

論文内容要旨

TERT promoter region rearrangements analyzed
in high-risk neuroblastomas by FISH method and
whole genome sequencing

(FISH法と全ゲノムシーケンスによる予後不良の神経
芽腫における *TERT* プロモーター領域再構成の解析)

International Journal of Clinical Oncology, 2020, in press.

主指導教員：檜山 英三教授
(自然科学研究支援開発センター 生命科学)

副指導教員：高橋 信也教授
(医系科学研究科 外科学)

副指導教員：大毛 宏喜教授
(広島大学病院 感染症学)

河島 茉澄

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

背景：神経芽腫は代表的な小児の悪性固形腫瘍のひとつである。神経芽腫の中には、自然退縮する予後良好群がある一方で、悪性度の高い予後不良群も存在する。腫瘍細胞の遺伝学的、生物学的な特徴によって、神経芽腫の悪性度が決定される。予後不良の神経芽腫は、*MYCN*増幅を認め、テロメラーゼの活性化や *alternative lengthening of telomeres* (*ALT*) によってテロメアの安定化を獲得している。近年、*TERT*遺伝子のプロモーター領域の再構成でテロメラーゼを活性化し神経芽腫の予後不良群の一因子となることが注目されている。しかし、*TERT*プロモーター領域再構成は、全ゲノムシーケンスなど高度な手法で検討されてきており、臨床例で実用的な判定方法は開発されていない。そこで、簡便な手段として、*FISH*法による *TERT*プロモーター領域再構成の検出の可能性について検討した。

方法：広島大学病院で治療を行った神経芽腫 14 例の切除検体で *FISH*法を行った。病期は国際神経芽腫リスクグループ分類 (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System* : *INRGSS*)分類により評価した。14 例の内訳は、病期 M かつ *MYCN*増幅が 3 例、病期 M かつ *MYCN*増幅なしが 8 例、病期 MS が 1 例、病期 L2 かつ 18 カ月未満が 1 例、病期 L2 かつ 18 カ月以上が 1 例とした。14 例中、男児 11 例、女児 3 例で、平均月齢は 36.4 か月 (1-122 か月)であった。これらの症例を対象に、腫瘍 DNA を用いた *MYCN*増幅の検討に加え、腫瘍 RNA を用いて *TERT*発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法で検討し、内部標準として *GAPDH*の発現レベルで補正した。*TERT*プロモーター領域再構成は、神経芽腫症例の摘出腫瘍の初代培養細胞を用いて、Agilent 社の the Agilent *FISH* General Purpose Reagents protocol with overnight hybridization による *FISH*法で評価した。*FISH*プローブは *TERT*遺伝子の上流と下流にそれぞれ約 400kbp の範囲に設計し、Cy3 と Cy5 でラベルした。*FISH*法で再構成ありと判断したサンプルは、全ゲノムシーケンスにより、再構成の部位を特定し、更にサンガーシーケンスで再構成部位を確認した。

結果：神経芽腫 14 例中 2 例で、*FISH*法にて Cy3 と Cy5 の蛍光が分離したことから、可視的に *TERT*プロモーター領域再構成ありと判定した。この 2 例は、どちらも予後不良群であったが、*MYCN*増幅は認めなかった。また、*TERT*発現レベルは、4513 と 5359 copies で、2 例とも著明に高値で、*TERT*プロモーター領域再構成を認めなかった症例 (0-139.5 copies : 平均 53.6 copies) の *TERT*発現レベルと明らかな差を認めた。全ゲノムシーケンスによると、遺伝子転座が 5 番染色体にみられ、*FISH*法の結果と合致した。1 例は 5 番染色体の *TERT*上流にある *SLCA6A19*遺伝子と 22 番染色体の転座であり、もう 1 例は *TERT*下流から 5 番染色体上での転座を認めた。これらの遺伝子転座は、サンガーシーケンスの結果、腫瘍組織のみで認められ、正常組織では認められなかった。

考察：*TERT*プロモーター領域再構成は、予後不良の神経芽腫の一部で認められた。*MYCN*増幅は、神経芽腫の予後不良因子として以前から知られているが、今回、*TERT*プロモーター領域

再構成をみとめた 2 例は、いずれも *MYCN* 遺伝子の増幅を認めなかった。さらに、2 例とも *TERT* 発現レベルは高く、*TERT* プロモーター領域再構成が *TERT* 発現を増強していることが示された。*MYCN* も *TERT* のプロモーター領域に結合して *TERT* 発現を増強するが、この 2 例では *MYCN* 増幅がないことから、*MYCN* 増幅と *TERT* プロモーター領域再構成は、それぞれ *TERT* 発現への独立した活性化因子である可能性が示唆された。神経芽腫においてテロメアバイオロジーの解析は重要であり、*TERT* 発現増強によるテロメラーゼの活性化をへてテロメアの安定化することで、神経芽腫は予後不良群として悪性度を獲得していくものがあると考えられた。

以上から、*TERT* プロモーター領域再構成はこのテロメアバイオロジーにおいて、重要な要素のひとつである。今回の検討から、FISH 法は *TERT* プロモーター領域再構成の判定に有用であると考えられた。この後、FISH 法を簡便な手技にするには、腫瘍組織切片そのもので評価可能とすることが必要であると考えられた。