

小児固形腫瘍における RNA シーケンスの有用性を評価 ～RNA シーケンスは小児固形腫瘍の 診断と治療戦略の開発に貢献する～

名古屋大学大学院医学系研究科小児科学の高橋義行（たかはし よしゆき）教授、村松秀城（むらまつひでき）講師、同大医学部附属病院小児がん治療センターの奥野友介（おくの ゆうすけ）病院講師、病理部の下山芳江（しもやま よしえ）准教授、名古屋医療センター小児科の市川大輔（いちかわ だいすけ）医員、埼玉県立小児医療センター臨床研究部の中澤温子（なかざわ あつこ）部長らの研究グループは、小児固形腫瘍のうち特に肉腫が疑われた患者において包括的遺伝子解析を行い、その成果を報告しました。

小児固形腫瘍は、多種多様な 100 以上のサブタイプに分かれている一方、実際には異なる腫瘍であるにも関わらず互いによく似た病理所見が認められる症例や、非典型的な病理像をとる症例がしばしば存在することから、現在でも病理組織学的診断が困難な腫瘍群です。本研究グループは、小児固形腫瘍の診断プロセスに次世代シーケンサー^{*1}を用いた RNA シーケンス^{*2}を含めることの潜在的な有用性を評価するために、小児固形腫瘍が疑われる患者 47 人に RNA シーケンスを実施しました。

小児がんを専門とする複数の病理医により病理標本を再評価したところ、42 名の患者は既知のサブタイプの固形腫瘍と診断された一方、5 名の患者は特定の病理診断に至らず「未分化肉腫」に分類されました。これらの患者検体を用いて RNA シーケンス解析を行った結果、これまでに報告されたことのない *SMARCA4-THOP1* 融合遺伝子が発見された 1 名を含め、23 名の患者で診断に有用な遺伝子変異が検出されました。とりわけ、病理診断が「未分化肉腫」ととどまった 5 名の患者のうち 4 人で診断的な遺伝子変異が確認され、明確な診断に至りました。これらの結果から、RNA シーケンスを用いた遺伝子解析は、小児固形腫瘍の診断ならびに将来の治療戦略の開発に大いに役立つことが明らかとなりました。

本研究結果は「npj Genomic Medicine」（2021 年 6 月 15 日電子版）に掲載されました。

ポイント

○病理組織学的検査に加えて RNA シーケンスを組み合わせた診断プロセスの導入により、小児固形腫瘍の診断精度が向上することが明らかとなりました。

○とりわけ、特定の病理診断が得られず「未分化肉腫」に分類された腫瘍では、5人中4人で診断的な遺伝子変異が確認され、明確な診断につながりました。

○新規に *SMARCA4-THOP1* 融合遺伝子を発見し、*SMARCA4* の対立アレル^{*3} の変異と重なることで、*SMARCA4* 遺伝子の不活化が示され、これが発がんに関与することが示唆されました。

1. 背景

小児固形腫瘍には多種多様な疾患が含まれ、適切な治療を提供するためには腫瘍の種類の詳細な診断が必要不可欠です。一部の腫瘍においては、特異的な腫瘍マーカー^{*4} が診断に有用ですが、ほとんどの腫瘍では特定のマーカーが存在せず、診断は病理組織評価に強く依存しています。しかしながら、病理検査に用いる検体の十分な採取が困難であったり、組織学的な特徴が類似していたりするため多くの小児固形腫瘍の診断は非常に困難です。近年、それぞれの腫瘍に特徴的な遺伝的変異が多数報告されています。これらの遺伝子変異の検出は、小児固形腫瘍の診断において、非常に有力な方法です。しかしながら、従来の手法を用いてこれらの遺伝子変異を検出するには限界があります。また、新規の遺伝子変異の発見は困難です。本研究では小児固形腫瘍において RNA シーケンスを使用した遺伝子解析を小児固形腫瘍の診断プロセスに加えることの有用性について評価しました。

2. 研究成果

本研究グループは、47 例の小児固形腫瘍患者において RNA シーケンスを行い、23 例で診断につながる遺伝子変異を検出しました。うち、1 例では新規の *SMARCA4-THOP1* 融合遺伝子を発見しました。この症例では、融合遺伝子に加えて *SMARCA4* 遺伝子の変異が対立アレルにも検出され、*SMARCA4* 遺伝子の両アレルの不活化が発がんに関与していました。

また、全例で小児固形腫瘍を専門とする複数の病理医による病理組織診断の再評価を行いました。このうち 5 例は、未分化肉腫とされ、既に知られている腫瘍の組織学的特徴と一致しませんでした。この 5 例中 4 例において RNA シーケンスによって、疾患に特徴的と考えられる遺伝子変異を検出しました。さらに、すでに知られている腫瘍の組織学的特徴と一致した 42 例中、5 例では検出された遺伝子変異によって腫瘍の亜型が変更されました。全体として、RNA シーケンスによって 9 例の患者において病理組織診断が変更されました(図 1)。検出された遺伝子変異にはこれまでに報告のない *SMARCA4-THOP1* 融合遺伝子が含まれました(図 2a)。*SMARCA4* の対立アレルにはスプライスサイト変異も発見され(図 2b)、これらが重なることで *SMARCA4* 遺伝子の不活化が示され、これが発がんに関与することが示唆されました。

さらに、一部の症例において、クラスタリング解析^{*6} をおこなったところ、横紋筋肉腫の症例が特定のクラスターを形成しました(図 3)。遺伝子発現解析^{*7} においては、横紋筋肉腫の症例において、*MYOG* 遺伝子と *CHRNA1* 遺伝子が高発現していることが示されました(図 4)。これらの遺伝子は横紋筋肉腫に特異的な遺伝子であると報告されており、発現解析が診断に有用である可能性

があります。

3. 今後の展開

小児固形腫瘍の診断において、病理組織診断と RNA シーケンスによる遺伝子解析を組み合わせることにより、より正確な診断が可能と考えられます。また、正確な診断により適切な治療が提供可能となり、治療成績の向上や治療合併症の軽減につながることを期待されます。

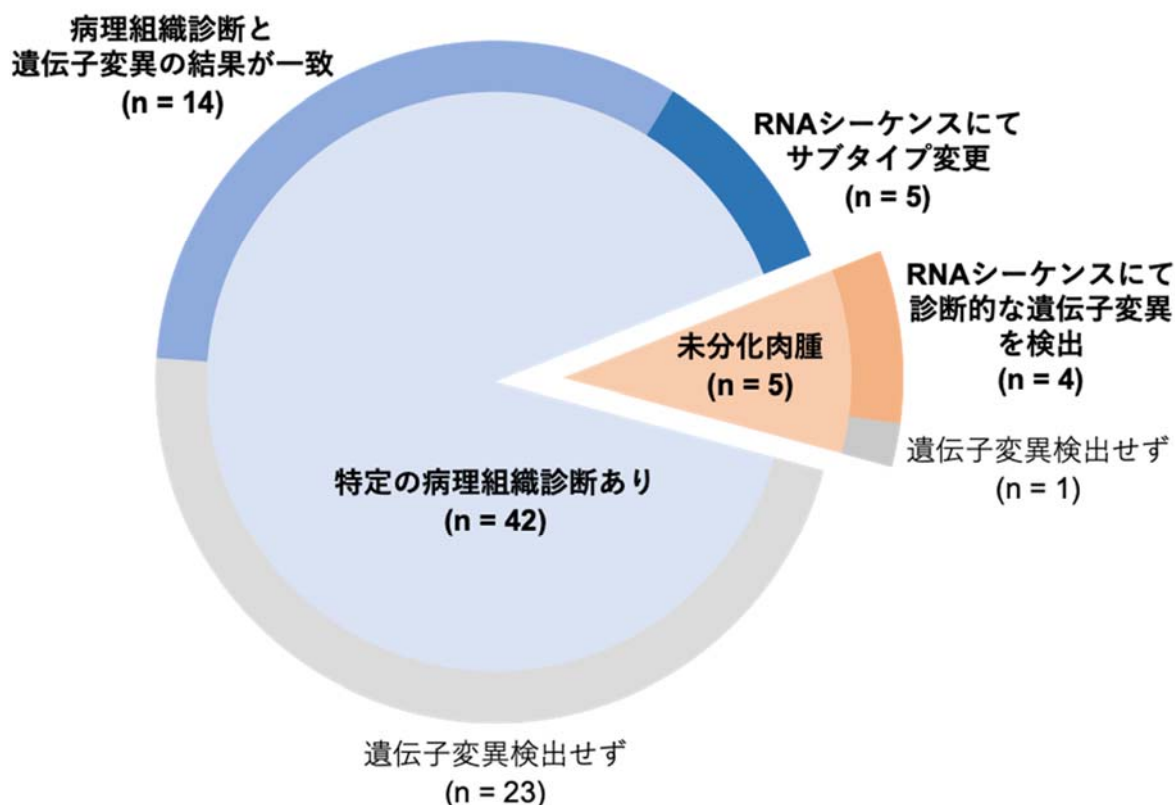


図 1.小児固形腫瘍を専門とする複数の病理医による再検討の結果、42 例で特定の病理組織診断が得られました。これらの症例の腫瘍検体を用いて RNA-シーケンス解析を行ったところ、14 例で病理組織診断と一致した遺伝子変異が検出された一方、5 例では病理診断のサブタイプ変更や治療選択に関わる遺伝子変異を同定しました。また、特定の病理組織診断が得られず「未分化肉腫」に分類された 5 例では、うち 4 例で RNA-シーケンス解析により診断的な遺伝子変異が同定されました。

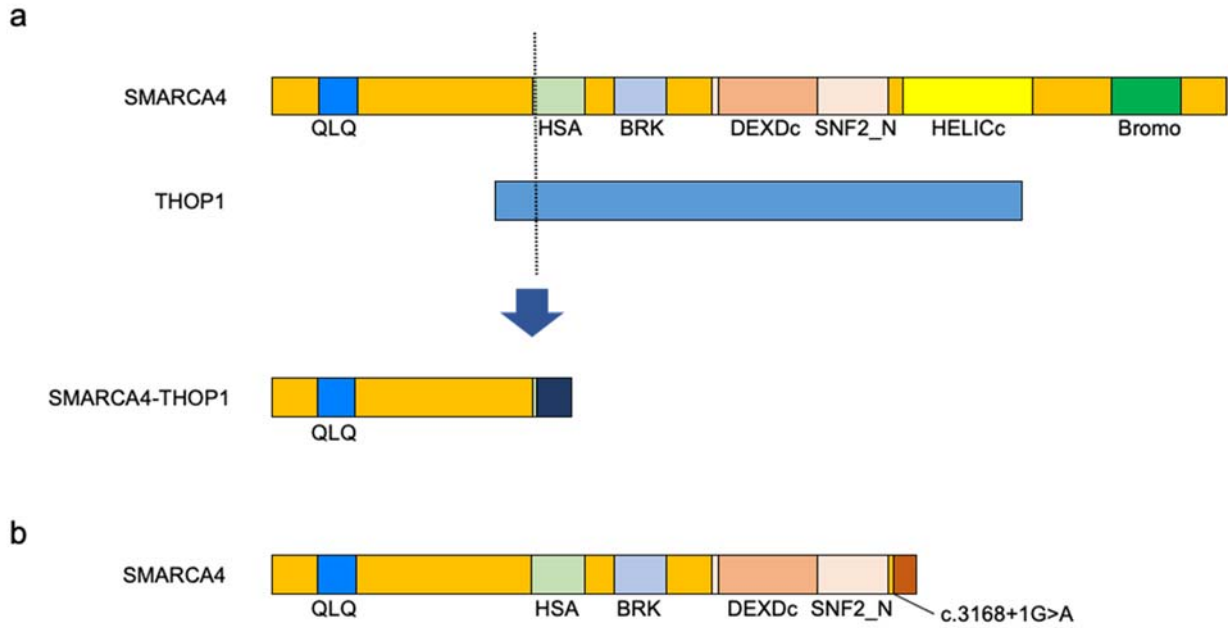


図 2 同定された *SMARCA4-THOP1* 合遺伝子(a)。SMARCA4 遺伝子と THOP1 遺伝子が接合することで、SMARCA4 が正常に翻訳されないことが判明しました。また、対立アレルに同定された変異(b;c.3168+1 G>A)によっても SMARCA4 の翻訳が正常に行われなかったことがわかりました。これらの変異により 2 本の遺伝子が両方とも正常な SMARCA4 タンパクを産生できず、これが発がんに関与すると考えられました。

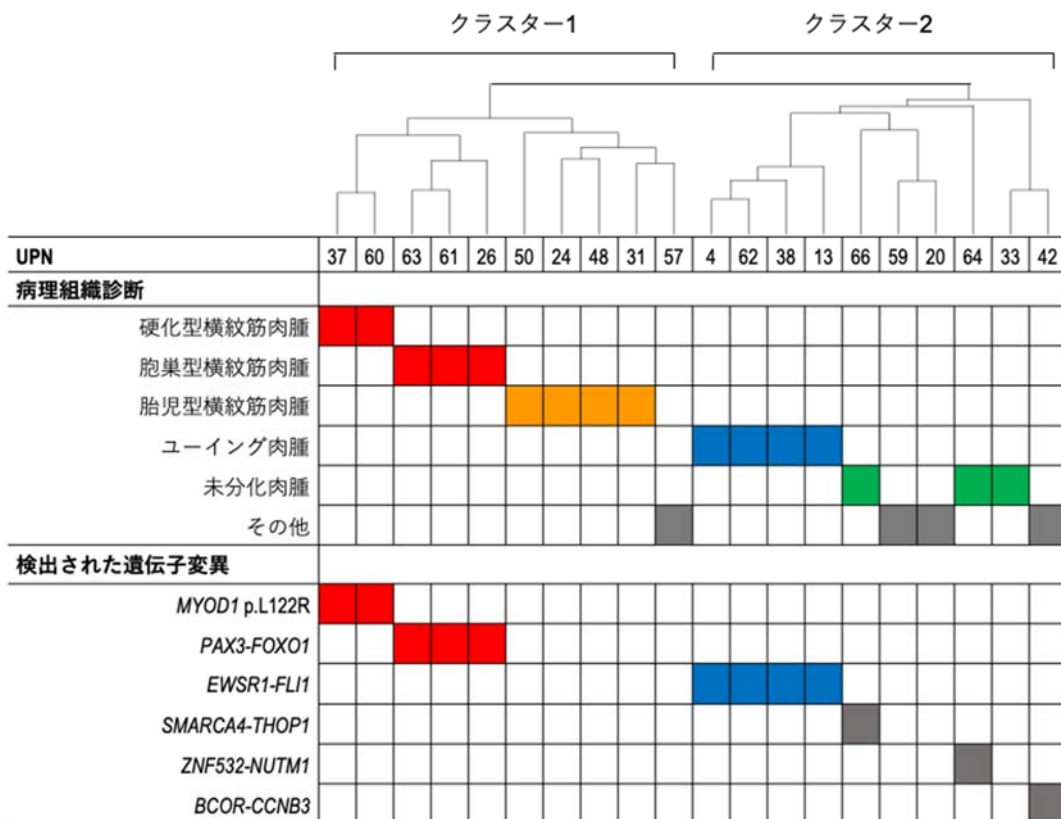


図 3 クラスタリング解析を行ったところ、2つのクラスターが形成され、クラスター-1は横紋筋

肉腫 9 例とその他 1 例で、クラスター 2 はユーイング肉腫 4 例と未分化肉腫 3 例、その他 3 例で形成されました。

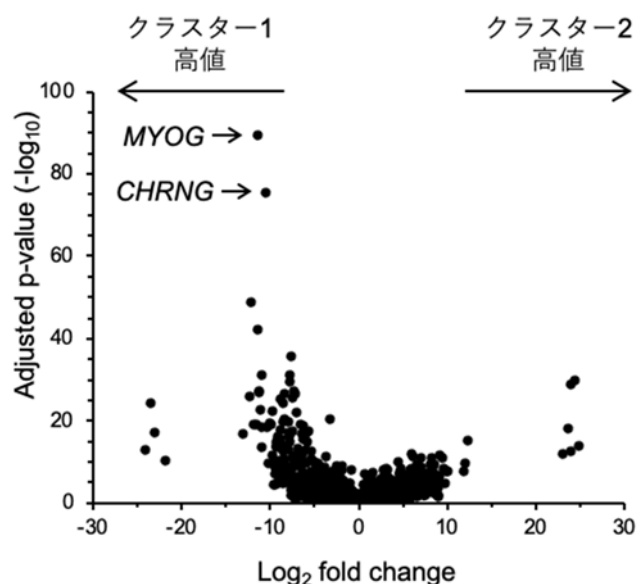


図 4 クラスター 1 とクラスター 2 でどのような遺伝子が高発現しているか調べたところ、クラスター 1 において、横紋筋肉腫に特徴的な *MYOG* 遺伝子と *CHRNG* 遺伝子の高発現を認めました。

4. 用語説明

1. 次世代シーケンサー：DNA などの塩基配列を読み取る装置をシーケンサーという。「次世代シーケンサー」は従来の「第 1 世代シーケンサー」と対比させて使われる用語。次世代シーケンサーでは従来のものと比べて大量の塩基配列を低コストで迅速に解析することが可能。
2. RNA シーケンス解析：次世代シーケンサーを用いて RNA の塩基配列を網羅的に解析する手法を指す。融合遺伝子の網羅的な検出や、網羅的な遺伝子発現定量解析を行うことができる。
3. アレル：各遺伝子座は 2 種類の遺伝子（父由来と母由来）から構成されており、その片方のこと。
4. 腫瘍マーカー：がんの発症とともに生体内で検出される特定の物質のことで、血液や尿中に検出される。神経芽腫におけるホモバニリン酸やバニリルマンデル酸、肝芽腫における α -フェトプロテインなどが臨床で用いられている。
5. ヘッジホッグシグナル： *PTCH1* 遺伝子や *SMO* 遺伝子、 *GLI1* 遺伝子を介して伝達される経路で、細胞の生存や分化、増殖などに関与する。
6. クラスタリング解析：ある集団を似たもの同士にグループ分けする解析方法。
7. 遺伝子発現解析：複数のサンプルの間で複数の遺伝子発現レベルを網羅的に比較する方法。

5. 発表雑誌

掲雑誌名：npj Genomic Medicine

論文タイトル：Integrated diagnosis based on transcriptome analysis in suspected pediatric

sarcomas

著者 : Daisuke Ichikawa¹, Kyoko Yamashita^{2,3}, Yusuke Okuno⁴, Hideki Muramatsu¹, Norihiro Murakami¹, Kyogo Suzuki¹, Daiei Kojima¹, Shinsuke Kataoka¹, Motoharu Hamada¹, Rieko Taniguchi¹, Eri Nishikawa¹, Nozomu Kawashima¹, Atsushi Narita¹, Nobuhiro Nishio^{1,5}, Asahito Hama¹, Kenji Kasai⁶, Seiji Mizuno⁷, Yoshie Shimoyama⁸, Masato Nakaguro⁸, Hajime Okita^{9,10}, Seiji Kojima¹, Atsuko Nakazawa^{9,11}, and Yoshiyuki Takahashi^{1*}

所属 : ¹Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

²Department of Pathology and Biological Responses, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

³Department of Pathology, The Cancer Institute Hospital, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan

⁴Medical Genomics Center, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan.

⁵Department of Advanced Medicine, Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan.

⁶Department of Pathology, Aichi Medical University School of Medicine, Nagakute, Japan.

⁷Department of Pediatrics, Central Hospital, Aichi Developmental Disability Center, Kasugai, Japan.

⁸Department of Pathology and Laboratory Medicine, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan.

⁹Department of Pathology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan.

¹⁰Division of Diagnostic Pathology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

¹¹Department of Clinical Research, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan.

DOI : 10.1038/s41525-021-00210-y

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/npj_Gen_Med_210615en.pdf