

主論文の要旨

**Genome-Wide Analysis of DNA Copy Number  
Alterations and Loss of Heterozygosity in  
Intracranial Germ Cell Tumors**

〔 頭蓋内胚細胞腫瘍における DNA コピー数異常および  
Loss of Heterozygosity パターンのゲノム網羅的解析 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻  
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：小島 勢二 教授)

寺島 慶太

## 【諸言】

頭蓋内胚細胞腫瘍（以下 iGCT）は、松果体および鞍上部に発生する稀な脳腫瘍であり、思春期の男児において発生率が高い。ジャーミノーマの治療成績は良好であるが、最適な放射線照射の方法や化学療法の意義はまだ確立していない。また、複数の組織型亜型の腫瘍の総称である非ジャーミノーマ性胚細胞腫瘍（以下 NGGCT）は、標準治療が定まっておらず、治療成績も不十分である。Heterogenous な腫瘍である GCT の正確な亜分類とリスク分類は、治療決定に極めて重要であり、現行の方法を補完する新たな遺伝学的マーカーの開発が待ち望まれている。また、治療成績の向上のために新たな治療標的となる分子を同定することも、期待されている。しかしながら、iGCT は外科的摘出術が行われることが少なく、さらには腫瘍マーカーの存在により生検すら行われないこともあり、研究材料となる腫瘍細胞の入手が極めて困難である。その結果、本腫瘍の基礎的研究はほとんど進んでおらず、本腫瘍の発生に関与する特定の遺伝子や遺伝経路は全く解明されていない。今回我々は、iGCT ゲノムの DNA コピー数変化および LOH パターンを網羅的に解析するために、一塩基多型（以下 SNP）マイクロアレイおよび定量的 PCR（以下 qPCR）法によって 62 例の iGCT 検体を解析した。

## 【対象及び方法】

6 つの施設から、倫理委員会に承認された研究計画に基づき、同意を得た患者 62 人が研究に参加した。初めに 27 例の腫瘍検体および血液検体の SNP マイクロアレイ解析を行い、その結果を qPCR で確認した。残りの 35 例について、独立した検証用コホートとして SNP マイクロアレイまたは qPCR によって解析を行った。抽出された DNA の SNP について、Affymetrix 社の GeneChip Human Mapping 100K Arrays (Hind III array)、Affymetrix GCOS および GDAS プログラムによって網羅的解析した。得られた SNP データから、Partek 社の Genome Suite プログラムによって、腫瘍細胞ゲノムの DNA コピー数および LOH パターンを解析した。iGCT の DNA コピー数異常の代表的なゲノム領域、染色体 12p (CCND2、NANOG)、8q (PRDM14)、13q (RB1)、X (AR) について qPCR 法による確認を行った。統計学的に有意な DNA コピー数異常を検出するために、コピー数異常の頻度だけでなくその振幅も考慮した GISTIC というアルゴリズムを用いた。

## 【結果】

iGCT の腫瘍細胞ゲノムは、ほぼ例外なく複数のコピー数異常および LOH を含む、非常に複雑な構造を示した。(図 1A) 高頻度に認められたコピー数増加ゲノム領域は、1q (44%)、2p (37%)、7q (37%)、8q (41%)、12p (59%)、14 (33%)、20q (30%)、21 (63%)、22 (41%)、Xq (44%) であった。高頻度に認められたコピー数減少ゲノム領域は、1p (26%)、4q (26%)、5q (33%)、9q (30%)、10q (37%)、11q (41%)、13 (48%) であった。(図 1B) 多くのコピー数上昇は、比較的低いレベルの上昇であっ

たが、コピー数が 5 以上を示した 28 のゲノム領域を同定した。ホモ接合性のコピー数減少を示唆する領域は認めなかった。複数の症例で DNA コピー数は正常だが LOH 認めるゲノム領域も 2 か所同定した。これらのコピー数異常について GISTIC アルゴリズムを用いると、統計学的に有意な異常は、10 か所のコピー数増加ピークと 11 か所のコピー数減少ピークに絞られた。(図 2A) ジャーミノーマと NGGCT を別々に解析したところ、多くのコピー数異常ピークは両型で認められたが、いくつかの型型特異的なコピー数異常ピークが認められた。染色体 2q22.2、8q13、7p15.1、14q11.2 のコピー数増加および 5q14.3 のコピー数減少は、ジャーミノーマのみに認めた。一方、5q32 のコピー数減少は NGGCT のみで認めた。同様の傾向は検証用コホート中の 21 例 SNP マイクロアレイ解析でも認めた。SNP マイクロアレイ解析による結果を確認するために、qPCR 法を用いて代表的なコピー数異常ゲノム領域のコピー数を定量したところ、二つの方法による結果は高い一致率 (75-88%) を示した。

### 【考察】

iGCT 腫瘍ゲノムの DNA コピー数異常および LOH パターンの SNP マイクロアレイ法による網羅的解析を最大規模で報告した。過去に用いられた比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 法を用いた 2 つの研究報告よりも、高感度かつ高解像度の解析を行うことに成功した。今回の研究で過去に報告された主要なゲノム異常部位をより詳細なゲノム領域として確認し、かつ小さなゲノム領域に局限した異常を多く同定した。そのうちの一つである、8q13.2 のコピー数異常領域には *PRDM14* 遺伝子が存在するが、この遺伝子は始原生殖細胞の分化を制御する重要な転写因子である。近年、本遺伝子の多系と精巣胚細胞腫瘍の発生の関与が示唆されており、*PRDM14* コピー数異常が iGCT の発生に重要な役割を果たしている可能性がある。染色体 12p のコピー数異常は、これまでも iGCT において報告されているが、今回の研究で 12p13 領域のコピー数増加が統計学的に有意な異常として同定された。このゲノム領域には、*CCND2* および *KRAS* が存在する。精原細胞において、*Ras* と *Ccnd2* を過剰発現させると腫瘍化することが知られており、iGCT におけるこの 2 つの遺伝子のコピー数増加は、腫瘍発生との関与を示唆する。統計学的有意なコピー数減少を認めた 13q12 領域に存在する *RB1* のコピー数減少は、*CCND2* のコピー数増加とともに、Cyclin/CDK-RB-E2F 経路の iGCT における重要な役割を果たしていることを示唆する。X 染色体のコピー数増加は iGCT を含む様々な胚細胞腫瘍で認める。我々の研究では、男性患者の iGCTs 腫瘍ゲノムにおいてコピー数増加を認めた。先天性染色体異常症である Klinefelter 症候群 (XXY) 患者で iGCT の発生率が高いことから、iGCT における X 染色体のコピー数増加は、iGCT の発生における重要な役割を果たしていると考えられる。

### 【結語】

iGCT の DNA コピー数異常と LOH パターンの網羅的解析を最大規模で報告し、本

腫瘍のゲノム異常を明らかにした。GISTIC アルゴリズムによって、分析を用いて、亜型特異的異常を含む、統計的に有意なコピー数異常ゲノム領域が同定された。*CCND2* と *RB1* の高頻度のゲノム異常は、Cyclin/CDK-RB-E2F 経路が iGCT の病因に重要な役割を果たす可能性を提示した。*PRDM14* の高頻度のコピー数増加は始原生殖細胞の分化の転写因子による制御が、本腫瘍にとって生物学的に重要な機能かもしれないことを示唆した。