

## 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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659491

研究課題名(和文) 先端的ゲノミクスによる先天異常症の腫瘍と発達障害に關与する分子病態の統合的解析

研究課題名(英文) Integrated analysis for pathogenesis of congenital disorders with cancers and developmental delay using innovative genomics

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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：広汎性発達障害と神経芽腫を併発した患児(症例1)および重度の精神発達障害を合併した横紋筋肉腫の患児(症例2)の初発、再発の腫瘍検体を用いてexome解析を行った。症例1では、初発、再発腫瘍で共通する変異はALKの1174ミスセンス変異のみであった。germline変異としては、家族性ミオクローヌステんかんの原因遺伝子と考えられるCSMD2の変異が検出された。症例2では、germline変異として、神経発達や発ガンに關与するCNTN6が含まれていた。以上の結果より、CSMD2およびCNTN6の異常は、自験例において発達障害と腫瘍発生の双方に關与する標的分子の一つである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed exome sequencing of 2 mental retardation cases with solid tumors. Case 1 was a 4 year-old boy who developed neuroblastoma and suffered from intellectual disorder. Case 2 was 7 year-old boy with rhabdomyosarcoma. He suffered from developmental disorder and had minor anomalies. We sequenced exome of primary and relapsed tumors of both patients and normal sample of each. ALK mutation was shared in primary and relapsed tumor samples of Case 1, whereas no shared mutation was detected in Case 2. A novel germline mutations of CSMD2, which is one of target genes of familial myoclonus was detected in Case 1. Interestingly, deletion of CSMD2 was observed in both primary and relapsed tumors of Case 1. In addition, a novel germline mutation of CNTN6 was found in Case 2, which is thought to be involved in the neural development and tumorigenesis of ovarian cancer. Our results suggests CSMD2 and CNTN6 are involved in the common pathways of development delay and tumorigenesis.

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：エクソーム CSMD2 CNTN6 Exome

## 1. 研究当初の背景

(1) 発達障害を伴う Noonan 症候群や Costello 症候群などいわゆる RAS/MAPK 症候群に加えて、Sotos 症候群などの過成長症候群および色素性乾皮症などの DNA 修復障害はいずれも、悪性腫瘍を高率に合併する。近年の分子生物学的手法の急速な進歩に伴い、これらの先天奇形症候群の原因遺伝子として、RAS、PTPN11、NSD1 および XPA など細胞増殖シグナルや DNA の修復に関与する分子が次々と単離された。すなわち、これらの分子の生理機能の破綻は造腫瘍性のみならず、中枢神経系の発達にも影響を与えていることが明らかとなり、発達障害と腫瘍発生の分子病態には共通の分子基盤が存在することが推測されている。しかし、発達障害と腫瘍発生の双方に関する pathway は十分に解明されていない。

一方、自閉症や知的障害などを含む発達障害は現代社会において、国内外で増加傾向にあり、その病態解明の研究は急速な勢いで進められている。近年、発達障害の動物モデルが相次いで開発され、行動薬理学の研究は進められているものの、ヒトの発達障害の発症分子機構に基づいた本質的な薬物治療の開発に関する研究は、未だ発展途上であり、経験的な対症療法のみが行われているのが現状である。

(2) 申請者らはこれまでに、高密度 SNP アレイ、次世代シーケンサーなど革新的なゲノム解析技術を駆使して、神経芽腫、悪性リンパ腫など悪性腫瘍の標的分子を明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、マイクロアレイ、次世代シーケンサーとスーパーコンピューターといった革新的技術を駆使して、発達障害と腫瘍発生の双方に関する分子病態を解明し、腫瘍のみならず発達障害も視野に入れた新規薬物治療開発のための分子基盤を構築する。

具体的には発達障害と腫瘍を合併する患者の腫瘍と正常検体を用いて、マイクロアレイ、次世代シーケンサーとスーパーコンピューター解析パイプラインによる包括的ゲノム・エピゲノム解析を展開する。解析試料は東大小児科および関連施設ですでに収集済みの 10 例を予定している。

## 3. 研究の方法

### (1) 次世代シーケンサーによるエクソーム解析

現在の研究環境においては Illumina 社 HiSeq2000 三基、MiSeq 一基が稼働中であるが、さらに研究協力者である京都大学小川教授の研究室保有の HiSeq2000 二基と連携することにより、H26 年 12 月までに HiSeq2000 5 基によるリシーケンス能力が確保される。

国際的な競争を視野に入れ、迅速かつ効率的に責任遺伝子同定を同定するという観点から、研究の第一段階においては、全エクソン領域に焦点をあてて H26 年度 12 月までに全試料の全エクソンのリシーケンスの完了を目指す。家族歴が濃厚な遺伝性疾患については罹患患者とともに解析可能な非罹患家系メンバーが同時に解析される。

### (2) SNP アレイによるコピー数の解析

エクソーム解析により原因遺伝子が同定されなかった試料に関して、ゲノムの大きな欠失や増幅などの異常を想定して、Affymetrix 社 GeneChip500K アレイ (CNAG/AsCNAR 解析アルゴリズム) を用いて、網羅的ゲノムコピー数の解析を行う。

### (3) リシーケンスデータの解析

シーケンスデータは HGC (Human Genome Center: 東大医科研) のスーパーコンピュータ (6000 コア 75 TFLOPS、高速ファイルシステム Lustre 上の 1PB ストレージ) 上で稼働中の専用パイプラインで解析する。HGC で開発した SNV コールや CNV のアプリケーションを利用して円滑・高精度に候補を抽出する。HiSeq2000 で取得される生データからの fastq ファイルの生成は、1.5 日以内に行える。これを用いて、5 基の HiSeq2000 のフル稼働データに対応する。

## 4. 研究成果

### (1) 広汎性発達障害に合併した神経芽腫症例の解析

24 年度は、広汎性発達障害と神経芽腫を併発した患児の初発、再発の腫瘍検体および正常検体を用いて、HiSeq2000 による exome 解析を行った。症例は 4 歳男児。3 歳ころから言葉の遅れを指摘されており、広汎性発達障害と診断された。4 歳時に右副腎原発の神経芽腫 (stage 4) を発症し、寛解を得たものの、2 年 10 か月後に頸部リンパ節の単独再発を来している。

exome解析の結果、腫瘍細胞に特異的なアミノ酸置換の変化を伴うsomatic変異は初発検体で5個、再発検体で32個検出された。初発、再発腫瘍で共通する変異はALKの1174ミスセンス変異のみであった。ALKは神経芽腫の標的分子の一つであることから、この変異がドライバー変異であり、他の変異の多くはパッセンジャー変異である可能性が示唆された。germline変異としては、SNPのデータベースに登録のない、かつアミノ酸置換の変化を伴うものとしては300個程度検出された。この中には、家族性のミオクロヌステんかんの原因遺伝子と考えられるCSMD2遺伝子のミスセンス変異が含まれていた。CSMD2は胎児脳や中枢神経系で高発現している膜貫通蛋白であるが、機能に関しては十分に解明されていない。うつ病や他の精神疾患との関連性も報告されている。またCSMD2は肺がんや食道がんで発現が低いこと、また膵臓がんでは異常なメチル化を生じていることが報告されている。興味深いことに、この遺伝子は神経芽腫で高頻度に欠失している1p34領域に存在するが、本症例の腫瘍でもこの領域の欠失が確認されている。以上の結果より、CSMD2の異常は、本症例において発達障害と腫瘍発生の双方に關与する標的分子の一つである可能性が示唆された。

## (2) 先天奇形症候群に合併した横紋筋肉腫の解析

平成25年度は、重度の精神発達障害を合併した横紋筋肉腫の患児(症例2)の初発、再発の腫瘍検体を用いて、HiSeq2000によるexome解析を行った。症例は7歳男児。出生後より小頭症、発達遅延が指摘されており、生後10か月時に膀胱原発の横紋筋肉腫を発症した。外科治療と化学療法により寛解に至ったが、7歳児に外耳に再発した。また同時に頭蓋内に髄芽腫を発症した。腫瘍細胞に特異的なアミノ酸置換の変化を伴うsomatic変異は初発検体で9個、再発検体で24個検出された。初発、再発腫瘍で共通するドライバー変異は確認されなかった。本症例特異的なgermline変異は約450個検出された。この中に神経発達に關与する接着分子であるCNTN6が含まれていた。この遺伝子は自閉症の発症に關与することが知られており、また卵巣がんなどではがん抑制遺伝子と考えられている。以上の結果より、CSMD2およびCNTN6の異常は、自験例に

おいて発達障害と腫瘍発生の双方に關与する標的分子の一つである可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文など

〔雑誌論文〕(計35件)

1. Tomiyama 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.* 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, Ohta S, 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, Matsuyama T, Ashida A, Igarashi T. 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, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S. 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. Sekine T, Komoda F, Miura K, Takita J, Shimadzu M, Matsuyama T, Ashida A, Igarashi T. 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.* 29:376-384. 2014 doi: 10.1093/ndt/gft394. 査読有
  8. 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
  9. Kato M, Takahashi Y, Tomizawa D, Okamoto Y, Inagaki J, Koh K, Ogawa A, Okada K, Cho Y, Takita J, Goto H, Sakamaki H, Yabe H, Kawa K, Suzuki R, Kudo K, Kato K. 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
  10. Hangai M, Watanabe K, Shiozawa R, Hiwatari M, Ida K, Takita J. A Case of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia with Unusual Multiple Bone Invasions. *Oncology Letters* (in press) 査読有
  11. Shiozawa R, Takita J, Kato M, Koh K, Ida K, Hayashi Y. The association of chemotherapy-induced leukopenia on treatment outcomes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Letters* (in press) 査読有
  12. 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
  13. Miura K, Sekine T, Takahashi K, Takita J, Harita Y, Ohki K, Park M-J, Hayashi Y, Tajima A, Ishihara M, Hisano M, Murai M, Igarashi T. Mutational analyses of the ATP6V1B1 and ATP6VOA4 genes \* in patients with primary distal renal tubular acidosis. *Nephrol Dial Transplant.* 28:2123-2130, 2013 doi: 10.1093/ndt/gft216. 査読有
  14. 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
  15. Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A, Kato M Koh K, Hanada R, Tanaka Y, Kato K, Maeda D, Fukayama M, Sanada M, Hayashi Y, Ogawa S. 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
  16. Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, Takita J, Kikuchi K, Kubota M, Yamanaka G, Shiihara T, Kumakura A, Kikuchi M, Toyoshima M, Goto T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology* 80:1571-1576, 2013 doi:

- 10.1212/WNL.0b013e31828f18d8. 査読有
17. 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
  18. 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
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. 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
  23. 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
  24. 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
- 〔学会発表〕(計 85 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. Hoshino N, Nishimura R, Seki M, Okuno Y, Shiraishi Y, Sato Y, Yoshida K, Miyano S, Hahashi Y, Iwanaka T, Ogawa S, Takita J: Identification of Somatic and Germline Mutations using Whole exome sequencing of hepatoblastoma. 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: The Genetic landscapes of rhabdomyosarcoma. The 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, September 25-28, 2013
  5. Hoshino N, Nishimura R, Seki M, Okuno Y, Shiraishi Y, Miyano S, Hahashi Y, Ogawa S, Takita J: Target capture of Epigenetic Regulation Genes By Next-generation

- Sequencing in neuroblastoma. 9th ASPR Congress, Malaysia, May 9-12, 2013
6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. Seki M, Hoshino N, Nishimura R, Okuno Y, Shiraishi Y, Yoshida K, Kato M, Koh K, Hanada R, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J: Genome-wide analysis of relapsed T cell acute lymphoblastic leukemia. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Sapporo, October 11-13, 2013
  11. Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Nagata Y, Kon A, Chiba K, Tanaka H, Ohki K, Kato M, Terui K, Park MJ, Kanazawa T, Takita J, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y: Whole-exome resequencing reveals novel pathogenetic gene mutations in pediatric AML. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Sapporo, October 11-13, 2013
  12. 滝田順子 : 小児悪性腫瘍の病因解明を目指すエクソーム解析 . 第 116 回日本小児科学術集会 , 広島 , 平成 25 年 4 月 20 日
  13. 滝田順子 : 先端的ゲノミクスによる小児固形腫瘍における治療標的の探索 . 第 59 回神奈川小児腫瘍研究会 , 横浜 , 平成 25 年 9 月 21 日
  14. 滝田順子 : 小児固形主要における治療標的の探索 . 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 , 福岡 , 平成 25 年 12 月 1 日
  15. Nishimura R, Takita J, Yoshida K, Shiraishi Y, Hoshino N, Sanada M et al. Advances Neuroblastoma Research Conference, Toront, June 18 - 21, 2012
  16. 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
  17. Nishimura R, Takita J, Yoshida K, Shiraishi Y et al.: Whole-exome sequencing of advanced neuroblastomas using next-generation sequencer. The 8<sup>th</sup> Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 17-19 , 2012, Seoul
  18. Hoshino N, Takita J, Okubo J, Nishimura R et al.: Genetic alterations of RET proto-oncogene in neuroblastoma. The 8<sup>th</sup> Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 17 -19 , 2012, Seoul
  19. 滝田順子 : 神経芽腫における標的分子の同定とその臨床応用 . 中日国交正常化 40 周年記念小児科研究会 , 平成 24 年 6 月 14 日 , 北京
- 〔図書〕(計2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