

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26293242
 研究課題名(和文) 小児固形腫瘍の転移・再発を制御するクローン進化の時空的かつ網羅的ゲノム解析

 研究課題名(英文) Comprehensive and spationtemporal genetic analyses of clonal evolution of metastatic and recurrent pediatric solid tumors

 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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性腭芽腫例から採取したマルチサンプリング検体を用いて、エクソーム解析を行った。肝転移巣検体については、計7か所の部位につき組織を採取し、それぞれのゲノム解析を行った。すべての腫瘍検体ではベータカテニンの変異と11pの片親ダイソミ (UPD)が検出されたが、初発腫瘍と転移、再発腫瘍で重複する遺伝子変異、ゲノム変異は検出されなかった。転移、再発腫瘍では、初発時のmajor cloneに新たな付加異常が加わったクローンが大半を占めていた。従って、腭芽腫の発症にはベータカテニンの変異と11pのUPDが、最も重要な異常であり、その進展には、複数の異なる付加的なイベントが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To explore recurrent gene mutations in PBL, we performed Whole exome sequencing (WES) on paired tumor-normal DNA samples from one refractory case (PBL001). Seven spatially separated tumor samples resected at 3 different time points were used for WES. All metastatic samples in a case (PBL001) showed higher frequencies of mutations (mean number = 61.2). Notably, among the 240 mutated genes, no additional genes other than CTNNB1 were recurrently altered, confirming the obvious impact of CTNNB1 mutations in PBL pathogenesis. Likewise, 11p uniparental disomy (UPD) was also detected all samples examined. Sequencing of multiple samples from PBL001 revealed intra-tumor heterogeneity within primary and metastatic sites, as well as clonal evolution with a truncal CTNNB1 mutation and 11p UPD. Importantly, a truncal CTNNB1 mutation and 11p UPD provided further evidence that a CTNNB1 mutation was likely to be virtually necessary for development and progression of PBL.

研究分野：小児固形腫瘍

キーワード：小児固形腫瘍 腭芽腫 クローン進化 カテニン

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児がんの中でもとりわけ、初発時から遠隔転移を伴う固形腫瘍、また再発を来すものは極めて難治性であり、現代の集学的治療を行っても、5年生存率は概ね30%程度である。従って、遠隔転移・再発例に特化した新たな治療戦略が必要と考えられるが、そのような新規治療法を裏打ちする小児がんの分子病態の研究は、国内外の動向をみてもその希少性から、成人がんに比べて著しく立ち遅れているのが現状である。

(2) がん組織は複数のクローンから構成される heterogeneity な集団であることが立証され、再発や転移にはその一部の細胞集団のクローン進化(クローナルエボリューション)が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、次世代シーケンサーと最新のマイクロアレイを駆使して、難治性小児腫瘍におけるがん細胞の遺伝的経時的クローン進化の機序を解明し、転移や再発を制御する標的分子の同定を試みる。さらに、これらの標的分子に対する新規分子標的療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 全 exome 解析
腫瘍の初発、再発、転移組織より、レーザーマイクロダイセクションを用いて、単一細胞を複数個抽出し、全 exome 解析を行う。シーケンズデータは連携研究協力施設である東京大学医科学研究所のスーパーコンピュータ (6000 コア 75TFLOPS、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。同研究所で開発した 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 および Miseq で取得される生

データからの fastq ファイルの生成は、HGC で開発した高並列(128 並列)プログラムにより 1.5 日以内に行える。これを用いて、640 コア程度の並列解析により 5 基の HiSeq2000、1 基の Miseq のフル稼働データに対応する。

(2) SNP アレイ解析

上記の全 exome 解析によりゲノムコピー数の定量もある程度可能であるが、精度の点では、SNP アレイの方が格段に上回る。また、全例、全ゲノム解析を行うのは時間、コストの面からも現実的とは言えない。そこで、ゲノムコピー数の変化を解析するために、GeneChip 250K/500K、CytoScan (Affymetrix 社) とその解析アルゴリズムである CNAG/AsCNAR を用いて、腫瘍細胞に生じているゲノムコピー数の網羅的解析を行う。

4. 研究成果

(1) 難治性小児がんの新規治療標的を同定するために、次世代シーケンサー、高密度マイクロアレイといった革新的ゲノム解析技術を用いて、小児固形腫瘍の初発、転移、再発腫瘍のクローン進化を細胞レベルで経時的かつ網羅的に解析し、再発や転移を規定する分子病態の解明を試みる。本年度は、再発を繰り返す腭芽腫例の初発、転移巣、再発腫瘍から採取したマルチサンプリング検体を用いて、エクソーム解析、SNP アレイ解析を行った。肝転移巣検体については、計 7 か所の部位につき組織を採取し、それぞれのゲノム解析を行った。その結果、すべての腫瘍検体ではベータカテニンの変異と 11p の片親ダイソミ (UPD) が検出されたが、初発腫瘍と転移、再発腫瘍で重複する遺伝子変異、ゲノム変異は検出されなかった。転移、再発腫瘍では、初発時の major clone に新たな付加異常が加わったクローンが大半を占めていた。従って、腭芽腫の発症にはベータカテニンの変異と 11p の

UPD が、最も重要な異常であり、その進展には、複数の異なる付加的なイベントが関与する可能性が示唆された。転移、再発腫瘍に検出された変異の中に有意なドライバー変異は見出されなかったことから、多数の遺伝子変異の蓄積による個々の細胞の生理機能の破綻が、悪性化に関与しているメカニズムが推測された。さらにトランスクリプトーム解析、メチル化解析あるいは全ゲノム解析を行って、クローン進化の病態を解明する必要がある。

(2) 難治性小児がんの代表である神経芽腫 500 例につき、がん関連遺伝子 10 個のターゲットシーケンスと高密度 SNP アレイ解析を用いて、ゲノムプロファイリングを行った。その結果、神経芽腫は、ゲノム異常の特性により 6 つのサブグループに分類されることが判明した。これらのサブグループは臨床的特徴とよく相関し、さらに興味深いことに腫瘍の進化の過程を反映していることが明らかとなった。サブグループは以下の通りである。グループ A (ALK 異常を伴う群)、グループ B (他の遺伝子変異を伴う群)、グループ C (MYCN 増幅を伴う群)、グループ D (11q LOH を伴う群)、グループ E (少なくとも 1 か所のゲノムコピー数の変化を伴う群) およびグループ F (サイレント群)。グループ A から D は予後不良であり、グループ E、F は予後良好であった。サブグループ A から E を通じて、最も共通するゲノム異常は、17q の増加であったことから、神経芽腫の発生過程において、17q の増加は最も早期に生じる異常であることが推測できた。また、次に高頻度なゲノム異常は 2p の増加であったことから、これは 17q の増加に引き続いて生じた異常であり、その後、1p LOH および 11q LOH が排他的に独立したクローンに生じた可能性が考えられた。その後、1p LOH をもつクローンに ALK 変異と MYCN 増幅がそれぞれ別々に生じ、

異なるサブグループに分化していったものと推測された。グループ E では、hyperploid が高頻度であったことから、同時に染色体の異数分裂が生じた結果、腫瘍化したものと推測された。またグループ F におけるがん化のメカニズムには、生殖系列細胞の異常やエピゲノム異常の関与が考えられた。以上の結果より、大多数のコホートに対するゲノムのプロファイリングは、腫瘍の進化を推測する上でも有用であった。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 25 件)

1. Takagi M, Yoshida M, Nemoto Y, Tamaichi H, Tsuchida R, Seki M, Uryu K, Hoshino N, Nishii R, Miyamoto S, Saito M, Shimizu T, Hanada R, Kaneko H, Fukao T, Koyama T, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Takita J. Loss of DNA Damage Reponse in Neuroblastoma and Utility of a PARP Inhibitor. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2017)109 (11);dix062 査読有 doi:10.1093/jnci/djx062
2. Osumi T, Kato M, Ouchi-Uchiyama M, Tomizawa D, Kataoka K, Fujii Y, Seki M, Takita J et al. Blastic transformation of juvenile myelomonocytic leukemia caused by the copy number gain of oncogenic KRAS. *Pediatr Blood Cancer*. 査読有 2017 Feb 28. doi: 10.1002/psc.26496. [Epub ahead of print]
3. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, Yaguchi A, Terada K, Saito Y, Yoshimi A, Ogata-Kawata H, Sakamoto H, Kato M, Fujimura J, Hino M, Kinoshita A, Kakuda H, Kurosawa H, Kato K, Kajiwara R, Moriwaki K, Morimoto T, Nakamura K, Noguchi Y, Osumi T, Sakashita K, Takita J et al. ZNF384-related fusion genes consist of a subgroup with a characteristic immunophenotype in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 査読有 102:118-129, 2017 doi: 10.3324/haematol.2016.151035.

4. Yoshida M, Hamanoue S, Seki M, Tanaka M, Yoshida K, Goto H, Ogawa S, Takita J, Tanaka Y. Metachronous anaplastic sarcoma of the kidney and thyroid follicular carcinoma as manifestations of DICER1 abnormalities. *Hum Pathol*. 査読有 61:205-209, 2017 doi: 10.1016/j.humpath.2016.06.024.
5. Kato M, Ishimaru S, Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Kakiuchi N, Sato Y, Ueno H, Tanaka H, Inukai T, Tomizawa D, Hasegawa D, Osumi T, Arakawa Y, Aoki T, Okuya M, Kaizu K, Kato K, Taneyama Y, Goto H, Taki T, Takagi M, Sanada M, Koh K, Takita J et al. Long-term outcome of six-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia*. 査読有 31:580-584, 2016 doi: 10.1038/leu.2016.274.
6. Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Yamato G, Hara Y, Nagata Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Kato M, Park MJ, Ohki K, Shimada A, Takita J et al. Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 査読有 175:476-489, 2016 doi: 10.1111/bjh.14247.
7. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, Hayakawa F, Kojima S, Ueno T, Imoto N, Kohsaka S, Kunita A, Doi K, Sakura T, Yujiri T, Kondo E, Fujimaki K, Ueda Y, Aoyama Y, Ohtake S, Takita J et al. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nat Genet*. 査読有 48:569-74, 2016 doi:10.1038/ng.3535.
8. Muraoka M, Okuma, C, Kanamitsu K, Ishida H, Kanazawa Y, Washino K, Seki M, Kato M, Takita J et al. Adults with germline CBL mutation complicated with juvenile myelomonocytic leukemia at infancy. *J Hum Genet*. 査読有 61:523-6, 2016 doi: 10.1038/jhg.2016.8
9. Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda Z, Tanaka K, Sata M, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J, Honda H. ALKR1275Q perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion, and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. *Oncogene*. 査読有 25:4447-58, 2016 doi: 10.1038/onc.2015.519.
10. Kato K, Oh Y, Takita J, Gunji Y et al. Molecular genetic and cytogenetic analysis of a primary cutaneous CD8-positive aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma. *Int J Hematol*. 査読有 103:196-201, 2016 doi: 10.1007/s12185-015-1895-9.
11. Kato M, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Oyama R, Arakawa Y, Kishimoto H, Taki T, Akiyama M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Mitsuiki N, Kajiwara M, Mizutani S, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Koh K, Takita J. Genomic analysis of clonal origin of Langerhans cell histiocytosis following acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 査読有 175:169-72, 2016 doi: 10.1111/bjh.13841.
12. Akiyama M, Yamaoka M, Mikami-Terao Y, Ohyama W, Yokoi K, Arakawa Y, 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*. 査読有 102:723-82, 2015 doi: 10.1007/s12185-015-1892-z.
13. Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraishi Y, Sato Y, Kato M, Chiba K, Tanaka H, Hoshino N, Nagae G, Shiozawa Y, Okuno Y, Hosoi H, Tanaka Y, Okita H, Miyachi M, Souzaki R, Taguchi T, Koh K, Hanada R, Kato K, Nomura Y, Akiyama M, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat. Commun*. 査読

- 有 3;6:7557, 2015 doi:
10.1038/ncomms8557.
14. Kato M, Ishida H, Koh K, Inagaki J, Kato K, Goto H, Kaneko T, Cho Y, Hashii Y, Kurosawa H, Takita J et al. Comparison of chemotherapeutic agents as a myeloablative conditioning with TBI for pediatric ALL: a study from the pediatric ALL working group of the JSHCT. *Pediatr Blood Cancer*. 査読有 62:1844-50, 2015 doi: 10.1038/ncomms8557.
 15. Kawasaki Y, Makimoto M, Nomura K, Hoshino A, Hamashima T, Hiwatari M, Nakazawa A, Takita J, Yoshida T, Kanegane H. Neonatal acute megakaryoblastic leukemia mimicking congenital neuroblastoma. *Clin Case Rep*. 査読有 3:145-9, 2015 doi: 10.1002/ccr3.183
 16. Lambertz I, Kumps C, Claeys S, Lindner S, Beckers A, Janssens E, Carter DR, Cazes A, Cheung BB, De Mariano M, De Bondt A, De Brouwer S, Delattre O, Gibbons J, Janoueix-Lerosey I, Laureys G, Liang C, Marshall GM, Porcu M, Takita J et al. Upregulation of MAPK negative feedback regulators and RET in mutant ALK neuroblastoma: implications for targeted treatment. *Clin Cancer Res*. 査読有 21:3327-39, 2015 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2024.
 17. Hoshino A, Nomura K, Hamashima T, Isobe T, Seki M, Hiwatari M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Kanegane H. Aggressive transformation of anaplastic large cell lymphoma with increased number of ALK-translocated chromosomes. *Int J Hematol*. 査読有 101:198-202, 2015 doi: 10.1007/s12185-014-1701-0.
 18. Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for infant acute lymphoblastic leukaemia with KMT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the paediatric acute lymphoblastic leukaemia working group of the Japan Society for Haematopoietic Cell Transplantation. *Br J Haematol*. 査読有 168:564-70, 2015 doi: 10.1111/bjh.13174.
 19. Koh K, Tomizawa D, Moriya Saito A, Watanabe T, Miyamura T, Hirayama M, Takahashi Y, Ogawa A, Kato K, Sugita K, Sato T, Deguchi T, Hayashi Y, Takita J et al. Early use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with MLL gene-rearrangement-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 査読有 29:290-6, 2015 doi: 10.1038/leu.2014.172.
 20. Kawashima-Goto S, Imamura T, Seki M, Kato M, Yoshida K, Sugimoto A, Kaneda D, Fujiki A, Miyachi M, Nakatani T, Osone S, Ishida H, Taki T, Takita J et al. Identification of a homozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapsed early T-cell precursor ALL patient. *Int J Hematol*. 査読有 101:411-6, 2015 doi: 10.1007/s12185-014-1711-y.
 21. Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J et al. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res*. 査読有 74:3790-801, 2014 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0241.
 22. 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*. 査読有 74:2742-9, 2014 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2470.
 23. Takita J, Chen Y, Kato M, Ohki K, Sato Y, Ohta S, Sugita K, Nishimura R, Hoshino N, Seki M, Sanada M, Oka A,

- Hayashi Y, Ogawa S. Genome-wide approach to identify second gene targets for malignant rhabdoid tumors using high-density oligonucleotide microarrays. *Cancer Sci.* 査読有 105:258-64, 2014 doi: 10.1111/cas.12352.
24. Kato M, Shiozawa R, Koh K, Nagatoshi Y, Takita J et al. The effect of the order of total body irradiation and chemotherapy on graft-versus-host disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 査読有 36:e9-12, 2014 doi: 10.1097/MPH.0b013e318279e81c.
25. 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.* 査読有 36:166-8, 2014 doi: 10.1097/MPH.0b013e318290c686.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 滝田順子: 小児固形腫瘍における統合的ゲノム・エピゲノム解析. 第807回千葉がんセンター研究所集団会, 千葉がんセンター(千葉), 2016年2月24日
2. 滝田順子: 統合的ゲノム解析に立脚した小児がんの克服 ~ゲノム研究の先に目指すもの~. 第34回京都大学小児血液腫瘍研究会, 京都大学(京都), 2016年2月27日
3. Takita J: Major Symposium, Characteristics of ALK-related pediatric cancers. AACR2016, New Orleans, U.S.A., April 16-20, 2016
4. 滝田順子: 小児固形腫瘍の分子病態の解明. 第22回北愛媛小児血液・悪性腫瘍研究会, 愛媛大学(愛媛), 2016年6月17日
5. Takita J: Genetic and epigenetic alterations in childhood leukemia.

The 5th JCA-AACR Special Joint Conference, Maihama (Chiba), July 14, 2016

6. Takita J: Integrated Genetic Analysis of Pediatric T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. The 5th JCA-AACR Special Joint Conference, Maihama (Chiba), July 15, 2016
7. 滝田順子: 小児固形腫瘍のゲノム・エピゲノム異常. 臨床遺伝子学セミナー, 家の光会館コンベンションホール(東京), 2016年8月21日
8. 滝田順子: 小児固形腫瘍の治療と分子病態の解明. 2016年小児血液・がんセミナー in 関西, 新大阪丸ビル(大阪), 2016年9月25日
9. Takita J: Genetic and epigenetic alterations of pediatric leukemia and application. 日本血液学会, パシフィコ横浜(横浜), 2016年10月15日
10. 滝田順子: ALK関連小児固形腫瘍の遺伝的特性. 第一回日本肉腫学会, 京都平安ホテル(京都), 2016年12月2日

〔図書〕(計 1 件)

滝田順子: 神経芽腫. 小児科診療ガイドライン - 最後の診療指針 第3版 pp358-361, 総合医学社, 東京, 2016

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 (平成 27 年度まで)

加藤 元博 (KATO, Motohiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 40708690

(2) 研究分担者

安戸 裕貴 (YASUDO, Hiroki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 70422285