

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461566

研究課題名(和文) 先端的ゲノミクスによる小児横紋筋肉腫の新規転座とクローン進化の解析

研究課題名(英文) Analyses for novel translocation and clonal evolution of pediatric rhabdomyosarcoma using advanced genomics

研究代表者

西村 力(Nishimura, Riki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10463861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：最終的にRNAシーケンス解析可能なサンプルは、胎児型5例、胞巣型3例(うち1例は転座陰性)の計8検体だった。RNAシーケンスでは22の転座が検出され、インフレームで融合していたのは3つ、インフレームでないものが19だった。このうちRT-PCRにて再現性が確認されたのが、インフレームのものは2、インフレームでないものは10だった。インフレームで確認された2つはPAX3-FOXO1で、最終的に転座陰性胞巣型、胎児型から新規の融合遺伝子は検出されなかった。インフレームでなかったが、胎児型の1例で検出されたNSD1-ZNF346は、これまでに胎児型横紋筋肉腫細胞株で認められたとの報告があった。

研究成果の概要(英文)：RNA sequencing was performed for 8 samples including 5 embryonal rhabdomyosarcoma (ERMS) and 3 alveolar rhabdomyosarcoma (ARMS). A total of 22 fusion transcripts were detected using RNA sequencing, including 3 in-frame and 19 out-of-frame fusions, in which 2 in-frame and 10 out-of-frame fusions were confirmed by RT-PCR. Both 2 in-frame fusions were known PAX3-FOXO1 fusion, therefore, no novel translocation was found in fusion-negative ARMS and ERMS in this study. Despite out-of-frame translocation, NSD1-ZNF346 fusion detected in one ERMS sample had been previously found in a cell line of ERMS.

研究分野：小児腫瘍

キーワード：横紋筋肉腫 次世代シーケンサー RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

小児横紋筋肉腫は小児軟部腫瘍の中で最も多い悪性腫瘍で、病理組織学的に大きく胞巣型と胎児型に分けられる。いずれの病型においても、初診時遠隔転移陽性の場合、5年生存率30%未満と極めて不良であり、このような難治例に特化した新たな治療戦略の開発が求められている。そのためには難治性横紋筋肉腫の発症分子機構を解明し、分子病態に立脚した新規治療法の開発が急務と考える。しかし、横紋筋肉腫の特異的ゲノム異常としては、胞巣型のPAX3/7-FOXO1融合遺伝子が知られているのみで、いまだ分子機構の上で不明な点が多い。腫瘍発生のメカニズムとして、小児腫瘍では転座が関与する頻度が高いとされている。慢性骨髄性白血病におけるBCR-ABL(約100%陽性)や小児急性リンパ球性白血病のTEL-AML1(約25%)、固形腫瘍ではユーイング肉腫におけるEWS関連融合遺伝子(約80%)、胞巣型横紋筋肉腫におけるPAX3/7-FOXO1(約85%)などで、それらの多くは腫瘍特異性を示し、頻度も高い。BCR-ABLに対しては阻害剤のイマチニブが臨床応用されている。新しい重複する転座の同定は、腫瘍の分子病態の解明やそれに基づいた治療薬開発につながる、非常に重要な情報となる。横紋筋肉腫では胞巣型の約20%と胎児型においては、現在重複する転座は報告されていない。

一方近年の次世代シーケンサーの登場により、ゲノム解析は今まで不可能に近かった莫大なデータを短時間に処理することが可能となり、バイアスのない網羅的なシーケンスが実現した。これは変異解析だけでなく融合遺伝子の探索にも有用で、腫瘍由来のRNAを全てシーケンスし、2つの遺伝子配列が途中でつながることを確認することで転座を強力に検出する。従来細胞遺伝学的手法に比べ、網羅的かつ大幅に効率的な解析が可能となり、実際肺腺がんにおけるKIF5B-RET融合遺伝子(1)、EWS関連融合遺伝子陰性のユーイング肉腫類似腫瘍からBCOR-CNNB3融合遺伝子

(2)などが新しく発見されている。がんゲノム解析の急速な進歩は、単一細胞でのシーケンス(シングルセルシーケンス)をも可能とした。腎がんなどでは直接証明されているが(3)、腫瘍は始祖の腫瘍細胞に付加の変異と、より増殖力が強い細胞が優勢となるクローン選択が加わって形成されるため、複数のクローンにより構成される(腫瘍内不均一性)。申請者らの横紋筋肉腫ゲノムコピー数解析でも、同一腫瘍の別切片ではコピー数変化の違いを認め、腫瘍内不均一性を示す結果を得ている(4)。従って腫瘍を構成する複合的な遺伝子異常を把握し、より根源的な変異や侵襲性を規定する変異を同定するためには、腫瘍内の複数個所で細胞レベルでの変異を検出することが必要と考えられる。クローン進化を詳細に追跡して腫瘍の進展や

再発、転移との関連を分析することは、腫瘍の分子機構の解明に大きく寄与するものであり、さらに治療薬の開発の上でも利点は大きい。この目的を実現するには、原発巣、転移・再発巣を構成する細胞を時空的に解析する、シングルセルシーケンスの手法は適切かつ有用と考えた。

世界的にも2012年より小児腫瘍領域において、次世代シーケンサーを用いた解析が報告されるようになっており、神経膠腫(5)、髄芽腫(6)、神経芽腫(7)において新規の変異遺伝子が報告された。しかし成人腫瘍と異なり、多くは重複があっても頻度は低く、遺伝子体細胞変異で主要なメカニズムを説明することは困難であった。自験例の横紋筋肉腫も同様で、体細胞変異自体が少なく、高頻度に変異が重複する遺伝子は検出されず、それは生殖細胞系列でも同様であった。このように小児固形腫瘍の遺伝学的背景は、比較的不均一であり、その進展機序も多種多様であることが推測され、多方面からの解析が必要と考えられる。

2. 研究の目的

胎児型または転座陰性胞巣型横紋筋肉腫の新規の転座の有無についてRNAシーケンスを用いて検証し、その頻度や機能的、臨床的意義を解析することで、横紋筋肉腫の発症機構を解明し、その分子病態に立脚した合理的かつ有効な新規治療法の開発基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1)胎児型または転座陰性胞巣型横紋筋肉腫における新規の転座を同定するために、次世代シーケンサーを用いてRNAシーケンスを行う。解析には東大小児科研究室保有の凍結検体、新規症例があればその新鮮腫瘍検体も追加する。また、希少疾患のため全国からの検体の収集も行い、できるだけ検体数の増加を試みる。1検体あたり必要RNA量は0.1-4μgであるが、RNAシーケンスでは高純度のRNAが必要なため(RNA Integrity ≥ 8)、BioAnalyzerで確認を行う。基準をクリアした検体についてシーケンス用のサンプル調整(illumina社のTruseq sample prep kit v2を使用)を進める。シーケンサーはillumina社のHiSeq2000かMiseqを用いる。シーケンスデータからの転座候補を抽出は、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピューターを用いて解析を行うことで(DNA情報解析分野 Genomon-Fusion:

<http://genomon.hgc.jp/rna/>)、転座の候補リストが得られる。転座候補はreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)でも再現性を確認する。

(2)重複する転座が同定された場合は、臨床的意義を検証し、さらに機能解析を行い、

横紋筋肉腫の新規の治療標的となりうるか検討する。1 検体のみで検出されたものでも機能的に病態に関わりうる転座については、RT-PCR で可能な限りの多数検体 (RNA シークエンスには純度が不足していた検体も含めて) で頻度を確認する。その結果に合わせて、転帰との関連など、臨床的意義の検証や機能解析を行う。転座を起こす場合、融合遺伝子を形成するだけでなく遺伝子が分断されることでその機能を喪失する現象も起こりうるため、そういった遺伝子の有無、頻度、機能的にがんに関わり得るかなどを解析する。

4. 研究成果

小児科研究室で長期凍結保存されていた横紋筋肉腫の検体には純度に問題があることが多く、最終的に RNA シークエンス解析に必要な純度をクリアした腫瘍検体は、胎児型 5 例、胞巣型 3 例の 8 検体だった。

組織型	転座	初発年齢(歳)	原発巣	病期	転帰
胞巣型 1	PAX3-FOXO1	7	左足	1	死亡
胞巣型 2	PAX3-FOXO1	10	初診時多発転移のため不明	4	死亡
胞巣型 3	なし	0	皮膚	4	死亡
胎児型 1	なし	2	膣	1	生存
胎児型 2	なし	2	子宮	1	生存
胎児型 3	なし	1	膣	1	生存
胎児型 4	なし	4	傍精巣領域	1	生存
胎児型 5	なし	2	肛門	3	死亡

表 1 RNA シークエンス解析症例情報

胞巣型 3 例中 2 例は PAX3-FOXO1 融合遺伝子陽性であることが事前に判明している症例で、1 例は転座陰性胞巣型検体だった。転座

陽性の胞巣型 2 例は検査の positive control として、また胎児型細胞株 2 株 (RD、RMS-YM) も同時に解析を行った。腫瘍検体における RNA シークエンスでは 22 の融合遺伝子が検出され、そのうちインフレームで融合していたのは 3 つ、インフレームでないものが 19 だった。胎児型横紋筋肉腫細胞株からは 2 サンプルとも多数の融合遺伝子を認め、株化する段階でランダムに入った変化と考えられた。腫瘍検体から検出された転座のうち、インフレームのものは 2/3、インフレームでないものは 10/19 で RT-PCR にて再現性が確認された。胞巣型の 1 例、胎児型の 1 例からは再現性のある転座は確認されなかった。

組織型	5' gene	3' gene	Pair No.*	Inframe
胞巣型 1	C15orf57	CBX3	2	No
	DOHH	PIP5K1C	5	No
	FOXO1	PAX3	26	Yes
胞巣型 2	FOXO1	PAX3	5	Yes
	GIP	CBX1	2	No
胎児型 2	GIP	CBX1	2	No
胎児型 3	KRT6B	KRT6A	8	No
胎児型 4	RPS24	RPS11	21	No
胎児型 5	NSD1	ZNF346	46	No
	SLC24A3	DTD1	21	No
	UBXN2A	ATAD2B	6	No
	THRAP3	TRAPPC3	2	No
	UBXN2A	ATAD2B	5	No

表 2 再現性が確認された融合遺伝子リスト
* Pair No. は融合遺伝子の融合部位がシークエンスされた回数。2 以上をリスト化し、RT-PCR で再現性を確認した。

インフレームで確認された 2 つは PAX3-FOXO1 のみで、最終的に転座陰性胞巣型、胎児型から新規の融合遺伝子は検出されなかった。インフレームでない融合遺伝子の臨床的意義は不明だが、胎児型の 1 例で検出された NSD1-ZNF346 は、胎児型横紋筋肉腫細胞株で認められたとの報告(9)があった。

引用文献

1. Ju YS, Lee WC, Shin JY et al. Genome Res 22:436-445, 2012
2. Pierron G, Tirode F, Lucchesi C et al. Nat Genet 44:461-466, 2012
3. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. N Engl J Med 366: 883-892, 2012
4. Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A, et al. Cancer Sci 104: 856-864, 2013
5. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, et al. Nat Genet 44:251-253, 2012
6. Pugh TJ, Weeraratne SD, Archer TC, et

al. Nature 488:106-110, 2012
7. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, et al. Nat Genet 45:279-284, 2013
8. Chen, X. et al. Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma. Cancer cell 24, 710-724 (2013).

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1件)

Masafumi Seki, Riki Nishimura, Kenichi Yoshida, Tepei Shimamura, Yuichi Shiraishi, Yusuke Sato, Motohiro Kato, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Noriko Hoshino, Genta Nagae, Yusuke Shiozawa, Yusuke Okuno, Hajime Hosoi, Yukichi Tanaka, Hajime Okita, Mitsuru Miyachi, Ryota Souzaki, Tomoaki Taguchi, Katsuyoshi Koh, Ryoji Hanada, Keisuke Kato, Yuko Nomura, Masaharu Akiyama, Akira Oka, Takashi Igarashi, Satoru Miyano, Hiroyuki Aburatani, Yasuhide Hayashi, Seishi Ogawa & Junko Takita. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. Nature Communications 6, article number 7557 (2015)

[学会発表](計2件)

次世代シーケンサーを用いた横紋筋肉腫の遺伝子変異全体図, 第117回日本小児科学会学術集会, 2014年4月11-13日, 名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)
The Genetic Landscape of Rhabdomyosarcoma, Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, MAY3-MAY6, 2014, Vancouver, Canada

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 力(NISHIMURA, Riki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10463861

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()