2.
- 5 Nakazawa A, Haga C, Ohira M, Okita H, Kamijo T, Nakagawara A. Correlation between the International Neuroblastoma Pathology Classification and genomic signature in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 2015 Jun;106(6):766-71. doi: 10.1111/cas.12665. Epub 2015 Apr 22
- 6 Takenouchi A, Saito K, Saito E, Saito T, Hishiki T, Matsunaga T, Isegawa N, Yoshida H, Ohnuma N, Shirasawa H. (2015) Oncolytic viral therapy for neuroblastoma cells with Sindbis virus AR339 strain. *Pediatr Surg Int.* 31:1151-1199.
- 7 Hishiki T, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Hayashi H, Yoshida H. Radioguided localization of neuroblastomas in laparoscopic surgery using ^{123}I -radiolabeled metaiodobenzyl-guanidine. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62:1297-9.
- 8 Mise N, Takami M, Suzuki A, Kamata T, Harada K, Hishiki T, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Ikeuchi T, Nakayama T, Yoshida H, Motohashi S. (2016) Antibody-dependent cellular cytotoxicity toward neuroblastoma enhanced by activated invariant natural killer T cells. *Cancer Sci.* 107:233-241.
- 9 Shiohama T, Fujii K, Hino M, Shimizu K, Ohashi H, Kambe M,

Nakatani Y, Mitsunaga T, Yoshida H, Ochiai H, Shimojo N. Coexistence of neuroblastoma and ganglioneuroma in a girl with a hemizygous deletion of chromosome 11q14.1-23.3. Am J Med Genet A. 2016 Feb;170A(2):492-7. doi: 10.1002/ajmg.a.37430.

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

1. Hishiki T, Yoneda A, Kuroda T, Tokiwa K, Ise K, Ono S, Kinoshita Y, Uehara S, Matsumoto K, Kumagai M, Shichino H, Soejima T, Takimoto T, Hara J, Tajiri T, Nakagawara A. Primary tumor resection after high dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation is a safe and feasible option. A report from the Japanese neuroblastoma study group (JNBSG). Advances in Neuroblastoma Research 2016. June 19-23, 2016. Cairns, Australia.
2. Hishiki T, Higashimoto Y, Yotsumoto K, Komatsu S, Okimoto Y, Kakuda H, Taneyama Y, Furudate K, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Ochiai H, Hino M, Ando K, Yoshida H, Iwai J. Clinical and biological features of poor responders to initial treatment defined by semi-quantitative MIBG scoring in metastatic neuroblastomas. 47th Congress of the International Society of Paediatric Oncology. Oct 11, 2015 Cape town, Republic of South Africa.
3. Hishiki T, Horie H, Higashimoto Y, Yotsumoto K, Komatsu S, Okimoto Y, Kakuda H, Taneyama Y, Yoshida H, Iwai J. Tumor histology following induction chemotherapy and / or high-dose chemotherapy and its impact on the outcome of patients with high-risk neuroblastoma. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology. October 22-25, 2014, Toronto, Canada.
4. Hishiki T, Kuroda T, Tajiri T, Yoneda A, Tokiwa Ki, Muraji T, Sugito K, Ise K, Kinoshita Y, Uehara S, Matsumoto K, Kumagai M, Soejima T, Takimoto T, Takahashi H, Kamijo T, Hara J, Ikeda H, Nakagawara A. Japan Neuroblastoma Study Group. Surgical treatment in patients enrolled in the nationwide phase ii study nb-hr07 for advanced neuroblastoma- a report from Japan Neuroblastoma Study Group (JNBSG). Advances in Neuroblastoma Research

2014. May, 2014, Colgne, Germany.

5.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

菱木 知郎 (HISHIKI Tomoro)
国立成育医療研究センター・小児がんセンタ
ー・医長

研究者番号 : 00375776

(2) 研究分担者

上條 岳彦 (KAMIJO Takehiko)
埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・所
長

研究者番号 : 90262708

(3) 研究分担者

吉田 英生 (YOSHIDA Hideo)
千葉大学大学院・医学研究院・教授

研究者番号 : 60210712