

ラジオNIKKEI ■放送 毎週水曜日 21:00~21:15

小児科診療 UP-to-DATE

2015年9月30日放送

小児悪性腫瘍の原因究明の進歩

東京大学大学院 小児科
准教授 滝田 順子

はじめに

一般的に悪性腫瘍の病態には後天的に獲得されたゲノム異常、すなわち somatic mutation の積み重ねが中心的な役割を果たしていると考えられてきました。従って、従来の小児悪性腫瘍の病態解明を目指したゲノム解析では、この新たに生じた特異的な獲得性の変異を検出する戦略が主として行われてきました。しかし近年の革新的なゲノム解析技術の進歩により、somatic mutation のみならず個体の全体を形作る生殖細胞系列のゲノム変異やゲノム異常を伴わずに遺伝子発現を調節するエピゲノム制御の破綻も、悪性腫瘍の病態に重要な役割を果たすことが明らかになってきました。つまり、悪性腫瘍の病態を理解するためには、先天のおよび後天的なゲノム異常に加えて、エピゲノムの情報を加味した複雑な全体像を把握することが重要であると考えられます。小児悪性腫瘍の原因究明の研究においても、次世代シーケンサーやアレイ解析など革新的なゲノム解析技術を駆使した全体図の解明が主流になりつつあります。そこで、私たちは小児悪性腫瘍の中でも難治性腫瘍の代表である横紋筋肉腫に関する統合的ゲノム解析を行い、分子病態の全体像を明らかにしましたので、ご紹介させていただきます。

横紋筋肉腫とは

横紋筋肉腫は筋肉になるもとの細胞から発生する悪性腫瘍です。筋肉、脂肪組織などから発生する小児軟部腫瘍の中では最も高頻度に発生します。手術、放射線や薬物治療などを組み合わせた集学的治療により全体として約70%の治癒が期待できますが、遠隔転移を伴う例は、集学的治療

を行っても 50%未満の治癒率です。また救命された例では、化学療法の副作用による不妊や、手術によって臓器の機能が損なわれてしまう臓器機能障害など治療後に発生する障害、いわゆる晩期障害が大きな問題となっています。従って、現在の治療は、将来のある小児の患者さんにとって十分であるとは言えません。予後の悪い群に対する新規治療法の開発や、精度の高い予後予測に基づいた治療の軽減は重要な課題です。そのためには、横紋筋肉腫の発症や進展にはどのような分子機構が関わっているかを解明する必要があります。

横紋筋肉腫は組織型として胎児型と胞巣型に大別されます。胞巣型の約 70%に *PAX3/7-FOXO1* 融合遺伝子が検出されますが、胎児型の原因となる遺伝子異常はよく分かっていませんでした。また近年、次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析により、横紋筋肉腫において *FGFR4* 経路の異常が報告されましたが、これらの異常が認められない例も多く存在し、遺伝子異常の全貌は解明されていませんでした。一方、腫瘍発生にはエピゲノム異常も重要であると考えられていますが、横紋筋肉腫におけるエピゲノム異常は、ほとんど研究されていませんでした。

横紋筋肉腫(Rhabdomyosarcoma)

- *横紋筋肉腫 (RMS) は小児軟部腫瘍の中で最も頻度が高い
- *病理組織学的には、胎児型 (ERMS) と胞巣型 (ARMS) の2つに大きく分けられ、胞巣型は予後不良である
- *現在のところ、胞巣型で *PAX3/7* と *FOXO1* の転座が高頻度に認められる以外、発症分子機構、標的分子は同定されていない
- *エピゲノム異常に関しても、明らかにされていない

(Crist W M et al. JCO 2001)

横紋筋肉腫は組織型として胎児型と胞巣型に大別されます。胞巣型の約 70%に *PAX3/7-FOXO1* 融合遺伝子が検出されますが、胎児型の原因となる遺伝子異常はよく分かっていませんでした。また近年、次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析により、横紋筋肉腫において *FGFR4* 経路の異常が報告されましたが、これらの異常が認められない例も多く存在し、遺伝子異常の全貌は解明されていませんでした。一方、腫瘍発生にはエピゲノム異常も重要であると考えられていますが、横紋筋肉腫におけるエピゲノム異常は、ほとんど研究されていませんでした。

統合的ゲノム解析

そこで私たちは、網羅的な遺伝子異常解析とエピゲノム異常を同定する DNA メチル化アレイ解析を行い、横紋筋肉腫におけるゲノム・エピゲノム異常の全体像を解明しました。本解析は、横紋筋肉腫の大規模検体を用いた統合的ゲノム・エピゲノム解析としては世界で初めてのものになります。

まず、横紋筋肉腫計 60 例の新鮮腫瘍から DNA を採取し、16 例について全エクソン領域を解読しました。検出された重複する腫瘍特有の変異に関して、全 60 例について次世代シーケンサーを用いた変異解析を行いました。また 50 例において DNA メチル化アレイ解析を行いました。クラスタリングという手法を用いて DNA メチル化のパターンによるサブグループ分類を試みました。さらに全例につき SNP アレイによるゲノムコピー数の解析も行いました。

ここで、解析方法に関する用語を解説します。次世代シーケンサーとは、大量同時並列シーケンサーと

横紋筋肉腫における網羅的メチル化解析

- Unsupervised hierarchical clusteringを施行
- Sampleは、概ね組織型に一致して2つに分かれ、さらにそれぞれ2つに分かれる。
- ERMSが多いものをCluster E
- ARMSが多いものをCluster Aと定義する
- さらに分かれるそれぞれのclusterをE1とE2、A1とA2と定義する

(Seki et al. Nat Commun 2015より改変)

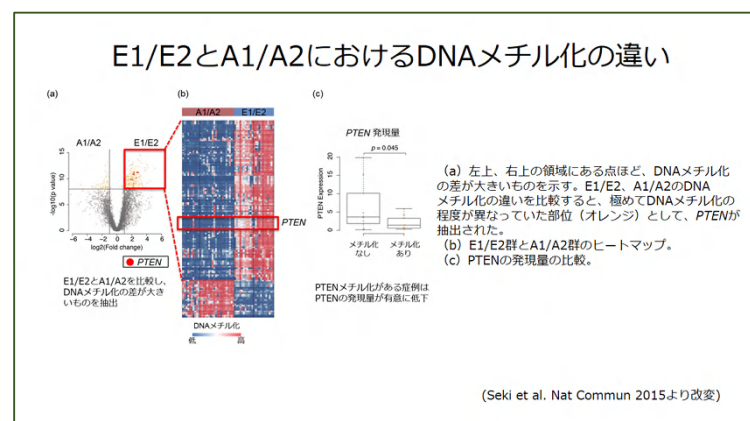
も呼ばれ、従来の手法と比較し極めて高速に DNA の塩基配列を読むことが可能な装置です。次世代シーケンサーを用いれば、わずか 1 週間以内でヒト全ゲノムの解読が可能です。DNA メチル化アレイとは、DNA メチル化を網羅的に解析することができるマイクロアレイとよばれる微小なチップです。一度にゲノム上の最大 45 万か所について DNA メチル化の有無について評価が可能です。SNP アレイとは、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism) のタイピング用に開発されたチップですが、シグナル強度を比較することによって腫瘍に生じているゲノムのコピー数の解析を行うことができます。

これらの手法を用いた解析の結果、横紋筋肉腫は DNA メチル化パターンにより 4 群に分類されることが判明し、得られたゲノム異常と生存期間などの臨床情報を比較することにより、4 群の特徴として以下の 4 点を明らかにしました。

- (1) 4 つの群は病理組織分類である胎児型と胞巣型と関連しており、胎児型が含まれる群を E1 と E2、胞巣型が含まれる群を A1 と A2 と名付けました。
- (2) E1/E2 群において *FGFR4/PIK3CA* 経路に含まれる *PTEN* 遺伝子の高い DNA メチル化が認められました。
- (3) *FGFR4/PIK3CA* 経路の異常は、E2 群に有意に高頻度でした。
- (4) E1 に比べ E2 は有意に予後不良であり、胞巣型に比べ予後は比較的良好とされる胎児型において予後不良な一群を抽出することができました。

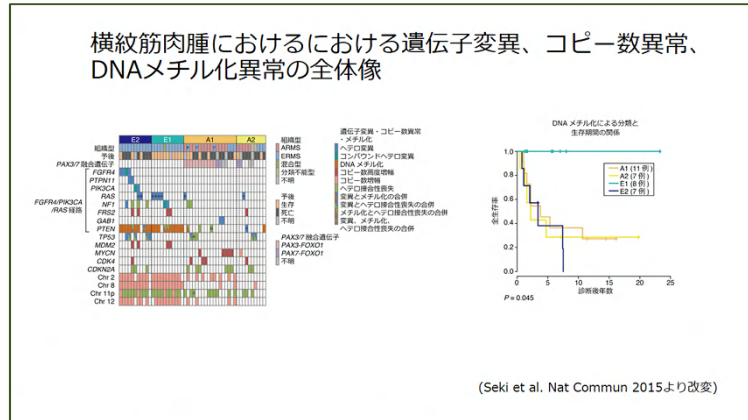
E1/E2 群の 91% で *PTEN* に高い DNA メチル化が生じていることがわかりましたが、これは同時に、これまで明らかにされていなかった胎児型横紋筋肉腫のエピジェネティックな特徴と言えます。一般にある遺伝子の特定の領域に高い DNA メチル化が生じると、その遺伝子の発現が抑制されますが、今回の検討でも *PTEN* 高メチル化を認めたグループでは *PTEN* の発現低下が確認されました。*PTEN* はがん抑制遺伝子として機能している遺伝子であり、細胞増殖に関連する *PIK3CA* を抑制する機能を持ちます。そのため *PTEN* の DNA メチル化により *PIK3CA* の活性化が生じ、それが胎児型横紋筋肉腫の発症に関与している可能性が示唆されました。

また *FGFR4/PIK3CA* 経路における遺伝子変異は E2 群の 64% にみられ、この群のみに集中していることがわかりました。がん抑制遺伝子である *TP53* の変異も E2 群に高頻度でした。さらに生存期間との検討を行うと、興味深いことに E1 群の予後は極めて良好で死亡例は認め



られなかったのに対して、E2 群の予後は不良で有意に生存期間の短縮が認められました。これまで一つの群として捉えられていた胎児型横紋筋肉腫を DNA メチル化のパターンにより予後の異なる 2 群に分類し、遺伝子異常の特性を明らかにしたことは、治療を行う上でも非常に有用です。

予後の悪い E2 群では FGFR4/PIK3CA 阻害剤を用いた新たな治療戦略の可能性が示され、また予後が極めて良好な E1 群に対しては治療軽減の試みの足がかりが示されました。



おわりに

本研究によって横紋筋肉腫のゲノム・エピゲノムの全体像が明らかとなり、横紋筋肉腫の分子病態の理解に大きな進展をもたらしました。この成果は、DNA メチル化情報が横紋筋肉腫における新たな予後予測のバイオマーカーとなりうることを示したもので、これをもとに新たな分子診断法の提唱が可能となりました。この精度の高い新規分子診断は横紋筋肉腫の患者さんの治療の最適化に貢献し、予後を改善するのみならず QOL の向上にもつながるものと期待されます。

革新的なゲノム・エピゲノム解析技術の進歩により小児悪性腫瘍の分子病態の理解は急速に進み、ゲノムとエピゲノムの両者の情報を分子病態の観点から統合的に把握することで、より効率的なテーラーメイド医療の実現が可能となるものと期待されます。

「小児科診療 UP-to-DATE」

<http://medical.radionikkei.jp/uptodate/>