

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390269

研究課題名(和文)小児固形腫瘍の発がん機構とがん幹細胞の体系的解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Systematic analyses of pathogenesis and cancer stem cell of pediatric solid tumors and development of novel therapeutic strategies

研究代表者

滝田 順子 (Takita, Junko)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00359621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーによるハイスループット解析を行い、小児固形腫瘍の発症およびがん幹細胞を制御する標的分子の同定を試みた。神経芽腫の臨床検体96検体につき、がん幹細胞の制御に重要なポリコム群遺伝子80個のdeep sequencingを行った結果、ASH1Lの変異が約10%に見出され、この分子が腫瘍の発症およびがん幹細胞を制御する遺伝子である可能性が示唆された。また横紋筋肉腫16例におけるエクソーム解析では、FGFR4経路変異が約30%の症例に検出され、特に胎児型横紋筋肉腫に多い傾向が見られた。従って、FGFR4経路阻害剤が胎児型横紋筋肉腫の治療的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pediatric solid tumors are one of the significant causes of death among children, and thus, development for new therapeutic strategy for intractable pediatric solid tumors is a global problem. To identify molecular targets of pediatric solid tumors and regulators of cancer stem cells, we performed target sequencing and exome sequencing using next generation sequencing technology. Target sequencing of 80 polycomb protein genes in 96 of neuroblastomas revealed that ASH1L mutations occurred in about 10% of cases. Thus, this gene is one of the candidate target for cancer stem cells regulators of neuroblastoma. In exome analysis of 16 cases of rhabdomyosarcoma (RMS), we identified FGFR4 pathway mutations in about 30% of all cases, and this pathway mutation was more frequently detected in embryonal subtype. Therefore, the inhibitor of FGFR4 pathway could be one of the promising therapeutic molecule for embryonal RMS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児固形腫瘍 Pediatric solid tumors 横紋筋肉腫 次世代シーケンサー 神経芽腫

1. 研究当初の背景

(1)小児がんは成人がんと比較すると稀ではあるものの、小児死亡の主要因となっている。小児がんの約半数を占める小児固形腫瘍の大部分は依然として予後不良である。従って、難治性小児固形腫瘍の克服こそ、少子・高齢化が進行している我が国において社会行政の観点からも早急に取り組むべき重要課題の一つと言える。

一方、近年がんの難治化や再発の原因として、多分化能、自己複製能、高い増殖能を兼ね備えたがん幹細胞(Cancer stem cell: CSC)の存在が明らかとなった。CSCの特徴は、薬剤や放射線に対する感受性が著しく低いことであり、これが難治化や再発の要因と考えられている。従って、特異的にCSCを標的とする治療法は、難治性がんに対する根治的かつ副作用を回避した画期的治療となりうることを期待される。

(2)申請者らはこれまでに1)神経芽腫のallelotype解析を行い、新たな高頻度欠失領域として2q, 9p, 18qを同定した。また、2)網羅的ゲノム解析を行い、神経芽腫、リンパ腫および骨髄異型症候群における標的分子をつきとめた。更に、3)小児固形腫瘍細胞株のCD133分画にCSCを高率に含むことが推測される高い造腫瘍能を有する細胞群を見出した。

2. 研究の目的

本申請では最新のマイクロアレイ技術、次世代シーケンサーなどゲノムワイドな手法を駆使して、小児固形腫瘍の発がんをCSCを制御する分子情報を体系的に解析し、CSCを標的とした創薬開発のための分子基盤を構築する。更に研究成果を発展させることにより、難治性小児固形腫瘍の根治を目指した新規創薬の開発を目指す。

具体的には代表的な難治性小児固形腫瘍である神経芽腫、横紋筋肉腫の新鮮腫瘍と細胞株を用いて、1) SNPアレイ(GeneChip 500K /CNAG/AsCNAR)によるCSC特異的なゲノムコピー数の網羅的解析(23年度)、2)次世代高速シーケンサーを用いたCSCとその下層の分化したがん細胞におけるエクソソームキャプチャー、エピゲノムの網羅的解析(24年度)、3)CSCの成立、維持を制御する特異的分子を標的とした新規創薬の開発、動物モデルを用いた新規創薬の安全性と有効性の検証(24、25年度)を試みる。

3. 研究の方法

(1)神経芽腫におけるポリコム蛋白を含むエピゲノム関連分子のターゲットキャプチャー
ポリコム蛋白は幹細胞の制御に重要な役割を担っており、成人がんでは、発がんとの関与が報告されている。そこで、小児固形腫瘍の発がんに関与しているか否かを検討するために、神経芽腫24検体におけるポリコム蛋白のターゲットキャプチャーを行い、候補標的分子を検出する。その結果、抽出される候補遺伝子につき、さらに96検体の検体を用いて、ターゲットキャプチャーを行い、頻度の検証を行う。また標的遺伝子の発がんへの関与を検討するために、細胞株を用いたノックダウン実験、invasion assayを行う。

(2)横紋筋肉腫のexome解析と標的pathwayにおけるdeep sequencing

再発、転移腫瘍を含む横紋筋肉腫16例のexome解析を行い、標的分子の同定を行う。その結果、検出される重複変異に関してさらに、60例のvalidation cohortを用いて、deep sequencingを行い、病的意義と頻度の検証を行う。

4. 研究成果

(1)神経芽腫におけるポリコム蛋白を含むエピゲノム関連分子のターゲットキャプチャー
ポリコム群タンパク質はショウジョウバエの胚で発見され、発生において体の前後軸や体節を決定するホメオティック遺伝子の発現抑制状態を維持する働きをもつとされている。近年、ヒトPcGが血液のがんや上皮性腫瘍の発生に関わっていることが示唆され、がんが悪性化するメカニズムの解明や、新しい治療法、腫瘍マーカーの開発につながるのではないかと期待が集まっている。そこで、神経芽腫の発症にポリコム群タンパク質が関与しているか否かを検証するために、平成23、24年度では、神経芽腫24検体におけるポリコム蛋白のターゲットキャプチャーを行い、候補標的分子を検出した。そこで、平成25年度は、さらに96検体の検体を用いて、ターゲットキャプチャーを行い、頻度の検証を行った。その結果、トライソックス蛋白であるASH1L遺伝子の変異を約10%の症例に見出した。ASH1L変異を有する例は全て、stage4の進行例であった。さらに、変異の部位がASH1L遺伝子の全長に

わたっていること、1例においてナンセンス変異が検出されたことから、この遺伝子の機能消失が神経芽腫の発症に寄与している可能性が示唆された。

表 1 神経芽腫で検出された ASH1L の変異

検体	原発/転移(病期)	変異	ALK	MYCN	
Patient samples	Case 1	rec and meta	Somatic p.K290fs	WT	-
	Case 2	rec and meta	Somatic p.A2299T	F1174L	+
	Case 3	primary(stage4)	Somatic p.A2870T	WT	-
	Case 4	Primary(stage4)	Germline p.I422M	WT	-
	Case 5	Primary(stage4)	Germline p.K732E	WT	-
	Case 6*	primary/and meta	Germline p.F1287L	WT/Q1275R	-
	Case 7***	primary/rec and meta	Germline p.I1341V	F1174I	+
	Case 8*	primary	Germline p.I1341V	WT	-
Cell line	CHP212		p.Q472H	WT	+
	NB9		p.Q472H	WT	+
	IMR32		p.P1954S	WT	+

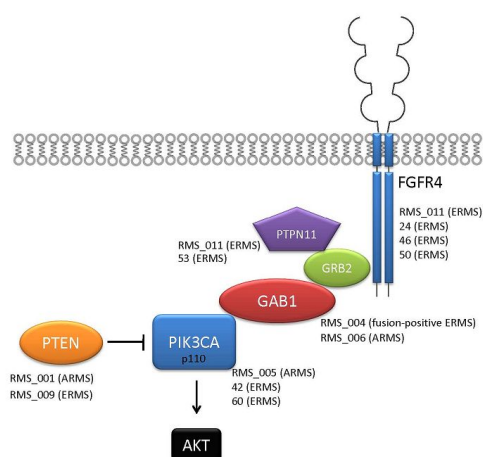
(2) 横紋筋肉腫の exome 解析と標的 pathway における deep sequencing

横紋筋肉腫は小児の軟部腫瘍の中で最も頻度が高く、病理組織学的に胎児型と胞巣型に2分される。特に初発時より遠隔転移を伴う例や再発例は、極めて予後不良であり、5年生存率は20-30%程度である。そこで、横紋筋肉腫の難治化や再発の分子病態を解明するために、次世代シーケンサー(イルミナHiSeq200)を用いてexome解析を行った。

シーケンスされた全エクソン領域のうち84.6%(71.7%-90.7%)は20回以上のdepthが得られ、変異解析を行うデータ量としては十分と考えられた。検出された somatic 変異は概ね成人がんと比べると少数であり、極端に多い1例(胞巣型1例)を除くと4-32個/1症例で平均11.8個であった。また初発/再発・転移の比較では、初発腫瘍に比べて再発・転移腫瘍において変異の数が多い傾向がみられたが有意差には至らなかった(P=0.062, Fisher's exact test)。例外的に多くの変異が検出された胞巣型症例(Case 001)では、DNA修復に関わることが知られている MBD4 遺伝子の変異(初発、再発ともに major クローンとして検出された)や TP53 遺伝子の変異が検出された。神経芽腫や髄芽腫では DNA 修復関連遺伝子や TP53 遺伝子に変異があると腫瘍細胞に生じている変異数が有意に多いことが報告されていることから、この症例では、それらの影響で体細胞変異が蓄積した可能性が考えられた。単一遺伝子の変異の頻度は少ないものの、FGFR4 経路の異常

を重複して見出した。そこで、平成 24, 25 年度にはさらに、60 例の横紋筋肉腫の新鮮腫瘍検体を用いて、FGFR4 経路の 8 遺伝子、全長約 500KB につきターゲットシーケンスを行い、変異の検証を行った。その結果、FGFR4 経路の変異は約 30%に見出され、特に胎児型横紋筋肉腫に多い傾向がみられた(図1)。従って、この経路の阻害剤は、胎児型横紋筋肉腫の標的治療薬となる可能性が示唆された。

図 1 横紋筋肉腫でみだされた FGFR4 経路の変異



5. 主な発表論文など

[雑誌論文] (計 40 件)

1. Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A et al. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. Cancer Res. 2014 May 15. pii: canres.0241.2014. [Epub ahead of print] 査読有
2. Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, Kato M, Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma. Cancer Res. 74:2742-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2470. 査読有
3. Takita J, Chen Y, Kato M, Ohki K,

- Sato Y et al. Genome-wide approach to identify second gene targets for malignant rhabdoid tumors using high-density oligonucleotide microarrays. *Cancer Sci.* 105:258-64, 2014 doi: 10.1111/cas.12352. 査読有
4. Sekine T, Komoda F, Miura K, Takita J, Shimadzu M et al. Japanese Dent disease has a wider clinical spectrum than Dent disease in Europe/USA: genetic and clinical studies of 86 unrelated patients with low-molecular-weight proteinuria. *Nephrol Dial Transplant.* 29:376-84. 2014 doi: 10.1093/ndt/gft394. 査読有
 5. Kato M, Shiozawa R, Koh K, Nagatoshi Y, Takita J, Ida K, Kikuchi A, Hanada R. The effect of the order of total body irradiation and chemotherapy on graft-versus-host disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 36:e9-12, 2014 doi: 10.1097/MPH.0b013e318279e81c. 査読有
 6. Taketani T, Takita J, Ueyama J et al. Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth. *J Pediatr Hematol Oncol.* 36:166-168, 2014 doi: 10.1097/MPH.0b013e318290c686. 査読有
 7. Takeuchi M, Shiozawa R, Hangai M, Takita J, Kitanaka S. Cephalhematoma and petechial rashes associated with acute parvovirus B19 infection: a case report. *BMC Infectious Diseases.* 13:465, 2013 doi: 10.1186/1471-2334-13-465. 査読有
 8. Kato M, Takahashi Y, Tomizawa D, Okamoto Y, Inagaki J, Koh K, Ogawa A, Okada K, Cho Y, Takita J, Goto H et al. Comparison of intravenous with oral busulfan in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with myeloablative conditioning regimens for pediatric acute leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19:1690-1694, 2013 doi: 10.1016/j.bbmt.2013.09.012. 査読有
 9. Omori M, Yamashita H, Shinohara A, Kurokawa M, Takita J, Hiwatari M, Nakagawa K. Eleven secondary cancers after hematopoietic stem cell transplantation using a total body irradiation-based regimen in 370 consecutive pediatric and adult patients. *Springerplus.* 2:424, 2013 doi: 10.1186/2193-1801-2-424. 査読有
 10. Miura K, Sekine T, Takahashi K, Takita J, Harita Y et al. Mutational analyses of the ATP6V1B1 and ATP6V0A4 genes * in patients with primary distal renal tubular acidosis. *Nephrol Dial Transplant.* 28:2123-2130, 2013 doi: 10.1093/ndt/gft216. 査読有
 11. Saito A, Taketani T, Kanai R, Kanagawa T, Kumori K, Yamamoto N, Ishikawa N, Takita J, Yamaguchi S. A Case With Sacrococcygeal Primitive Myxoid Mesenchymal Tumor of Infancy: A Case Report and Review of the Literature. *J Pediatr Hematol Oncol.* 35:e280-282, 2013 doi: 10.1097/MPH.0b013e31829182bb. 査読有
 12. Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A et al. Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer Sci.* 104:856-864, 2013 doi: 10.1111/cas.12173. 査読有
 13. Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, Takita J, Kikuchi K et al. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology* 80:1571-1576, 2013 doi: 10.1212/WNL.0b013e31828f18d8. 査読有
 14. Tumurkhuu M, Saitoh M, Takita J, Mizuno M, Mizuguchi M. A novel SOS1 mutation in Costello/CFC syndrome affects signaling in both RAS and PI3K pathways. *J Recept Signal Transduct Res.* 33:124-128, 2013 doi: 10.3109/10799893.2013.779279. 査読有

- 有
15. Kato M, Yasui N, Seki M, Kishimoto H, Sato-Otsubo A, Hasegawa D, Kiyokawa N, Hanada R, Ogawa S, Manabe A, Takita J, Koh K. Aggressive transformation of juvenile myelomonocytic leukemia associated with duplication of oncogenic KRAS in consequence of acquired uniparental disomy. *J Pediatr*. 162:1285-1288, 2013 doi: 10.1016/j.jpeds.2013.01.003. 査読有
 16. Mori M, Hiwatari M, Takita J, Ida K, Kawaguchi H. Successful syngeneic PBSC transplantation for a patient with refractory Evans syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 48:312-313, 2013 doi: 10.1038/bmt.2012.136. 査読有
 17. Kato M, Horikoshi Y, Okamoto Y, Takahashi Y, Hasegawa D, Koh K, Takita J, Inoue M et al. Second allogeneic hematopoietic SCT for relapsed ALL in children. *Bone Marrow Transplant*. 47:1307-1311, 2012 doi: 10.1038/bmt.2012.29. 査読有
 18. Takita J, Yoshida K et al. Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 26:1879-1881, 2012 doi: 10.1038/leu.2012.45. 査読有
 19. Okubo J, Takita J, Chen Y et al. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene*. 31:4667-4676, 2012 doi: 10.1038/onc.2011.616. 査読有
 20. Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M et al. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 156:672-674, 2012 doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08900.x. 査読有
 21. Miura K, Sekine T, Takamizawa M, Terashima H, Furuya A, Koh K, Takita J, Ida K, Igarashi T. Early occurrence of nephrotic syndrome associated with cord blood stem cell transplantation. *Clin Exp Nephrol*. 16:180-182, 2012 doi: 10.1007/s10157-011-0538-6. 査読有
 22. Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, et al. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Science*. 102:1645-1650, 2011 doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01995.x 査読有
 23. Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H et al. CBL mutation in childhood therapy-related leukemia. *Leukemia*. 25: 1356-1358, 2011 doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08900.x. 査読有
 24. Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia*. 25:382-384, 2011 doi: 10.1038/leu.2010.307.
 25. Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 102:302-308, 2011 doi: 10.1038/leu.2010.307. 査読有
 26. Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY et al. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia*. 25:184-186, 2011 doi: 10.1038/leu.2010.241. 査読有
 27. Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A et al. Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. *Brain Dev*. 33:353-356, 2011 doi: 10.1016/j.braindev.2010.06.014. 査読有
- 〔学会発表〕（計 121 件）
1. Seki M, Nishimura R, Hoshino N, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J: Genetic Landscapes Of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. American Society of Hematology 2013, New Orleans, U.S.A., December 7-10, 2013
 2. Seki M, Nishimura R, Hoshino N, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y,

- Sanada M, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J: The Genetic landscape of pleuropulmonary blastoma. The 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, September 25-28, 2013
3. Nishimura R, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Seki M, Hoshino N, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Ogawa S, Takita J: The Genetic landscapes of rhabdomyosarcoma. The 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, September 25-28, 2013
 4. Nishimura R, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Seki M, Hoshino N, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Ogawa S, Takita J: Exome sequencing analysis in rhabdomyosarcoma including metastatic or relapsed tumors. 9th ASPR Congress, Malaysia, May 9-12, 2013
 5. Seki M, Nishimura R, Hoshino N, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Kato K, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J: Genome-wide analyses of pleuropulmonary blastoma. 9th ASPR Congress, Malaysia, May 9-12, 2013
 6. Seki M, Nishimura R, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Kato K, Hayashi Y, Miyano S, Ogawa S, Takita J: Genome-wide approach to identify gene targets of pleuropulmonary blastoma. American Association for Cancer Research 2013, Washington DC, U.S.A., April 6-10, 2013
 7. Takita J: Genome-wide analyses of pediatric solid tumors. 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Hawaii, Feb.21-25, 2013
 8. Nishimura R, Takita J, Yoshida K, Shiraishi Y et al: Whole-exome sequencing of advanced neuroblastomas. Advances Neuroblastoma Research Conference, Toront, June 18 - 21, 2012
 9. Hoshino N, Takita J, Okubo J, Nishimura R et al.: Genetic alterations of RET proto-oncogene in neuroblastoma. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 17 -19 ,2012, Seoul
 10. Nishimura R, Takita J, Yoshida K, Shiraishi Y, Okubo J, Hoshino N, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Igarashi T, Ogawa S: Whole-exome sequencing of advanced neuroblastomas using next-generation sequencer. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 17-19 , 2012, Seoul
 11. Hiwatari M, Takita J, Nishimura R, Okubo J, Oki K, and Ogawa S. Mutational analysis for IDH1 and IDH2 in pediatric leukemia. American Association for Cancer Research, Chicago, March 31-April 4, 2012
 12. Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K et al: Genome-Wide Analysis Identified Frequent Inactivation of A20 in B-Cell Type Malignant Lymphomas. 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Denver Colorado, April 30-May 3, 2011
 13. Nishimura R, Takita J, Kato M et al. Genome-Wide Copy Number Analysis in Rhabdomyosarcoma Using SNP-Genotyping Microarray. 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Denver Colorado, April 30-May 3, 2011
- 〔図書〕（計4件）
 滝田順子：臨床検査ガイド 2013-2014 第一版 10. 染色体検査・遺伝子検査 先天異常，文光堂，P1038-1040，東京，2013
6. 研究組織
 (1)研究代表者
 滝田 順子 (TAKITA, Junko)
 東京大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：00359621
 (2)研究分担者
 真田 昌 (SANADA, Masashi)
 京都大学・医学(系)研究科(研究院)
 研究者番号：20429044