

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 西村 力

本研究は、予後不良な小児固形腫瘍のひとつである横紋筋肉腫の新規の標的分子を探索するために、高密度 **single nucleotide polymorphism (SNP)** アレイと次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析といった先端的解析技術を用いたゲノム解析を行い、下記の結果を得ている。

1. SNP アレイ解析において、胎児型横紋筋肉腫では 2、8、12 番染色体の増幅が胞巣型横紋筋肉腫に比べ有意に多く、各組織型は異なるゲノムプロファイル示すことが判明した。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 **loss of heterozygosity (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であり、この結果から横紋筋肉腫では細胞株は新鮮腫瘍の代替とはならないことが示唆された。
2. 横紋筋肉腫における新規の反復高度増幅領域として、*IRS2* を含む 13q33 領域が胞巣型 1 例と転座陽性胎児型 1 例に認められた。*IRS2* の機能ドメインの変異解析では、細胞株 1 株に機能推定ソフトで **damaging** と推定される新規のミスセンス変異が検出され、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。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や、今までに少数の脳腫瘍でも高度増幅の報告があり、遺伝子の機能としても **insulin-like growth factor** 経路の構成要素であることから、一部の横紋筋肉腫において *IRS2* がその病態に関わっている可能性が考えられた。
3. 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を行い、再発・転移に関わる変化についても検証した。この内 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り、初発と再発・転移巣の **major** クローンは近い関係であることが推測された。対照的にもう 1 例では、*PAX3-FOXO1* の不均衡転座の所見のみが共通で、それ以外は初発・再発間でほとんど一致しなかった。特に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なかったことから、再発したクローンは初発時に比較的早期に分かれた **minor** クローンであることが推測された。また初発時の **major** クローンは治療に感受性があったが、このクローン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可能性が示された。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示唆された。

4. ゲノムコピー数と予後の解析では、13q の増幅が胎児型予後良好例において、予後不良例に比べ有意に頻度が高いことが判明し、新たな予後マーカーとなることが示唆された。
5. 胞巣型横紋筋肉腫の 1 例で *ALK* の高度増幅が検出され、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)でも胞巣型優位に 52.6%と高頻度に *ALK* の発現を認めた。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、本研究では横紋筋肉腫細胞株 6 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。*ALK* の発現が高い 2 株において感受性が認められ、一部の横紋筋肉腫では *ALK* 阻害剤が効果を示す可能性を見出した。
6. エクソーム解析では、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。*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、胎児型、胞巣型症例どちらも含まれていたため、組織型に関わらない共通経路と考えられた。これらの遺伝子についてさらに 48 検体で変異解析を行ったところ、新鮮腫瘍での変異は 26.8%と比較的頻度が高く、この経路が横紋筋肉腫の治療標的となる可能性が見出された。
7. エクソーム解析で検出された、横紋筋肉腫における新規の変異遺伝子は、前述の *GAB1* の 2 例の他、*PTEN*、*ARID1A*、*ROBO1*、*SPON1* にも各 2 例で変異を認めた。変異が重複する遺伝子としては、前述以外では *TP53* が 4 例と最多で、他 *KRAS* に 2 例で変異を認めた。今までに横紋筋肉腫で変異の報告のある各種 *RAS* 遺伝子、*PIK3CA*、*CTNNB1* などについても、ほぼ同様の頻度で変異が検出された。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、*BRAT1* が 4 例と最多で、次いで 3 例において *TSC2* に変異を認めた。
8. 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が、今までに報告のある小児腫瘍とは、体細胞変異が少ないという点で一致していた。

審査会での指摘事項としては、

1. 序論が少なく、横紋筋肉腫自体の説明や、高密度 SNP アレイ、エクソーム解析といった先端的解析技術についての説明を加える。図表も複数加える。
2. 方法の内容も簡略すぎる。同じ実験が可能なくらいの内容にする。化合物、細胞につい

でも可能な限り文献を引く。

3. インフォームドコンセントを口頭か文書かどちらで得ているか、全例取得されているか記載する。
 4. 胞巣型 3 例における初発と再発・転移の比較では、この 3 例の臨床情報、治療内容などを示すべき。クローンの進化についても、治療により加わった可能性なども記載する。サブクローンの存在の根拠となるデータも示すべきである。
 5. 標的候補として IRS2 と NCOA2 を挙げているが、どちらも頻度が 1、2 例と少なく、標的というのは過剰なので、記載を改める。
 6. エクソーム解析のグラフの **figure legend** が簡略すぎるため、詳しく記載する。
 7. 全体的に受動態での記載が目立つため、何を目的にどうしたか、自分が何を明らかにしたのかなど、必要な部分は能動態で記載する。結語を加える。
 8. 謝辞に入る指導者、検体・細胞株提供者、実験助手の方などはフルネームで、敬称は医師、博士、氏とし、所属も記載する。
 9. 引用文献が少ない。
 10. 引用文献の著者は全員記載する。
 11. 略語が多いので、略語集をつける。
 12. 初出のスペルアウトの徹底、図表の文頭を大文字にする。
- これらについて、審査会後に修正を行った。

以上、本研究は横紋筋肉腫の LOH 領域を含む詳細なゲノムコピー数プロファイルを明らかにし、胞巣型、胎児型間の有意な差を示した。横紋筋肉腫では新規である IRS2 の高度増幅を検出し、13q の増幅が新たな予後マーカーになる可能性、横紋筋肉腫における新規の標的候補として ALK、FGFR4-PI3K-AKT 経路が見出された。これらの新たな知見は、横紋筋肉腫の遺伝学的特徴を明らかにし、今後の横紋筋肉腫の有効な治療法開発に貢献する可能性があると考えられ、学位の授与に値すると考えられる。