

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「創薬コンセプトに基づく戦略的治療デザインの確立」
(難治性中間型神経芽腫のゲノム層別化情報に基づく次世代型治療法の開発研究)
2. 研究開発代表者：中村洋子（千葉県がんセンター研究所 予防疫学研究部）
3. 研究開発の成果：

本研究課題では、原因遺伝子及び標的遺伝子が不明である難治性中間型神経芽腫サブタイプの関連遺伝子をゲノム・トランスクリプトーム解析などにより同定し、腫瘍層別化や有効な標的分子を同定することを目的とする。

まず約 2800 症例の過去の神経芽腫症例について、病期、発症年齢、再発の有無、全生存期間などの臨床予後情報を収集し、2273 検体についての臨床情報を更新した。これらの情報に基づき、典型的予後良好群（ステージ 1、2、4s）を約 370 例、典型的予後不良群（ステージ 3、4、かつ *MYCN* 増幅）を約 390 例、そして本研究の主な対象である予後中間群（ステージ 3、4 かつ *MYCN* 非増幅例）を約 570 例抽出した。これらの検体から核酸を調製し品質確認を行うことにより、網羅的ゲノム解析や検証に使用する検体を抽出した。

予後中間群の全エクソンシーケンス解析は支援基盤に依頼し、合計 99 症例（125 検体）のデータを取得した。腫瘍あたり平均 約 77 個の体細胞一塩基置換と、平均約 9 カ所の挿入・欠失変異候補が検出された。遺伝子変異の数は死亡例で有意に多く、診断時年齢とも正の相関が見られた。アノテーション解析により、1 症例あたり平均約 30 個、合計約 1730 個のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異候補を同定した。転写ネットワーク解析を行い、これらの遺伝子を転写制御すると予想される 207 の転写因子群を抽出した。このなかで予後中間群に変異が検出されたものは 16 個であった。これらにはがん抑制遺伝子として機能する複数の転写因子が含まれており、その転写制御ネットワーク内の遺伝子の変異が中間予後群の死亡例に高頻度に見られたことから、これらが転写制御する遺伝子発現ネットワークの異常が神経芽腫中間予後群の悪性化と関連することが示唆された。

RNA シーケンシングは 52 症例（69 検体）についてデータを取得した。合計約 290 種類の RNA fusion 候補が検出され、1 例（死亡例）については、特定の染色体に Fusion breakpoint の高度な集積が見られた。RT-PCR とサンガーシーケンスの両方で検証を行い、4 種類の Fusion 遺伝子産物を確認した。うち 1 つを構成する遺伝子に関しては、エクソーム解析から別の 1 例にも変異が検出されており、また、その低発現が神経芽腫の不良な予後と強い相関が確認された。興味深いことに本遺伝子は前述のがん抑制遺伝子の転写ターゲットであることから、上記の転写ネットワーク異常と難治性中間予後群との関連性を裏付けるものであると考えられる。

網羅的メチローム解析は 97 症例について行った。予後と関連する 3 つのメチロームクラスターを同定し、予後不良 *MYCN* 非増幅型に特徴的なメチル化パターンを示すプローブを抽出した。遺伝子発現レベルとの比較から、予後不良 *MYCN* 非増幅型で高メチル化かつ低発現であり、発現レベルが予後と関連する 6 個の遺伝子を抽出した。これらの予後マーカーとしての評価は独立症例で今後さらに検証する必要があるが、本研究から抽出された候補遺伝子群は今後の難治性予後中間型神経芽腫のリスク分類の精度向上に資すると期待される。

一連の解析から抽出された候補遺伝子の一部について神経芽腫細胞株を用いた機能解析を行った。低発現が有意に予後不良と関連した遺伝子の一つについては、細胞死促進因子であること、前述の転写ネットワークにより発現誘導され、DNA 損傷応答及び細胞周期進行に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、典型的予後不良タイプで変異が見られた遺伝子の一つについても機能解析を行い、その細胞増殖促進機能を確認するとともに、特異的阻害剤の処理により細胞増殖抑制効果が得られることを示した。これらの候補遺伝子のさらなる解析により、難治性神経芽腫に対する新規治療法開発への展開が期待される。