

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2019C-3

課題名：小児固形腫瘍の迅速な遺伝子解析システムの開発

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター  
(所属・職名 氏名) 小児血液・腫瘍研究部・上級研究員 上野 瞳

(研究成果の要約) 本研究は、小児固形腫瘍における遺伝子診断について、増加傾向にある検査項目・検査数をより迅速に・安価に・正確に実施するための遺伝子解析システムを構築することを目的としている。本研究により、小児軟部腫瘍のユーイング肉腫および横紋筋肉腫や稀少腫瘍(小円形細胞腫瘍、紡錘形細胞腫瘍)のマルチプレックス RT-PCR を構築し、それぞれの感度・特異性の確認を行った。特にユーイング肉腫においては、腫瘍検体を用いその有用性を確認した。従来の病理診断をもとに、既存の遺伝子診断方法と組み合わせて利用することで、今後の検体数の増加および検査項目の増加に対応可能となると考える。

### 1. 研究目的

本研究は、小児固形腫瘍(軟部腫瘍や腎腫瘍)に対しマルチプレックス RT-PCR 法をもとにした遺伝子解析システムを開発し、迅速かつ安価な腫瘍の遺伝子解析方法を開発する。さらに、非典型例や診断難解例の解析手順をより簡便にすることを目的とする。特に、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫に加え、稀な小円形細胞腫瘍・紡錘形細胞腫瘍の診断システムを開発し、これらを従来の病理診断と組み合わせることによって、より精度の高い診断法を確立することを目標とする。

### 2. 研究組織

研究者	所属施設
主任研究者 上野 瞳	国立成育医療研究センター

研究協力者 大喜多 肇	慶応義塾大学・医学部 国立成育医療研究センター
義岡 孝子	国立成育医療研究センター
清河 信敬	国立成育医療研究センター

### 3. 研究成果

本研究では、次の項目について検討を行った。

(1) ユーイング肉腫の遺伝子診断システムの開発

ユーイング肉腫においては、*EWSR1-FLI1*、*EWSR1-ERG*、*EWSR1-ETV1*、*EWSR1-ETV4*、*EWSR1-FEV*、*FUS-ERG*、*FUS-FEV* の 7 つの融合遺伝子(*EWSR1/FUS-ETS*)が検出されるが、これらは腫瘍に対する融合遺伝子の特異性が高く、診断的価値が高いため、一度の検査でこれらの融合遺伝子を検出可能にすることを目標にした。

(ア) コントロールプラスミドの作成

融合遺伝子 *EWSR1-FLI1*、*EWSR1-ERG*、*EWSR1-ETV4* については、それらの融合遺伝子を発現する細胞株があるが、融合遺伝子 *EWSR1-ETV1*、*EWSR1-FEV*、*FUS-ERG*、*FUS-FEV* については、コントロールとなる融合遺伝子を所有していないため、細胞株の cDNA や cDNA パネルを用いて、遺伝子をクローニングし、融合遺伝子を作成、pGEM-T vector にサブクローニングを行った。

(イ) マルチプレックス RT-PCR の構築と感度および特異性の検討

前述の融合遺伝子について、これまでに報告されている転写 variant を調べた。本研究では、全ての融合遺伝子 variant を検出可能であることを目標としているが、variant の構成ごとに、増幅産物の長さが大きく異なってしまう。本研究の対象とする試料は、凍結組織検体であるが、RT-PCR とシーケンス解析の特性を考慮し、全ての増幅産物の長さを 200bp~1000bp となるようにマ

マルチプレックスプライマーを設計した。同一のプライマーにて、一度のシークエンス解析で融合点が確認できることも設計の条件とした。ほとんどの *EWSR1-ETS* variant は、exon 7 を完全に含んでいるが、極稀な報告例として exon 7 が一部しか含まれない症例がある。多数の variant を検出可能であるが稀な variant は検出しないセット A および稀な variant を検出するセット B (全 variant を検出) を構築した。

各セットの感度および融合遺伝子特異性の検討のため、ユーイング肉腫細胞株 cDNA と作成した融合遺伝子プラスミド DNA を用いて、マルチプレックス RT-PCR を行ったところ、7つの融合遺伝子全てを、特異的かつ高感度に検出可能であることを確認した。

(ウ) ユーイング肉腫腫瘍検体を用いたマルチプレックス RT-PCR 有用性の検討

(イ) で感度および特異性を確認したマルチプレックス RT-PCR プライマーセットについて、ユーイング肉腫腫瘍検体の凍結組織を用い、その有用性を検討した。その結果、使用した全ての検体において、それぞれ融合遺伝子を検出し、マルチプレックスプライマーによるダイレクトシークエンス解析にて、融合 variant の詳細を確認した。その後、既存の方法による結果と照合し、結果が一致していることを確認した。

以上の結果より、ユーイング肉腫の融合遺伝子検査が、簡略的・効率的に実施可能になると考える。

これらの結果の一部は、第 61 回日本小児血液・がん学会学術集会で発表した。

## (2) 横紋筋肉腫の遺伝子診断システムの開発

横紋筋肉腫は、免疫組織化学にて特異性が高く横紋筋肉腫と同定することが可能である。しかしながら、融合遺伝子の種類によって治療方針が異なるため、それらを可能な限り早急に区別することが求められている。

(ア) コントロールプラスミドの作成

横紋筋肉腫においては、*PAX3-FOXO1* と *PAX7-FOXO1* が良く知られている。*PAX3-FOXO1* 融合遺伝子を発現する細胞株

(*NRS-1*) を所有しているが、転写 variant の詳細が不明であったため、シークエンス解析を行い、配列を明らかにした。また、サブクローニングを行った。その他、*PAX7-FOXO1* を含む 10 融合遺伝子については、細胞株を有していないため、ユーイング肉腫と同様の方法でプラスミドの作成を計画し、9 融合遺伝子のプラスミド作成までが完了した。

(イ) マルチプレックス RT-PCR の構築と感度および特異性の検討

横紋筋肉腫において報告されている 11 融合遺伝子のうち、*PAX3-FOXO1* と *PAX7-FOXO1* は、他の融合遺伝子を有する横紋筋肉腫とは治療方針が異なるため、早急に区別する必要がある。そのため、この 2 融合遺伝子と他の 7 融合遺伝子は別のセットにすることとした。*PAX3-FOXO1* および *PAX7-FOXO1* を検出するマルチプレックス RT-PCR を構築した。細胞株 cDNA および作成したプラスミド DNA を使用し、ユーイング肉腫同様に感度および特異性を確認した。その他の 7 融合遺伝子のマルチプレックス RT-PCR については、プライマーの設計をプラスミド作成と同時に行っている。今後、計画しているプラスミドが揃いしだい、感度や特異性について確認を行う。

## (3) 稀な小円形細胞腫瘍、紡錘形細胞腫瘍の遺伝子解析システムの開発

小児の軟部腫瘍の半数は横紋筋肉腫で、ユーイング肉腫がそれに次ぐ。そのため、残りの腫瘍に対しては、病理学的に小円形細胞腫瘍であるか、紡錘形細胞腫瘍であるかに分けて、遺伝子解析セットを作製する。対象腫瘍としては、線維形成性小細胞腫瘍、滑膜肉腫、*BCOR-CCNB3* 肉腫、*CIC rearranged* 肉腫、その他の未分化肉腫、明細胞肉腫、筋上皮腫、脂肪肉腫、先天性線維肉腫・間葉芽腎腫、紡錘形細胞肉腫・線維腫症が含まれ、対象とする融合遺伝子としては、*EWSR1-WT1*、*BCOR-CCNB3*、*CIC-DUX4*、*CIC-FOXO4*、*EWSR1-NFATC2*、*EWSR1-POU5F1*、*EWSR1-SMARCA5*、*EWSR1-PATZ*、*EWSR1-SP3*、*EWSR1-ATF1*、*SS18-SSX1*、*FUS-DDIT3*、*EWSR1-DDIT3* 等があげられる。また、融合遺伝子以外にも遺伝子内重複配列である *BCOR-*

*ITD*, *EGFR-ITD*, *BRAF-ID*のみを検出できるプライマーを作製する。

(ア) コントロールプラスミドの作成

最新の文献を調査し、再度、融合遺伝子および重複変異を分類し前述の融合遺伝子を含む23遺伝子を対象とすることにした。これらの融合遺伝子を有する細胞株を保有しないため、融合遺伝子を作成しサブクローニングすることにした。23遺伝子を3つにグループ分けし、マルチプレックスプライマーを構築することにした。

セット1は、5'側に *EWSR1* または *FUS* を有する10融合遺伝子、セット2は、5'側に *CIC* または *SS18* をもつ融合遺伝子を含む8融合遺伝子、セット3は、*BCOR-ITD*, *BCOR-CCNB3*, *EGFR-ITD*, *BRAF-ID* を含む5つの重複変異と融合遺伝子とした。セット1および2については、全ての融合遺伝子のプラスミド作成が完了した。セット2については、ほとんどのプラスミド作成を終えたが、残り1つのプラスミドの作成を継続して、作成する。

(イ) マルチプレックス RT-PCR の構築と感度および特異性の検討

*EWSR1* および *FUS* を5'側に有する融合遺伝子セット1について、マルチプレックスプライマーを設計し、感度と特異度の確認を終えた。セット1は、標的融合遺伝子を高感度に特異的に検出することを確認した。セット2および3については、マルチプレックスプライマーの設計まで終了した。今後も継続して、これらの感度・特異度を確認する。

以上より、ユーイング肉腫および主要な横紋筋肉腫、*EWSR1* および *FUS* に関する稀な小円形細胞腫瘍、紡錘形細胞腫瘍の遺伝子解析のためのマルチプレックス RT-PCR を構築し、その感度・特異性やその有用性を確認した。これらを用いることで、遺伝子診断が、迅速に行えるようになるだろう。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

ヒト試料を使用する研究については、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守し、必要な倫理的承認の手続きを得て、個人情報保護法にもとづいて研究を

実施した。研究利用に同意の得られた小児腫瘍臨床検体あるいは連結不可能匿名化された検体を使用して研究を実施した。

受付番号 1035 「小児血液・腫瘍疾患の発症と治療経過に関する体細胞系列および生殖細胞系列の遺伝子変異の検出」

組換え DNA 実験はカルタヘナ法を厳守し申請により承認を受けている(国立成育医療センター遺伝子組換え実験安全委員会・実験計画番号 5-12、5-13)。