

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19638

研究課題名(和文) Gorlin症候群に発症した髄芽腫における固体内の遺伝的多様性の解析

研究課題名(英文) Analysis of genetic heterogeneity of medulloblastoma with Gorlin syndrome

研究代表者

山岡 正慶 (Yamaoka, Masayoshi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70614874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Gorlin症候群(GS)における髄芽腫発症の分子基盤を明らかにすることを目的としている。今回、GSを伴う髄芽腫2症例を中心にソニックヘッジホッグ(SHH)シグナルに関連した分子遺伝学的特徴について免疫染色や腫瘍関連の網羅的遺伝子解析にて検討した。その結果、腫瘍細胞におけるPTCH1の2ヒットやChromothripsisによるMYCN増幅、GNASの機能喪失変異などを検出し、各々がGSにおける腫瘍化や悪性転化に大きく寄与している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the molecular basis of medulloblastoma development in Gorlin syndrome (GS). We examined genetic features associated with Sonic Hedgehog (SHH) signal mainly in two medulloblastoma with GS with immunohistochemistry and comprehensive gene analysis of tumors. As a result, we investigated two hits of PTCH1 in tumor cells, MYCN amplification associated with chromothripsis and loss of function mutation of GNAS, and they contributes greatly to tumorigenesis or malignant transformation in GS. Moreover, somatic mosaicism of maternal heterodisomy of GNAS may cause clinical phenotype of POH and GS.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：髄芽腫 ソニックヘッジホッグ Gorlin症候群 GNAS

1. 研究開始当初の背景

小児がんの診断・治療技術の著しい進歩によりその生存率は目覚ましく向上し、現在では、がんと診断された子ども達の約70%に長期生存が期待されるようになった。しかし、小児がんは未だ5歳以上の子どもの内因性死因の第1位であり、特に白血病に次いで多い脳腫瘍では治癒できた場合でも重篤な後遺症を抱える例が多いため、治癒後の患者QOLを見据えた適切な治療選択が望まれている。

髄芽腫は小児の脳腫瘍の中でも神経膠腫に次いで多い疾患であり、古くから様々な病理学的・分子生物学的な分類が試みられてきた。近年、それらを分子生物学的に4つの群に分類した非常に画期的な新分類が考案されコンセンサスを得ている。その後の詳細な解析によって、それぞれの群における特徴的な遺伝子変異や病理像、予後との関連が報告されており、中でもソニックヘッジホッグ (SHH) シグナルに関連する髄芽腫 (SHH-MB)では、そのシグナル伝達経路はよく研究されており、この経路を標的とした治療開発が注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、Gorlin 症候群 (GS) における髄芽腫発症の分子基盤、特に既知の SHH 系のドライバー変異に加えて、どのような分子遺伝学的な変化が腫瘍の発生、増殖、転移などに関わっているか、また、個体内の遺伝的な Heterogeneity を明らかにし、新たな治療標的の開発や適切な病型分類を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

髄芽腫を発症した GS2 例を対象に、腫瘍関連遺伝子の網羅的変異解析、アレイ CGH 解析等を用いて分子遺伝学的解析を行う。GS に関連する特徴的な遺伝子変異に関しては、腫瘍組織と非腫瘍組織での差を比較し、固体内も遺伝的 Heterogeneity の様子を検索する。特に治療標的となりうる Gs 蛋白-SHH 関連に注目して解析を行った。

a) 対象症例

GS の診断基準 (Kimonis VE, Am J Med Genet. 1997;69:299) を満たした髄芽腫 2 例と非 GS 髄芽腫 3 例

b) GS 症例について

症例 1: 大頭症、大脳鎌石灰化、髄芽腫にて診断基準を満たし、PTCH1 に生殖細胞系列変異あり

症例 2: 足底 Pit、髄芽腫、心臓腫瘍にて診断基準を満たし、PTCH1・Smo・SUFU に遺伝子変異なし、右半身優位に分節性に異所性骨化病変を有し Progressive Osseous Heteroplasia (POH) をオーバーラップしており、POH の原因遺伝子である GNAS 変異が末梢血リンパ球にて同定された

1) 免疫組織学的解析

PTCH1、Gli1/2、YAP1、Phospho-PKA substrate 等において腫瘍検体と非腫瘍検体での蛋白発現の差異を免疫組織化学的手法にて解析する。

2) FISH 法による N-MYC(2p24.1)領域の増幅解析

LSI メディエンスに外注

3) Ion Ampliseq™ Comprehensive Cancer Panel を用いた癌関連遺伝子の網羅的解析

本学分子遺伝学研究室内に設置されているライフテクノロジー社の半導体シーケンサー Ion PGM™ システムを母体として、Ion Ampliseq™ Comprehensive Cancer Panel を用いて腫瘍関連の 409 遺伝子を網羅的に解析する。データ解析は機器付属のソフトである Torrent Suite v2.2 を使用、標準ヒトゲノム hg19 をリファレンス配列として解析を行う。

4) アレイ CGH によるゲノムコピー数解析

Cancer Panel による網羅的遺伝子解析では捉えられないようなゲノムの大きな欠失や増幅などの異常を想定して、アジレント社のアレイ CGH 解析を用いて、ゲノム全体のコピー数解析を行う。抽出したゲノム DNA を酵素法にてラベル化 (FFPE 検体では ULS ラベル化法を使用) しハイブリダイゼーションを行う。アレイ洗浄後、専用スキャナーにてスキャニングおよび数値化を行う。解析には Agilent Genomic Workbench を用いて、遺伝子の Location 情報と比較検討する。

5) GNAS 変異解析

両親の末梢血リンパ球を用いて片親型ダイソミーの由来を検索し、患児における GNAS 変異頻度を複数の臓器・組織で検索する。遺伝子変異解析はサンガー法にてを行う。

4. 研究成果

GS と非 GS の SHH 群髄芽腫で免疫染色 (PTCH1・Gli1/2・YAP1・Phospho-PKA substrate・GAB1、Filamin A) と Ion Ampliseq による網羅的遺伝子解析を施行したが、明らかな差異は見い出せなかった。

次に症例毎に詳細な解析を行った。症例 1 (PTCH1 の Germline 変異を有す症例) では、腫瘍組織において末梢血で変異が見られた PTCH1 の対立アレルの LOH を確認し、網羅的遺伝子解析でも同部位の変異を確認した。さらに、染色体検査や aCGH 解析にて複数のマーカー染色体や double minute を認め、FISH 法にて MYCN の増幅が確認された。PTCH1 の 2 ヒットによって腫瘍化し、Chromothripsis (染色体破砕) を契機に MYCN 増幅によって腫瘍細胞の異形成や播種、治療抵抗性獲得に繋がったと推察された。

症例 2 (GS の診断基準を満たしたが、SHH 系 Germline 変異は同定されない症例) は腫瘍細胞においても SHH 関連遺伝子変異は認めなかった。本症例は異所性骨化部位があり、臨床的には Progressive Osseous Heteroplasia (POH) と診断される。骨異形成関連遺伝子の探索の一環で GNAS の機能喪失型変異 Ins T (chr20:58,909,386) を見出した。腫瘍細胞においても同様の GNAS 変異と同部位の LOH を確認し、正常組織では体細胞モザイクであることを証明した。GNAS は Gs を介し SHH シグナルの調整も担っていることから、本症例は PTCH1 などの SHH 上流分子には依存せずに恒常的に Gli1/2 を亢進し GS としての表現型を呈したことが推察された。さらに両親の末梢血も合わせて解析し、GNAS 変異は母由来の片親性ダイソミー (UPD) であることが証明された。本来 POH は父親由来 UPD であると言われていたが、本症例は母由来であった。また、臓器・組織レベルでの GNAS 変異の頻度を解析したところ、髄芽腫・皮膚・末梢血リンパ球 (3 歳時) では高頻度の変異、心臓線維腫では低頻度の変異、骨髄血・口腔粘膜・胸腺組織では変異を認めなかった。したがって、本症例は GNAS における母親由来 UPD の体細胞モザイク変異によって、POH だけでなく、GS の表現型を呈したことが示唆された。

これらの解析を通して、SHH 群髄芽腫の新規治療標的として SHH シグナル以外に MYCN や G 蛋白関連シグナルなどが候補になりうる可能性が示唆された。

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 5 件)

1. Yamaoka M, Akiyama M, Oyama W, Tachimoto H, Matsumoto K. Acute lymphoblastic leukemia with hypereosinophilia in a 3-year-old boy. *Pediatr Int.* 60(1):88-90, 2018
2. Yamaoka M, Akiyama M, Ohyama W, Yokoi K, Ida H, Kawashima H, Ito M. Cytokine and pathological analysis of hepatic variant graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in a child. *Journal of Hematopoietic Cell Transplantation.* 5(1):22-26, 2016
3. Yokoi K, Yamaoka M, Miyata I, Nonaka Y, Yuza Y, Kawata S, Akiyama M, Yanagisawa T, Ida H. *Pediatr Int* 2016; 58: 923-926.
4. Akiyama M, Yamaoka M, Mikami-Terao Y,

Yokoi K, Inoue T, Hiramatsu T, Ashizuka S, Yoshizawa J, Katagi H, Ikegami M, Ida H, Nakazawa A, Okita H, Matsumoto K. Paraneoplastic Syndrome of Angiomatoid Fibrous Histiocytoma May Be Caused by EWSR1-CREB1 Fusion-induced Excessive Interleukin-6 Production. *J Pediatr Hematol Oncol.* 37(7):554-9, 2015

5. Akiyama M, Yamaoka M, Mikami-Terao Y, Ohyama W, Yokoi K, Takita J, Suzuki H, Yamada H. Somatic mosaic mutations of IDH1 and NPM1 associated with cup-like acute myeloid leukemia in a patient with Maffucci syndrome. *Int J Hematol.* 102(6):723-8, 2015

[学会発表] (計 10 件)

1. 山岡正慶、本多隆也、横井健太郎、野中雄一郎、秋山政晴、鈴木智成、西川亮、柳澤隆昭 . 再発中枢神経系 Germinoma に対する造血幹細胞移植併用大量化学療法 . 第 40 回造血細胞移植学会学術集会 札幌 2018 年 2 月
2. 山岡正慶、本多隆也、横井健太郎、秋山政晴、野中雄一郎、赤崎安晴、柳澤隆昭 . 小児・若年成人発症視床神経膠腫の臨床病理学的検討 . 第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会 高松 2017 年 11 月
3. 山岡正慶、本多隆也、横井健太郎、野中雄一郎、秋山政晴、柳澤隆昭 . Survival and functional outcome of childhood intramedullary spinal cord low grade gliomas initially treated chemotherapy: A successful management . 第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会 松山 2017 年 11 月
4. 山岡正慶、本多隆也、横井健太郎、野中雄一郎、秋山政晴、柳澤隆昭 . 眼球突出を主訴に診断に至った小児腫瘍性疾患 11 例 . 第 35 回日本眼腫瘍学会総会 東京 2017 年 9 月
5. 山岡正慶、大山亘、横井健太郎、秋山政晴、野中雄一郎、鈴木智成、西川亮、柳澤隆昭 . 初期治療として化学療法を施行した小児脊髄低悪性度神経膠腫 7 例 . 第 12 回関東小児脳腫瘍カンファレンス 東京 2017 年 2 月
6. 山岡正慶、柳澤隆昭、大山亘、横井健太郎、秋山政晴、野中雄一郎、井田博幸 . 胎児エコーで診断された先天性脳腫瘍 6 例の検討 . 第 119 回日本小児科学会学術集会 札幌 2016 年 5 月

7. 山岡正慶、森琢磨、伊藤怜司、飯島正紀、平野大志、井田博幸．当院 PICU における小児重症管理の現状と課題．第 43 回日本集中治療医学会学術集会 神戸 2016 年 2 月
8. 山岡正慶、大山亘、横井健太郎、秋山政晴、野中雄一郎、福岡講平、鈴木智成、西川亮、柳澤隆昭．再発頭蓋内胚細胞腫瘍に対する大量化学療法．第 33 回日本脳腫瘍学学術集会 京都 2015 年 12 月
9. 山岡正慶、大山亘、横井健太郎、日暮憲道、菊池健二郎、野中雄一郎、柳澤隆昭、秋山政晴．エペロリムスが奏効した結節性硬化症の乳児例．第 57 回日本小児血液がん学会学術集会、甲府、2015 年 11 月
10. 山岡正慶、柳澤隆昭、福岡講平、鈴木智成、秋山政晴、増本愛、野中雄一郎、西川亮、柳澤隆昭、敷島敬悟．化学療法中に広範な髄液播種をきたした視神経腫瘍の 1 例．第 33 回日本眼腫瘍学会 松江 2015 年 10 月

()
 研究者番号：
 (3) 連携研究者 ()
 研究者番号：
 (4) 研究協力者 ()

〔図書〕(計 0 件)

〔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

山岡正慶 (Yamaoka, Masayoshi)
 東京慈恵会医科大学医学部 助教
 研究者番号：70614874

(2) 研究分担者