

論文内容の要旨

論文題目 先端的解析技術を用いた横紋筋肉腫における標的分子の探索

氏名 西村 力

要旨

横紋筋肉腫は小児悪性軟部腫瘍の中では最も頻度が高く、病理組織学的に胞巣型と胎児型に大きく分類される。年少児、泌尿頭頸部に多く、比較的予後良好な胎児型に比べ、胞巣型は年長児、四肢に好発し、遠隔転移を伴いやすく予後不良であり、両者はそれぞれ特徴的な臨床像を示す。現在知られている遺伝学的特徴は、胞巣型における横紋筋肉腫特異的転座である *PAX3/7-FOXO1* や、胎児型優位に認められる 11p15.5 のヘテロ接合性の消失 (LOH : loss of heterozygosity)、2、8、12 番染色体の増幅、胞巣型優位の *CDK4*、*MYCN*、*GPC5/mir-17-92* の高度増幅、転座を構成する *PAX3/7* と *FOXO1* の同時高度増幅などが報告されている。しかしこの 2 つのサブグループの分子病態の違いはいまだ十分に解明されておらず、治療に結びつくような分子標的もほとんど見つかっていない。そこで本研究では横紋筋肉腫 49 例を用いた SNP アレイ解析と 15 例を用いたエクソーム解析により、それぞれ LOH 領域を含むゲノムコピー数プロファイルと遺伝子変異から新規の標的分子の探索を試み、このうち胞巣型 3 例では、初発・再発または転移巣での比較も行い、再発・転移に関わる因子やクローンの進化についても検討した。

SNP アレイにおいて、2、8、12 番染色体の増幅は胎児型では胞巣型に比べ有意に多く、両者は異なるゲノムプロファイルを示した。一方、全体的なアレール不均衡のパターンは両者に明らかな差はなく、11 番染色体の LOH は胞巣型でも胎児型と同等に高率に認められた。今回解析した細胞株 8 株中 7 株は高度の多倍体の上に多数の構造異常を伴っており、新鮮腫瘍とは異なる特徴を示した。これは細胞株化前後の検体で比較しても同様の傾向を認め、この結果は横紋筋肉腫では細胞株は新鮮腫瘍の代替とはならない可能性を示している。今まで胎児型では遺伝学的な予後マーカーは知られていなかったが、本研究では 13q の増幅が胎児型において予後良好群に有意に多く、新たな予後マーカーとなる可

能性が示された。今回横紋筋肉腫において新規の高度増幅領域も検出され、そのうち胞巣型 1 例と転座陽性胎児型 1 例に重複して認められたのが 13q33 の *IRS2* を含む領域だった。*IRS2* の機能ドメインの変異解析では、新鮮腫瘍には変異を認めなかったが、RT-PCR による発現解析では胞巣型で 80%、胎児型に 50%と高頻度に発現を認めた。また横紋筋肉腫において *IRS2* の高発現が予後不良因子となることも報告されている。今までに少数の脳腫瘍でも高度増幅の報告もあり、insulin-like growth factor 経路の構成要素であることから、横紋筋肉腫の一部において *IRS2* がその病態に関わっている可能性が考えられた。また分類不能型の 1 例に *NCOA2* を含む領域の高度増幅が認められた。この *NCOA2* は少数の横紋筋肉腫において *PAX3* と転座を構成することから、転座以外にも高度増幅という形で横紋筋肉腫の病態に関わる可能性が考えられた。横紋筋肉腫における *ALK* の高度増幅、高発現は今までも複数報告があり、本研究でも同様の結果が得られた。*ALK* 阻害剤は他の腫瘍では治験や臨床応用がすでに始まっており、横紋筋肉腫での効果も期待されるため、細胞株を用いて 3 種類の *ALK* 阻害剤 (TAE684, 2,4-PDD, crizotinib) の効果を検証したところ、*ALK* の発現が高い株では効果が高い傾向を認めた。

胞巣型 3 例における初発・再発もしくは転移巣のゲノムコピー数の比較では、2 例 (再発 1 例、転移 1 例) では再発・転移巣には初発時に認められたコピー数変化に新たな変化が少数加わるのみであったため、再発・転移巣の major クロームは初発時の major クロームに近いことが推測された。対照的に再発のもう 1 例では、*PAX3-FOXO1* の不均衡転座の所見のみが再発時に持ち越されており、それ以外のコピー数変化はほとんど一致しなかった。しかも初発に認められていた 11 番染色体の LOH が、再発時には検出されず、再発したクロームは初発時に比較的早期に分かれた minor クロームであることが推測された。また初発時の major クロームは治療に感受性があったが、このクロームは治療抵抗性であったとも考えられる。11p LOH は横紋筋肉腫における頻度が高く、腫瘍化に関わっていると考えられているが、再発といった腫瘍の進展には強く関わらないことが示唆された。これは、本研究における 11 番染色体の LOH が予後に相関しないという結果とも一貫している。対照的に *PAX3-FOXO1* はより早期に生じ、コピー数変化からは再発時に唯一選択されており、この転座が胞巣型横紋筋肉腫に与える影響が強力であることが推測された。

横紋筋肉腫 15 例のエクソーム解析の結果では、今までに次世代シーケンサで解析された小児腫瘍の報告と同様に、体細胞変異が少ない傾向を認めた。横紋筋肉腫に特異的な、高い頻度で変異が認められる単一遺伝子は検出されなかった。最も多く変異を認めたのは *TP53* で、germline 変異も含めて 4 例に変異が検出された。変異遺伝子が集中する経路を検索したところ、15 例中 7 例で *FGFR4-PI3K-AKT* 経路内に変異が集中することが判明した。具体的には *FGFR4* と *PTPN11* の変異が重複した 1 例、*GAB1* が 2 例、*PIK3CA* が 1 例、*PIK3CG* が 1 例、*PTEN* が 2 例で、この中には胎児型、胞巣型症例どちらも含まれており、組織型に関わらない共通経路と考えられた。横紋筋肉腫におけるこの経路内の変異の頻度を確認するため、細胞株 4 株を含む 48 検体で deep シーケンスを行ったところ、新鮮腫瘍の 26.8%に変異を認めた。またこれらの変異は、*PTPN11* 以外は全て排他的になっていた。また本研究において横紋筋肉腫における新規の変異遺伝子も複数検出された。前述の *PTEN* (2 例) は横紋筋肉腫では今まで 1 例でホモ欠失が報告されているのみで、変異は知られていなかった。*ARID1A* は近年注目を集めるエピジェネティック関連分子の一つで、SWI/SNF クロマチン再構成複合体の主要要素をコードし、さまざまな腫瘍で変異の報告がある。今回横紋筋肉腫でも胎児型 1 例、胞巣型 1 例でどちらもフレームシフト変異を認めた。変異が重複する遺伝子として、前述以外では 2

例ずつに *KRAS*、*ROBO1*、*SPON1* の変異が認められた。今までに横紋筋肉腫の少数で変異の報告のある各種 *RAS* 遺伝子、*PIK3CA*、*CTNNB1* などほぼ同様の頻度で検出された。本研究では横紋筋肉腫の体細胞変異は翻訳領域の non-silent 変異に限ると、0.54 個/Mb（例外的に変異の多い 1 症例を除外すると 0.34 個/Mb）の頻度であり、主な成人腫瘍と比べて低率であった。体細胞変異だけでなく germline 変異についても検索を行ったが、頻度の高い変異遺伝子は確認されず、最も多い 4 例で *BRAT1*、次いで 3 例に *TSC2* に germline 変異が重複した。

以上より、私は高密度 SNP アレイに CNAG/AsCNAR 解析を組み合わせることで、横紋筋肉腫の胞巢型、胎児型の LOH 領域を含めたゲノムプロファイルを明らかにし、今まで報告がなかった *IRS2* の高度増幅が少数の横紋筋肉腫において認められることを見出した。さらに高度増幅、高発現を認めることから標的候補と考えられる *ALK* の阻害剤が、一部の横紋筋肉腫に有効である可能性を示した。次世代シーケンサーによるエクソーム解析では、組織型を問わず *FGFR4-PI3K-AKT* 経路の活性化につながりうる遺伝子変異が 26.8% と比較的高頻度に認めることを示した。このように本研究の結果から、横紋筋肉腫の標的治療へ結びつく有用な情報を得ることができ、今回検証した *ALK* 阻害剤の他、今後 *FGFR4-PI3K-AKT* 経路に対する阻害剤の横紋筋肉腫への効果も検証すべきと考える。