

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「分子プロファイリングによる新規標的の同定を通じた難治がん治療法開発」  
(統合的ゲノムスクニングによる難治性小児固形腫瘍の新規標的分子の探索)
2. 研究開発代表者：滝田 順子  
(国立大学法人東京大学 大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 小児科学)
3. 研究開発の成果
  - ①難治性小児固形腫瘍(神経芽腫、横紋筋肉腫、ラブドイド腫瘍、ユーイング肉腫)における PD1 経路の解析  
神経芽腫、横紋筋肉腫、ラブドイド腫瘍、ユーイング肉腫の細胞株計 56 検体につき、RT-PCR 法を用いて、PDL1 の発現解析を行った。その結果、神経芽腫、28/35 株、横紋筋肉腫、7/8 株、ラブドイド腫瘍 4/5 株、ユーイング肉腫 6/8 株で発現が確認された。また横紋筋肉腫、神経芽腫の新鮮腫瘍のパラフィン切片それぞれ 5 検体につき PDL1 の免疫染色を行ったが、PDL1 の蛋白発現の確認は困難であった。さらなる条件検討が必要と考えられた。
  - ②神経芽腫における RNA sequencing  
ALK 変異陰性神経芽腫 16 例を用いて、RNA sequencing を行った。その結果、融合遺伝子は一検体につき平均 7.8 個検出されたが、インフレーム融合遺伝子は全体の 3 個であった。その中には、ALK 関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子が含まれており、神経芽腫の発症に関与している可能性が示唆された。これらの融合遺伝子をさらに NB50 検体を用いて、頻度の検証を行ったが、重複するものは見出されなかった。さらに、クラスター解析を行ったところ、神経芽腫は発現パターンの違いにより、2 群に分類されることが判明し、これは MYCN の増幅の有無と有意に相関することが判明した。
  - ③神経芽腫の genetic landscape  
神経芽腫の分子病態の全体像を明らかにするために、新鮮腫瘍 500 検体を用いて、神経芽腫関連遺伝子 12 個の target deep sequencing および SNP アレイを用いた網羅的ゲノムコピー数の解析を行い、genetic landscape を作成した。その結果、ゲノム異常のパターンにより神経芽腫は 6 つのサブグループに分類されることが見出された。それぞれのグループは、臨床情報と相関することが判明し、ゲノム情報を基盤としたサブグループ分類は、予後予測に有用と考えられた。
  - ④プログラムの総合的推進  
プログラム全体の連携を密としつつ円滑に運営していくため、平成 27 年日本小児血液・がん学会の開催中(平成 27 年 11 月 27 日-29 日)にそれぞれの委託施設と個別の研究打ち合わせ会を行った。また適宜、メール等を利用して、進捗に関して情報交換を行った。
  - ⑤神経芽腫で検出された融合遺伝子の検証  
神経芽腫 16 例の RNA sequencing の結果、検出された融合遺伝子につき、さらに神経芽腫 50 検体を用いて、頻度の検証を行ったが、重複するものは見出されなかった。
  - ⑥小児固形腫瘍臨床検体における PDL1 の発現解析  
神経芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、腎腫瘍のパラフィン切片を用いて、PDL1 の免疫染色を行った。その結果、一部の腫瘍で強陽性を認めるものの、大半の検体では、蛋白発現が確認されなかった。さらに抗体を変えて検証を行う必要が考えられた。
  - ⑦小児固形腫瘍の検体収集とデータベースの構築  
プログラム全体の推進のために、平成 26 年度に引き続き患者検体の収集とデータベースの構築を行った。特に神経芽腫の genetic landscape 解析に用いた臨床検体 500 例につき予後情報などの臨床情報の収集を行い、データベース化を行った。作成したデータベースに関しては、パスワードをかけたハードディスク内に収納し、各共同研究施設との情報共有化を行った。
  - ⑧横紋筋肉腫細胞株における PD1 経路の解析  
横紋筋肉腫の細胞株を用いて、PAX3/7-FOXO1 融合遺伝子の発現をノックダウンし、PD1 経路への影響を検討した。その結果、PAX3/7-FOXO1 融合遺伝子のノックダウンに伴い、PDL1 の発現が低下することを見出した。従って、PAX3/7-FOXO1 融合遺伝子は PD1 経路の発現を制御している可能性が示唆された。