

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「希少がん・小児がん」（小児がんにおける網羅的ゲノム・エピゲノム解析による再発・難治例を予測するバイオマーカーの探索）
2. 研究開発代表者： 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター
臨床研究センター センター長 堀部 敬三
3. 研究開発の成果

代表的な小児がんである、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、肝芽腫、乳児白血病において、次世代シーケンス技術などを活用した網羅的ゲノム・エピゲノム解析による再発・難治例を予測するバイオマーカーの探索を行った。

再発 ALL を対象とした全エクソンシーケンスおよび全ゲノムシーケンスにより再発時に高頻度に認められ、再発リスクと関係がみられる遺伝子異常を抽出した。全エクソンシーケンス結果に基づき、経時的なクローン構造の解析の結果、長期予後が不良である早期再発例においては、初発時において既に治療抵抗性を有するクローンが存在し、再発の起源となっていることが明らかとなった。そこで、521 症例と予定を超える症例数の初発時検体を用いて、網羅的な解析で同定された候補遺伝子を含めて標的遺伝子シーケンスを行い、臨床データとの関連を解析した。その結果、既知の予後不良因子に加えて、予後と強く相関する新規のバイオマーカー候補の同定に成功した。高感度な遺伝子変異解析に加えて、共通した解析プラットフォームを用いて、詳細なコピー数異常の解析も可能であった。

肝芽腫を対象とした研究では、治療前腫瘍及び正常組織（肝臓または末梢血）130 例の全エクソンシーケンス（予後良好 109 例と不良 21 例）の結果について、腫瘍特異的な変異の同定解析を行った。その結果、平均 40 個程度で遺伝子変異が同定され、成人がんに比べて有意に低値であった。 β カテニン（CTNNB1）遺伝子の変異や欠失を高頻度に検出し、肝芽腫発症に β カテニン異常が関与していることが推測された。それ以外には KCNN3、ARID1A、EVPL、DNAH3、ALPP などの変異が 6-7 例に見いだされたが、CTNNB1 遺伝子以外にがん化や悪性度を有意に左右している有意な変異は見出されなかった。そこで、腫瘍 122 例と正常肝 10 例を対象に、メチル化について 405K メチル化アレイにて検討したところ、4 群のクラスターに分類され、肝芽腫の発症や進展にメチル化が大きく関与していることが示唆された。次に、腫瘍の進展度や予後との関連を解析した結果、年齢と変異数の間に正の相関を認め、予後良好な乳幼児例においては高頻度に 11 番染色体 UPD（片親性ダイソミー）が認められた。これらから、遺伝子変異の蓄積が予後と関連していることが示され、一方でインプリンティング遺伝子のある 11 番染色体の UPD は予後良好なマーカーと考えられた。メチル化アレイの結果から得られたクラスター解析では正常肝と類似したクラスターは予後良好で、一方予後不良なクラスターも見出され、メチル化状態が有用なリスクのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。一方、予後不良例における再発巣、転移巣の検索からは再発、転移に特徴的な変異は見出されなかった。

乳児白血病の腫瘍細胞と正常細胞とのペア検体 53 検体に対してエクソーム解析を行い、51 検体で解析結果が評価可能であった。また、MLL 遺伝子転座をもつ白血病を発症した家系の全ゲノム解析を発症者 2 名の正常細胞と腫瘍細胞をペアで、非発症者 3 名計 5 名に対して行った。また、MLL 転座陰性の乳児白血病の検体に関しては RNA シークエンスを 16 例で行った。また、メチル化解析を正常 10 検体、乳児白血病発症者 101 検体に対して行った。