

学位論文題名

Novel risk stratification of patients with neuroblastoma
by genomic signature, which is independent
of molecular signature

(発現プロファイルと独立の因子であるゲノム異常パターンによる
神経芽腫の新しいリスク分類)

学位論文内容の要旨

【緒言】神経芽腫は小児固形腫瘍疾患の一つであり、一歳未満に発症する多くの腫瘍は自然退縮し、一歳以上の進行例では腫瘍死に至らしめる臨床像を呈するため、その生物学的背景因子について多くの研究がなされている。日本では神経芽腫の早期発見を目的に生後6ヶ月の小児に対しマススクリーニング(MS)を施行してきたが、進行例の減少には結びつかず、臨床的意義が極めて少ないとされ2004年4月に中止された。今回MS症例も含めた原発性神経芽腫症例236例のアレイCGH解析により、ゲノム異常パターンと予後、臨床および組織学的因子との関係、さらには遺伝子発現解析と予後との関係について考察した。

【材料および方法】1995年から2003年までに日本で切除された神経芽腫症例236例(うち124例がMS症例)を用いた。術後補助療法は日本神経芽腫研究班の提唱するプロトコールに則っている。アレイCGHはUCSF(カリフォルニア大学サンフランシスコ校)で開発された2464個のBACクローンをtriplicateで搭載された解像度約1.2Mbのチップを用いた。発現解析は千葉県がんセンターで開発された5340個のcDNAを搭載したチップを用いた。それぞれのデータはNCBI Gene Expression Omnibus(GEO)に掲載した(GSE 5784、GSE 5779)。ゲノム異常パターンの分類は、我々が考案開発したcomb-fit methodやthreshold rule等を用い、発現データは標準t-testを施行した。生存曲線はKaplan-Meier法を用いlog-rank testで検定し、Coxハザードモデルを用い単・多変量解析を施行した。

【結果】236例のゲノム異常は、殆どゲノム異常を伴わない群(GGS)、染色体の部分的異常が優位な群(GGP)、染色体全体の増減が優位な群(GGW)の3つの特徴的パターンに分けられた。これらは17qの増加($R=-0.807$)および17番染色体全体の増加($R=0.75$)に最も相関し、MS症例を除いた臨床発見症例でも17q増加($R=-0.773$)と最も相関したことから、17q増加は原発性神経芽腫にとって、ゲノム異常パターンおよび予後に関連した重要なイベントと考えられた。今回初めてGGS腫瘍の存在が確認された。GGP腫瘍は17q増加を伴うタイプだが、以下の4タイプ(GGP1:1p欠失、GGP2:1pと11qの欠失、GGP3:11q欠失、GGP4:1pも11qも正常)に分類でき、各々MYCN増幅の有無(-a、-s)で分

けられた。GGP1aは他のゲノム異常を殆ど伴わないが、GGP1sは2p、1q、7p増加や14q、4p欠失を伴った。GGP2aは1q増加を伴った。GGP3の27例中 *MYCN*増幅を伴うGGP3aは1例のみであった。GGP1,2,3は70%以上がdiploid腫瘍であったが、GGP4では13%のみであった。GGW腫瘍の82%はhyperdiploidyであり、大部分に17番染色体の増加を認め、73%がMS症例であった。1p、11q欠失も認めたが、その頻度は極めて低かった。*MYCN*増幅を伴う腫瘍は予後不良であり、GGW腫瘍は予後良好、GGPs腫瘍は中間的予後を示したが、GGP1,3(5生率:80,75%)に比べGGP2(57%)の予後は不良で、1pと11q欠失の相加的効果が認められ、同様のことがGGP1a(42%)とGGP2a(0%)にも認められた。また、原発および再発時のゲノム異常の比較解析から、1p、11q欠失や17q増加、*MYCN*増幅のイベントに順序は無くランダムに起こっていた。*MYCN*増幅腫瘍の2年以上無再発生存例10例と腫瘍死例26例の比較により、腫瘍死例で11q欠失が高頻度に認められた。

神経芽腫の予後因子である年齢、病期、腫瘍発生部位、*TrkA*発現、Shimada分類、*MYCN*増幅の有無、遺伝子発現プロファイルに加え、今回のゲノム異常パターンも有意な予後因子であり、遺伝子発現プロファイル、年齢、腫瘍発生部位とは独立した因子として確認された。MS症例を除く、*MYCN*増幅を伴わない臨床症例(最も予後予測が困難)でも、遺伝子発現プロファイルが最も強力な予後因子であり($p=0.001$)、ゲノム異常パターンも腫瘍発生部位に次ぐ第三の予後因子であり、独立した因子であることも確認された。

【考察】臨床発見症例もMS症例もゲノム異常パターンの共通性から遺伝学的に神経芽腫と考えられた。高解像度のゲノムワイドな解析のため、*MYCN*増幅領域は2.4Mbセントロメア寄りから5Mbテロメア寄りの範囲で確認され、2p11からテロメアまでの広範囲で増加を認める症例も存在した。また、cDNAアレイデータから、1p36欠失領域に坐位する*CHD5*の発現低下や、17q25増加領域に坐位する*Survivin*の発現上昇が確認され(論文作成中)、このような統合解析による重要な遺伝子とその発現調整メカニズムの解明が期待された。

また、3つのゲノム異常パターンのうちGGW腫瘍はそのゲノム異常の特徴から、神経芽腫の幹細胞もしくは前駆細胞に細胞分裂時の染色体有糸分裂不全の関与が、GGP腫瘍ではゲノムの不安定性の関与が示唆された。GGs腫瘍の存在は大変興味深く、あらゆる年齢や*MYCN*増幅症例にも認められ、ほぼ全てがdiploid腫瘍であることから、GGs腫瘍は癌化イベントを受けたばかりの極初期の神経芽腫であり、引き続きGGPやGGWへとゲノム異常を蓄積してゆくこと、さらに、MSが臨床発見症例の減少に繋がらなかったことから、一歳未満と一歳以上のGGs腫瘍は異なる前駆細胞から派生している可能性も示唆された。

今回の解析で、遺伝子発現プロファイルとは独立したゲノム異常パターンによる新しいリスク分類が可能となった。両者を統合することで、個々の腫瘍の生物学的特徴に基づいたより詳細な分類が可能となり、よりの確な治療の選択に繋がる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐々木 文 章
副 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature

(発現プロファイルと独立の因子であるゲノム異常パターンによる
神経芽腫の新しいリスク分類)

本研究はカリフォルニア大学サンフランシスコ校の癌センターで開発されたアレイ CGH を用い、神経芽腫 236 症例の全ゲノムレベルの高解像度ゲノム異常解析を行った。1 Mb レベルの解像度での全容把握はこれまでなされておらず、候補領域の絞込みや新しい重要なゲノム領域の発見も期待された。また、千葉県がんセンターが報告した遺伝子発現パターンによる予後予測と同様、ゲノム異常パターンでも同様に高精度な予後予測が可能かどうか大変興味を持たれるところであった。

今回神経芽腫が大まかに 3 つのゲノム異常パターン (GGS : 染色体異常が乏しい, GGP : 染色体部分増加減少が優位, GGW : 染色体全体増加減少が優位) に分類され、それは 17 番染色体の状況に強く相関し、それを genomic signature とした時、MYCN 増幅を伴わない sporadic 腫瘍 (中間予後群) のみを対象とした場合でも、遺伝子発現パターン (molecular signature) 同様、有意かつ独立した予後予測因子となり、3 群とも 1p,11q, MYCN の状態で細分化されることも明らかとなった。それぞれの腫瘍群が示す生存曲線の解析から、MYCN 増幅群が予後不良である一方、MYCN 増幅の無い GGS/GGW 群が予後良好、GGP 群が中間予後群を示し、かつ、1p 欠失と 11q 欠失は予後において同程度かつ独立した影響を及ぼしていると推察された。また、本研究で明確となった GGS 群は、ゲノム異常の乏しい予後良好群ではあるが、生物学的には Heterogenous であり、GGP 群として、あるいは GGW 群としてゲノム異常を蓄積していく手前の progenitor 群的存在であることが推察された。よって、GGS 腫瘍のさらなる高解像度ゲノム異常解析により、癌化早期の重要なゲノム異常領域が明らかになることが期待された。一方で、マススクリーニング症例の予後はゲノム異常パターンに影響されなかったことから、その ploidy と診断時年齢から、Mitotic dysfunction とゲノムのメチル化が、独立もしくは関連して影響していると考えられた。今回の論文では、候補領域・遺伝子の詳細な検討結果の報告は控えられた。

公開発表後、副査の有賀教授より 1)独立な予後因子であるとは、ゲノム異常を遺伝子発現で説明できないということか、2)genomic signature のマススクリーニング症例に対する有用性 3)神経芽腫で高頻度に起こっている 17 番染色体異常の他腫瘍での不偏性について質問

があった。それらに対し、1)説明できないということではなく、両者の情報を統合することで高精度な予後予測が可能であり、合理的診断と治療に貢献できる可能性を示したものであり、また、いずれ両者の関連が解明されてゆくであろうこと、2)臨床的にマスキリングが予後の改善に貢献していないと評価され中止されたように、マスキリング症例に対するいかなる予後予測も不要であること、しかし生物学的背景はなお興味深く、その ploidy と診断時年齢から、Mitotic dysfunction やゲノムのメチル化が独立もしくは関連して大きく影響していると考えていること、3)胃癌や乳癌でも 17q gain は認められ、乳癌ではその領域に Her2 が坐位しており、診断および治療のターゲットとなっている状況を説明した。主査の佐々木教授からは 1)Brodeur の 3 分類との関係、2)1 歳未満症例に多い自然腿縮の機序、3)ゲノム異常の蓄積過程・順序、4)GGS 群の腫瘍死の原因について質問があった。それらに対し、1)今回はゲノム異常パターンから、より詳細な分類をした上で実証的に 3 つの genomic signature を提唱しており、その過程は Brodeur の分類のようにシンプルではないが、結果的には似た分類となったこと、2) ploidy と診断時年齢から、Mitotic dysfunction とゲノムのメチル化が影響していると考えていること、3)同一症例の初発時と再発時の解析結果からゲノム異常の蓄積過程に決まった順序は無いこと、4)今後の更なる高解像度解析により重要なゲノム異常領域が明らかになる可能性を説明した。藤堂教授から BAC アレイを用いたゲノム研究の限界と将来について質問があったが、今回の研究では 1Mb 程度の解像度という限界はあったが、ゲノム異常を詳細に把握する意義の重要性には全く変わりの無いこと、つまり、現在タイリングアレイが実用可能となりつつある状況に加え、遺伝子、蛋白質発現、糖鎖、microRNA など、全てが網羅的に解析可能となってきており、それらが現実には連動している以上、将来的には全てが統合解析される新しい科学が成熟してくるはずであり、ゲノムもその構成要素の一つとして、その重要性に変わりはないことを説明した。本研究は、詳細なゲノム異常情報を主に鳥瞰的視点に立って解析したものであり、ノンランダムなゲノム異常パターンと予後との関係を明らかにしたところが高く評価され、今後はより細部をクローズアップしてゆく方向の解析が期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。