

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461603

研究課題名(和文) 予後不良神経芽腫の次世代型ゲノム解析によるリスク分類構築と新規治療法探索への応用

研究課題名(英文) Integrated genomic analysis of aggressive subtype of neuroblastoma

研究代表者

大平 美紀 (Ohira, Miki)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・主幹研究員

研究者番号：20311384

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)：本研究では神経芽腫の予後の異なるサブグループのゲノムプロファイルを統合解析し、サブセット毎の発症や悪性化に關与する遺伝子の同定を目的とする。予後不良群30例の全エクソーム解析では、MAPK経路やaxon guidance遺伝子群の変異がエンリッチされていた。特にRAS-MAPK経路の変異は再発腫瘍でも高頻度に見られた。メチローム解析からは、予後の異なる3つのクラスターが同定され、遺伝子発現との比較から予後に強く相関する遺伝子群を抽出した。これらの臨床的意義について独立症例でさらに検証する必要があるが、抽出された候補遺伝子群は今後の難治性神経芽腫のリスク分類の精度向上に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Neuroblastoma (NB) is the most common pediatric extracranial solid tumor, originating from the sympathoadrenal lineage of neural crest. Despite intense multi-modal therapy, NB remains the second most common cause of cancer deaths among children. To elucidate molecular basis for malignant type of NB, we have conducted integrated genomic analyses, including array CGH, whole exome sequencing, transcriptome and methylome profiling. Whole exome sequencing of 30 high stage primary tumors identified approximately 20 non-silent somatic mutations and indels per tumor in average, among which 27 were recurrent mutations appeared >2. Pathway analysis revealed enrichment of the mutated genes in the MAPK pathway and the axon guidance pathway. Methylome profiling suggested the existence of three clusters with different survival rates. Altogether, these genomic features can help understand NB pathogenesis and contribute risk stratification for therapy.

研究分野：ゲノム腫瘍学

キーワード：神経芽腫

## 1. 研究開始当初の背景

小児の代表的な腹部固形腫瘍である神経芽腫には、1歳未満で発症し、しばしば自然退縮を起こす予後良好タイプがある一方で、1歳以降に生じ、非常に予後不良な難治例も存在する。最近の大量化学療法の進歩にもかかわらず、進行神経芽腫の5年生存率は約30%と依然として予後不良である。神経芽腫組織で見られる代表的なゲノム異常としては、2pのMYCNがん遺伝子の増幅、ALK遺伝子の増幅と変異、1p36領域の欠失、11q欠失、17qの増加などが知られているが、1p、11q、17qの領域からの病態関連遺伝子は未だはっきりと特定されていない。また、現在臨床で用いられている神経芽腫の予後マーカーには、病期、診断時年齢、DNAプロイディ、病理組織分類の他、1p36領域の欠失、MYCNの増幅などの染色体変化等があるが、しばしばこれらの既存予後マーカーでは悪性度予測が困難な中間予後群が存在する。これまでに欧米から報告された全エクソーム解析では、神経芽腫では他の成人がんに対してアミノ酸置換変異が起こった遺伝子は症例あたり平均約12カ所と少なく、腫瘍間で共通な遺伝子変異はほとんど見られないが、腫瘍サブセット毎に変異遺伝子の機能カテゴリーに特徴があること(ただし各変異遺伝子の発現パターンの検証は未解析) 予後良好群と不良群の間で発現に差のある遺伝子の染色体マップから、必ずしも遺伝子発現変化がゲノムコピー数変化とリンクしないこと、すなわち、恐らく遺伝子の転写調節領域の変異やゲノムメチル化などのエピジェネティックな変化も悪性化に関わっていること、が示唆された。遺伝子発現データとエクソームシーケンシングからの変異遺伝子データを詳細に解析することにより、臨床経過の異なる腫瘍サブセット毎の新たな神経芽腫の悪性化メカニズムが明らかになる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では多様な臨床像を示す神経芽腫に対して最適な治療戦略を構築することを最終目標に、神経芽腫の予後の異なる各サブグループのゲノムコピー数、遺伝子変異パターンに遺伝子発現、エピゲノムの各プロファイルを統合して解析することにより、神経芽腫サブセット毎の発症や悪性化に関する遺伝子の同定と解析を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 解析対象症例と基礎データの収集

小児がん臨床施設にて分子診断用に生検または手術により採取された神経芽腫検体のうち、研究使用に対する同意が得られたものを対象とした。分子診断後の余剰検体は各小児がん臨床施設にて匿名化処理されたのち、神経芽腫検体センター(千葉県がんセンター、埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所)に登録・保管されている。分子診断データ(腫瘍検体のMYCNコピー数、DNAプロイディ)と診断時月齢、病期、予後も検体ごとにデータベース化されている。本研究では、これらの検体から調製したDNAとRNAを使用した。これらの試料ならびに付随する臨床情報の使用については千葉県がんセンター倫理審査委員会・埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に申請し、承認を受けて行った。

### (2) アレイ CGH 解析

ステージ3または4の40症例(生存例20、死亡例20)、MYCN増幅群30例(長期生存例20、死亡例10)の腫瘍由来DNAを調製し、アジレント社製ゲノムアレイ(244K、8x60K、4x44K)を用いたアレイCGH解析を行った。データ出力にはGenome Work Bench解析ソフトを用いた。1p欠失、11q欠失、17q増加、MYCN増幅の有無などの情報を用いて、ゲノムコピー数異常のパターンによるゲノムサブグループ(Tomioka N, Oba S, Ohira M et al, *Oncogene* 2008)に分類した。

### (3) 遺伝子発現マイクロアレイ解析

腫瘍RNAに対しアジレント社製8x60Kv2遺伝子発現アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。データ出力はアレイデータ解析ソフトGeneSpring GXを用いた。

### (4) 次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析、RNA シークエンシング

腫瘍由来DNAと、対照としての患者血液由来DNAを用いて、ヒト全エクソン断片(約50M)をアジレント社 SureSelect によりキャプチャーし、精製後イルミナ社 HiSeq2000 によりシーケンシングを行った(読取り深度>75x)。読み取り配列をBurrow-Wheeler Alignerを用いてhg19ヒトリファレンス配列にマップし、変異コールはMutTectを用いて1塩基置換を検出した(>4 variant reads)。欠失・挿入の検出はPindelを用いた。変異のアノテーションはANNOVARとOncotatorを用いた。変異の検証はサンガー法で行った。RNA シークエンシングも同様にイルミナ社

HiSeq2000 を用いた。

#### (5) エピゲノム解析

腫瘍由来 DNA を用いてバイサルファイト法を用いたビーズアレイ解析である Human Methylation 450 BeadChip (Infinium450K) によるメチローム解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 神経芽腫サブセットの網羅的ゲノム異常解析

近年の大量化学療法により、最も予後不良とされる *MYCN* 増幅症例にも生存期間 2 年以上の長期生存例が見られるようになった。一方、*ALK* や *ATRX* など、不良な予後に関連する遺伝子異常が報告されつつある。そこで、治療抵抗性癌に特徴的なゲノムならびに遺伝子発現プロファイルを明らかにするため、次世代シーケンサーを用いて *MYCN* 増幅群 30 例 (生存群 20 例、死亡群 10 例) のアレイ CGH 解析と全エクソーム解析を行った。

腫瘍あたり平均 約 20 個のアミノ酸置換を伴う体細胞一塩基置換または挿入・欠失変異が検出された。遺伝子変異の数は死亡例で有意に多く、診断時年齢とも正の相関が見られた。また、再発時検体ではさらに多くの遺伝子変異が生じている傾向が確認された。レファレンスゲノム配列に対する塩基置換のパターンは、C>T 置換が最も高頻度であった。独立の原発症例において複数回検出されたアミノ酸置換を伴う変異候補遺伝子は 27 遺伝子であった。そのうちの 1 つ、*NRAS* 遺伝子の Q61K gain-of-function 変異は 2 例の死亡例に見られた。この変異は別途行った 25 種類の神経芽腫細胞株のターゲットリシーケンシングにおいても 3 つの細胞株に同変異が検出され、比較的頻度の高い変異のターゲットとなっていることが明らかになった。

変異が見つかった遺伝子群のアノテーション解析、パスウェイ解析から、*MYCN* 増幅症例では特に *MAPK* パスウェイ関連遺伝子 (*NRAS*, *MAP4K2*, *MAP3K4*, *MAP3K12*, *SOS1* など)、axon guidance 関連遺伝子 (*SEMA5A*, *SEMA3E*, *SEMA6C*, *SLIT1*, *NRAS* など)、Wnt シグナル関連遺伝子 (*FFATC1*, *FBXW11*, *CCND1*, *FZD9*, *DVL2* など) がエンリッチされていることが示された。axon guidance パスウェイは神経系発生における神経の遊走やポジショニングに働いているが、様々ながんにおいてがん細胞の増殖や生存、浸

潤などにも関わっていることが報告されていることから、*MAPK* パスウェイ、*Wnt* パスウェイとともに神経芽腫の発生、進展に何らかの役割を果たしていることが示唆される。*RAS*-*MAPK* パスウェイ遺伝子群の変異は再発腫瘍でも高頻度に見られることから、治療標的の候補として今後さらなる検討が必要である (Li Y, Ohira M et al, *Oncotarget* 2017)。

#### (2) 神経芽腫サブセットの網羅的遺伝子発現解析と RNA シークエンシング

ゲノムサブセットが判明している 40 症例 (予後良好群 20 例、不良群 20 例) について次世代型 DNA シーケンサーを用いた RNA シークエンシングと、アジレント社ヒト遺伝子アレイによる遺伝子発現解析を行い、同症例について取得済みのゲノムコピー数、遺伝子変異と、遺伝子発現レベルとの相関を検討した。症例あたり 1 個から 19 個、合計約 290 種類の RNA fusion 候補が検出され、1 例 (死亡例) については、特定の染色体に Fusion breakpoint の高度な集積が見られた。これら Fusion 遺伝子の存在が確認された症例では *TERT* が特に高発現していた。RT-PCR とサンガーシーケンスの両方で fusion 候補の検証を行い、4 種類の Fusion 遺伝子産物を確認した。うち 1 つを構成する遺伝子に関しては、エクソーム解析から別の 1 例にも変異が検出されており、また、その低発現が神経芽腫の不良な予後と強い相関が確認された。

さらに、変異が検出された遺伝子について検証を進めるため、遺伝子発現データと各症例の予後情報の関係性を検討した。アミノ酸変化を伴う変異を認めた遺伝子について logrank-test を行ったところ、複数回アミノ酸置換を伴う変異が検出された 27 遺伝子のうち、10 遺伝子が予後良好群で高発現を、8 遺伝子が予後不良群で高発現となっていることが示された。神経芽腫の予後との相関が知られている *ALK* や *TERT* に加え、これらの遺伝子が神経芽腫予後と関連することを見出した。

#### (3) 神経芽腫サブセットの網羅的メチローム解析

イルミナ社 Infinium450K アレイを用いた網羅的メチローム解析は 97 症例について行った。メチル化レベルが variable であった上位 5000 のプローブについて教師なしクラスタリングを行い、3 つのメチロ-

ムクラスター（予後良好型、MYCN 増幅型、予後不良 MYCN 非増幅型）が同定された。logrank-test により、それぞれのクラスターごとに有意に予後が異なることが示された。MYCN 増幅型クラスターのプロープには、神経芽腫の予後因子の一つとして報告がある CIMP マーカー（プロトカドヘリンベータファミリー遺伝子領域）が含まれていた。そのほかにも、遺伝子発現レベルとの比較から、予後不良神経芽腫で高メチル化かつ低発現であり、発現レベルが予後と相関する少なくとも 6 個の遺伝子を抽出した。これらの予後マーカーとしての評価は独立症例で今後さらに検証する必要があるが、本研究から抽出された候補遺伝子群は今後の難治性神経芽腫のリスク分類の精度向上に資すると期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Li Y\*, Ohira M\*, Zhou Y, Xiong T, Luo W, Yang C, Li X, Gao Z, Nakamura Y, Kamijo T, Kaneko Y, Taketani T, Ueyama J, Tajiri T, Zhang H, Wang J, Yang H, Yin Y, Nakagawara A. Genomic analysis-integrated whole-exome sequencing of neuroblastoma identifies genetic mutations in axon guidance pathway. *Oncotarget*. 査読有, 2017 in press, (\*equally contributed)  
doi: 10.18632/oncotarget.18079.

Satoh S, Takatori A, Ogura A, Kohashi K, Souzaki R, Kinoshita Y, Taguchi T, Hossain MS, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A. Neuronal leucine-rich repeat 1 negatively regulates anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Sci Rep*. 査読有, 8;6:32682, 2016. doi: 10.1038/srep32682.

Islam MS, Tatsumi Y, Takano R, Yokochi T, Akter J, Ozaki T, Nakamura Y, Ohira M, Nakagawara A. Transcriptional regulation of BMCC1 mediated by E2F1 in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 478:81-6, 2016.  
doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.089.

Islam SMR, Suenaga Y, Takatori A, Ueda Y, Kaneko Y, Kawana H, Itami M, Ohira M, Yokoi S, Nakagawara A. Sendai

virus-mediated expression of reprogramming factors promotes plasticity of human neuroblastoma cells. *Cancer Sci* 査読有, 106:1351-61, 2015.  
doi: 10.1111/cas.12746.

Isogai E, Okumura K, Saito M, Yoshizawa Y, Itoh K, Tando S, Ohira M, Haraguchi S, Nakagawara A, Fushiki S, Nagase H, Wakabayashi Y. Oncogenic Lmo3 cooperates with Hen2 to induce hydrocephalus in mice. *Exp Anim* 査読有, 64:407-14, 2015.  
doi:10.1538/expanim.15-0026.

Kaneko Y, Suenaga Y, Islam SM, Matsumoto D, Nakamura Y, Ohira M, Yokoi S, Nakagawara A. Functional interplay between MYCN, NCYM, and OCT4 promotes aggressiveness of human neuroblastomas. *Cancer Sci* 査読有, 106:840-7, 2015.  
doi:10.1111/cas.12677.

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* 査読有, 106:766-71, 2015. doi:10.1111/cas.12665.

Mishra R, Watanabe T, Kimura MT, Koshikawa N, Ikeda M, Uekusa S, Kawashima H, Wang X, Igarashi J, Choudhury D, Grandori C, Kemp CJ, Ohira M, Verma NK, Kobayashi Y, Takeuchi J, Koshinaga T, Nemoto N, Fukuda N, Soma M, Kusafuka T, Fujiwara K, Nagase H. Identification of a novel E-box binding pyrrole-imidazole polyamide inhibiting MYC-driven cell proliferation. *Cancer Sci* 査読有, 106:421-9, 2015.  
doi: 10.1111/cas.12610.

Oberthuer A, Juraeva D, Hero B, Volland R, Sterz C, Schmidt R, Faldum A, Kahlert Y, Engesser A, Asgharzadeh S, Seeger R, Ohira M, Nakagawara A, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Bénard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Grundy RG, Orthmann M, Shao C, Schwab M, Eils R, Simon T, Theissen J, Berthold F, Westermann F, Brors B, Fischer M. Revised risk estimation and treatment

stratification of low- and intermediate-risk neuroblastoma patients by integrating clinical and molecular prognostic markers. *Clin Can Res* 査読有, 21:1904-15, 2015.  
doi: 10.1158/1078-0432.

Tomiya A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, **Ohira M**, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res* 査読有, 21:1904-15, 2014.  
doi:10.1158/0008-5472.

[学会発表](計 13 件)

大平美紀 他 12 名, 難治性神経芽腫のゲノム・エピゲノム統合解析. 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016 年 12 月 15 日-17 日 品川プリンスホテル(品川)

大平美紀 他 13 名, 国際リスク分類システムと連携した神経芽腫分子生物学的データベースの構築と高リスク神経芽腫のゲノム解析. 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016 年 12 月 15 日-17 日 品川プリンスホテル(品川)

大平美紀 他 12 名, 難治性神経芽腫の網羅的ゲノム・エピゲノムプロファイル. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 日-8 日. パシフィコ横浜(横浜)

大平美紀 他 11 名, Clinical relevance of genomic and epigenomic classification of *MYCN*-non-amplified neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research 2016 (ANR2016)* 2016 年 6 月 19 日-23 日 ケアンズコンベンションセンター(オーストラリア・ケアンズ)

大平美紀 他 13 名, Genomic characterization of high-risk neuroblastoma in Japan: A retrospective study of 537 cases by using updated follow-up data based on INRG variables [JNBSG (Japan Neuroblastoma Study Group)]. *Advances in Neuroblastoma Research 2016 (ANR2016)* 2016 年 6 月 19 日-23 日 ケアンズコンベンションセンター(オーストラリア・ケアンズ)

大平美紀 他 11 名, Genomic landscape of aggressive tumor subtype in *MYCN*-non-amplified neuroblastoma. 第 107 回米国癌学会総会(AACR2016) 2016 年 4 月 16 日-20 日, アーネストモリアルコンベンションセンター(米国・ニューオーリンズ)

大平美紀 他 10 名, Genomic profiling of intermediate risk type of neuroblastoma without *MYCN* amplification. 第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会 2015 年 11 月 27 日-29 日 甲府富士屋ホテル(甲府)

大平美紀 他 10 名, Genomic characterization of aggressive subtypes of neuroblastoma with 11q partial loss. *Asia-Pacific Symposium of Neuroblastoma 2015 (APSN2015)* 2015 年 11 月 13 日-15 日, 国立台湾大学コンベンションセンター(台北)

大平美紀 他 10 名, 11q 欠失を伴った難治性中間リスク型神経芽腫のゲノム・エピゲノム解析. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日-10 日. 名古屋国際会議場(名古屋)

大平美紀 他 7 名, Genomic characterization of aggressive subtype of neuroblastoma without *MYCN* amplification. 第 106 回米国癌学会総会(AACR2015) 2015 年 4 月 18 日-22 日, ペンシルバニアコンベンションセンター(米国・フィラデルフィア)

大平美紀 他 7 名, 神経芽腫難治性サブタイプの網羅的ゲノム解析による予後関連ゲノム異常の検索. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 2014 年 11 月 28 日-30 日 岡山コンベンションセンター(岡山)

大平美紀 他 8 名, 進行神経芽腫の次世代シーケンサーによる全エクソーム解析. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日-27 日. パシフィコ横浜(横浜)

大平美紀 他 9 名, Genome-based sub-classification of neuroblastoma: A retrospective study by using 573 neuroblastoma samples obtained in Japan. *Advances in Neuroblastoma Research 2014 (ANR2014)* 2014 年 5 月 13 日-16 日 ケルンメッセ会場(ドイツ・ケルン)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大平 美紀 (OHIRA, Miki)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・

主幹研究員

研究者番号：20311384

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

中川原 章 (NAKAGAWARA, Akira)

佐賀県医療センター好生館・理事長

研究者番号：50117181

### (4) 研究協力者

なし