

令和元年6月26日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09678

研究課題名(和文) DNA損傷修復因子を用いた小児がん治療関連合併症のバイオマーカー確立と診断応用

研究課題名(英文) An approach to establish pediatric hereditary cancer-related biomarkers applying DNA damage repair factors

研究代表者

服部 浩佳 (Hattori, Hiroyoshi)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・室長

研究者番号：20624513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性腫瘍の原因遺伝子の多くはDNA損傷修復に関わっているため、再発や2次がんのリスクが高くなる。この遺伝子変異は、疾患リスク評価を正確に行うための一種のバイオマーカーになり得る。小児がんは遺伝性腫瘍の可能性が高く治療成績と家族の健康管理の向上が最も重要である。網膜芽細胞腫をモデルとしてRB1の遺伝学的検査による再発リスク層別化を推進した。本邦では今まで行われてこなかった片眼性網膜芽細胞腫の遺伝学的検査を実臨床に導入し、リスクに応じたフォローアップの提供を実用化した。遺伝力カウンセリングも応用し患者家族への適切な遺伝情報提供方法も検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム研究の進歩は著しく、がんゲノム医療が実際に健康保険適応となり、がん組織の遺伝子検査の結果が治療に結び付く時代となってきた。しかし、DNA損傷修復遺伝子に生殖細胞系列変異を持ついわゆる遺伝性腫瘍の遺伝子の変化を患者さんの治療や検診に応用することはまだ遅れている。特に日本は「遺伝」については慎重であり、臨床応用が遅れている。そこで遺伝性腫瘍のモデルと言われている目に起こる小児がん、網膜芽細胞腫をモデルにして、生殖細胞系列遺伝子変異を検査することで実際の患者さんの治療や検査に役立てることを目標にした研究である。

研究成果の概要(英文)：Many of the hereditary tumor responsible genes are involved in DNA damage repair, resulting in the higher risk of recurrence and second cancers. This genetic alteration can be a biomarker, which enable us to assess the risk for cancer development. Childhood cancer is likely to be a hereditary tumor, and improvement of treatment outcome and family health management are the most important issues. The retinoblastoma as a model to stratify the disease risk by genetic testing of RB1. We introduced genetic testing for unilateral retinoblastoma into clinical practice, which has been rarely conducted in Japan until now. We established the follow-up strategy according to the genetic risk of the RB patients. We also offered genetic counseling and addressed the appropriate methods for providing genetic information to the patient families.

研究分野：遺伝性腫瘍

キーワード：遺伝性腫瘍 網膜芽細胞腫 遺伝カウンセリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

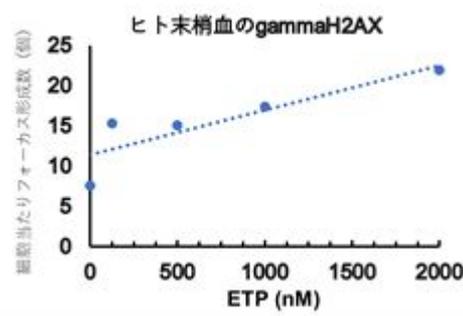
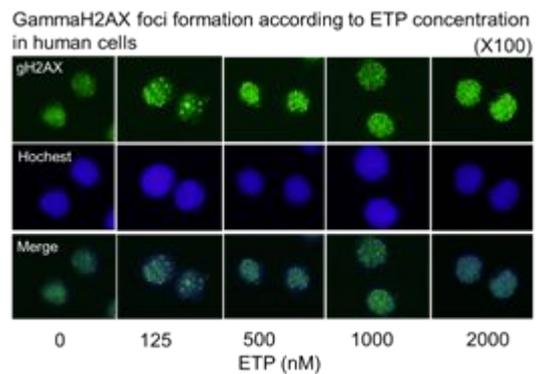
## 1. 研究開始当初の背景

### 小児がんにおける治療強化による生存者の増加と合併症の増加

小児がんにおける長期生存率は化学療法を中心とする集学的治療法の進歩により飛躍的に改善した一方で、強化された抗がん剤治療による正常臓器に対する毒性の増強のために種々の合併症が増加する傾向にある。また長期生存者の増加により2次がんを含む様々な晩期合併症が問題となっている。正常組織臓器の化学療法や放射線療法への感受性は多様性があり、治療関連合併症にはそれぞれの治療の特異性だけではなく、DNA損傷薬剤に対する個々の遺伝学的素因も強く関与していると考えられた。そこで臨床的リスク因子に加えて、DNA損傷修復に関わる遺伝学的素因を明らかにすることで、治療関連合併症の早期診断と治療戦略への足がかりをつかむことが可能になると考えた。

### 小児がんの治療合併症におけるDNA損傷・修復バイオマーカー

DNA損傷修復に関わる遺伝学的素因を反映するバイオマーカーとして、申請者が今まで分子遺伝・細胞遺伝学的解析に用いてきた(Hattori H et al. Mol Cancer Ther 2011; Mahen R et al. PLoS One 2013)、gammaH2AX、RAD51をそれぞれDNA損傷・修復の特異的なマーカーとして臨床検体に応用することを計画した。目的は、小児がん患者において生体内でのDNA損傷修復を忠実に捉える解析系を確立することで、より実際の患者に則した臨床応用の基盤となる知見を得ることであったが、実際にヒト末梢血リンパ球を用いたgammaH2AX測定系の樹立においては感度と測定レンジの設定に問題が生じた。これを解決するため種々の方法を試みたが、臨床検体において細胞内リン酸化を定量的に測定することは技術的に克服不可能であった。RAD51の場合はリン酸化ではなく、フォーカス形成をFlowcytometryで捉える必要があったが、前例となる報告がなくその樹立はさらに困難であることが明らかとなったためにこれを断念し、以下に述べるDNA損傷修復と遺伝学的素因に着目することに方針を変更した。



### 小児がんにおけるDNA損傷修復に関わる遺伝学的素因による臨床的リスク因子の予測

家族性腫瘍等のがん易発症素因をもつ患者を対象にした臨床研究とした。家族性腫瘍の原因遺伝子はそのほとんどがDNA損傷修復に関わる遺伝子であり、生殖細胞系列にそれらの変異を持つことが家族性腫瘍の特徴である。これに関してはまず遺伝学的検査を行い、DNA損傷修復や細胞周期に関わる遺伝子に変異が同定された家族性腫瘍の患者とそうでない患者と比べて違いがあったかどうかの後方視的な検討を行う方針とした。

## 2. 研究の目的

小児遺伝性腫瘍を対象とし、DNA修復に関わる遺伝子により規定される遺伝学的素因を明らかにし、これらが臨床的バイオマーカーになりうるか否かを検証し、患者にとって有益な臨床検査(臨床的バイオマーカー)の開発につながることを目標とする。

## 3. 研究の方法

小児がん患者は遺伝学的バックグラウンドを持つ場合が多いため、小児がんの発症、再発、2次がん発症に関わる臨床的バイオマーカーを見出していた。研究者は遺伝カウンセリングにも従事しているので、患者家族にどのように遺伝性腫瘍の遺伝情報を提供し、患者家族の健康管理にいかに関与するかという視点からの研究も取り入れた。最終的には小児がんの治療成績の向上、さらに長期にわたる健康管理の向上、につなげることが最も重要であると考えており、この目的のために網膜芽細胞腫をモデルとしてRB1の遺伝学的検査による再発リスク層別化とサーベイランスを研究の中心にして推進した。本邦では今まで一般的には行われていなかった片眼性網膜芽細胞腫の遺伝学的検査を実臨床に導入し、個々の患者の再発(三側性網膜芽細胞腫)リスクを層別化し、それぞれの再発リスクに応じたフォローアップを提供することを実用化した。具体的

#### 方法

- 初発および治療終了経過観察中の片眼性網膜芽細胞腫の患者に対してRB1遺伝学的検査の提供を2016年から開始した。
- RB1遺伝学的検査を受ける際には遺伝カウンセリングを必須とし、原則として、両親にその出席を求めた。遺伝カウンセリングは検査前と結果開示の2回を基本とした。
- RB1生殖細胞系列変異の同定は以下の3つの方法を併用した。
  - Genomic DNA- or RT-PCR/Direct sequencing
  - MLPA
  - NCC oncopanel FC v2.0 (SureDesign custom probe, Agilent)
- RB1病的バリエーションがなかった場合には頭部MRI検査を中止した。一方、病的バリエーションが同定された患者は両眼性に準じたフォローアップを継続した。

は三側性網膜芽細胞腫のサーベイランス検査である全脳 MRI の適応決定に遺伝学的層別化を導入した。

#### 4. 研究成果

##### RB1 遺伝学的検査による片眼性網膜芽細胞腫のリスク層別化

表1. 患者背景

n=26	
診断時年齢 (月齢) (中央値; 範囲)	12; 2-53
男/女	13/13
治療	
眼球摘出術 (あり/なし)	23/3
化学療法 (あり/なし)	23/3
遺伝カウンセリング (あり/なし)	16/10
遺伝学的検査 (あり/なし)	15/11

表2. 遺伝カウンセリングの有無に影響した因子

n=26	遺伝カウンセリング	
	あり	なし
診断から情報提供までの期間* (月: 中央値/範囲)	4 0-304	40 23-91
治療状況**		
治療中	10	0
治療終了後	6	10
同胞		
あり	9	5
なし	7	5
合計	16	10

\*p=0.002 (Mann-Whitney U Test), \*\*p=0.003 (Fisher's exact test)

表3. RB1病的バリエーションの詳細と家族への対応

No	月齢 (月)	RB1 バリエーション	家族のSegregation study
1	25	c.1588_1589delAA splice out of first 93bp in exon 17 ⇒binding pocket domain Aの欠損	両親 検査の希望なし
2	51	c.1422-2A>G exon 16 skipping ⇒低浸透率変異として報告あり	両親 RB1病的バリエーション陰性 眼底検査にて網膜腫なし
3	11	c.2325+5G>A exon 22 skipping ⇒Cyclin-like superfamily domain 欠損(生殖細胞系列モザイク変異)	なし
4	5	c.1642A>T; p.548X 生殖細胞系列モザイク変異	なし

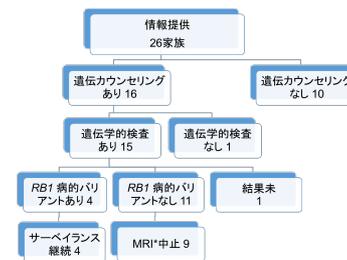


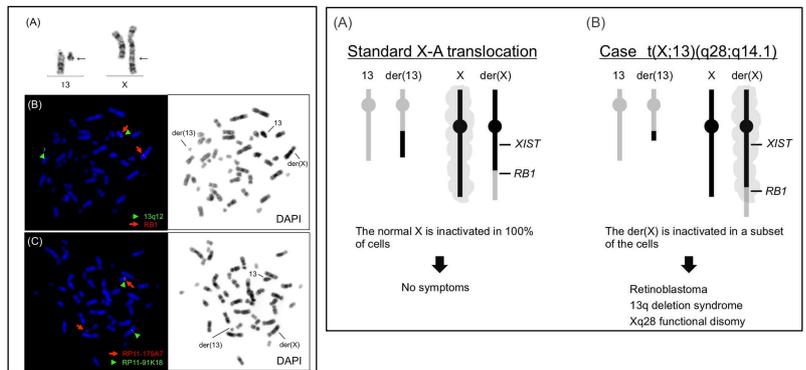
図1. 遺伝学的評価と患者転帰

片眼性網膜芽細胞腫の実地臨床において RB1 遺伝学的検査を導入して患者の遺伝学的リスクに基づいた適切なフォローアップ (サーベイランス) を行うことを目的とした (表1)。15 例中、4 例の RB1 病的バリエーションが見つかり、治療終了後に松果体嚢胞が見つかった 1 例を除いて 9 例ではフォローアップの MRI 検査の軽減が可能であった (図1)。診断から情報提供までの期間が短いほど遺伝カウンセリング (遺伝学的検査) を希望する家族が多かった。治療中の方が治療終了後よりも遺伝学的検査も希望が多かった (表2)。低浸透率変異、モザイク変異といった、典型的な RB1 バリエーションとは異なるスペクトラムが確認された (表3)。フォローアップの基準としては遺伝子バリエーションの種類によって差はつけてはいないが、遺伝カウンセリングでは、低浸透率変異の可能性には触れた。各バリエーションにおける病的意義の正確な評価が重要である。

#### X;13 均衡型相互転座を伴い RB1 遺伝子に切断点がない網膜芽細胞腫患者の分子遺伝学的解析

網膜芽細胞腫の原因遺伝子であるがん抑制遺伝子 RB1 は 13 番染色体長腕の 13q14 に位置する。発達遅滞を伴う網膜芽細胞腫患者が生殖細胞系列に相互転座

46, X, t(X;13)(q28;q14.1)を示しており、1歳で両眼性網膜芽細胞腫と診断された。転座の種類は均衡型であったために、当初転座に伴う微細欠失が発達遅滞の原因となっていたと予想された。ところが、FISH 法による転座切断点の解析を行った結果、切断点は RB1 遺伝子やその調節領域にはなく、約 12~15 Mb セントロメア側の 13q13 に位置した。また、アレイ CGH 解析で近傍にコピー数異常は認められなかった。通常、X-常染色体転座を持つ場合は正常 X 染色体が 100%不活化されるが、末梢血由来 DNA を用いた HUMARA アッセイでは、X 染色体不活化の選択的な偏りは認められなかった。従って der(X) において X 染色体の不活化の影響で RB1 が不活化している可能性が考えられた。パイサルファイト処理によるメチル化解析を行ったところ、RB1 プロモーターは一部の分子でメチル化されていた。また、メチル化は切断点から 13q21.33 まで広範囲に認められた。以上の結果から、患者は der(X) の不活化による RB1 の発現不全が 1st hit となって網膜芽細胞腫を発症し、13 番染色体短腕上の遺伝子発現の低下が 13q-症候群と同様の発達遅滞の原因となっていることが示唆された。



#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Wakasa K, Kawabata R, Nakao S, Hattori H, Taguchi K, Uchida J, Yamanaka T, Maehara Y, Fukushima M, Oda S. Dynamic modulation of thymidylate synthase gene expression and

fluorouracil sensitivity in human colorectal cancer cells. PLoS One 2015; 10: e0123076. 10.1371/journal.pone.0123076. (査読有)

Nemoto M, Hattori H, Maeda N, Akita N, Muramatsu H, Moritani S, Kawasaki T, Maejima M, Ode H, Hachiya A, Sugiura W, Yokomaku Y, Horibe K, Iwatani Y. Compound heterozygous TYK2 mutations underlie primary immunodeficiency with T-cell lymphopenia. Sci Rep. 2018; 8: 6956. 10.1038/s41598-018-25260-8. (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

服部浩佳. 当院の小児固形腫瘍患者における家族性腫瘍症候群とその対応について. 第22回日本家族性腫瘍学会学術集会 2016年

Hattori H et al. Integration of Genetic Testing for Unilateral Retinoblastoma in Clinical Practice - A Single Institutes Experience in Japan- The 12th Meeting of The UK Eye Genetics Group & the 20th Meeting of The International Society for Genetic Eye Diseases & Retinoblastoma (国際学会) 2017年

服部浩佳. The implications of RB1 genetic testing for the patients with unilateral retinoblastoma (片眼性網膜芽細胞腫に対するRB1遺伝学的検査の意義) 第59回日本小児血液・がん学会学術集会 2017年

服部浩佳 遺伝学的検査を行った小児家族性腫瘍の6例 第23回日本家族性腫瘍学会学術集会 2017年

服部浩佳. ガンゲノム医療における遺伝カウンセリングの重要性 第72回国立病院総合医学会(招待講演) 2018年

Hattori H. Risk Stratification of Unilateral Retinoblastoma Patients with the RB1 Genetic Testing. The 50th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) (国際学会) 2018年

服部浩佳. RB1遺伝学的検査による片眼性網膜芽細胞腫のリスク層別化 第24回日本家族性腫瘍学会学術集会 2018年

堤真紀子、服部浩佳、倉橋浩樹 他

X;13均衡型相互転座を伴いRB1遺伝子に切断点がない網膜芽細胞腫患者の分子遺伝学的解析 日本人類遺伝学会第63回大会・2018年

服部浩佳. 網膜芽細胞腫に続発した二次性骨肉腫の2例 第25回日本家族性腫瘍学会学術集会 2019年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 堀部 敬三

ローマ字氏名: Horibe Keizo

所属研究機関名: 独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)

部局名: その他部局等

職名: 臨床研究センター長

研究者番号(8桁): 30209308

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田口 育

ローマ字氏名：Taguchi Iku

研究協力者氏名：堤 真紀子

ローマ字氏名：Tsutsumi Makiko

研究協力者氏名：久保田 敏信

ローマ字氏名：Kubota Toshinobu

研究協力者氏名：前田 尚子

ローマ字氏名：Maeda Naoko

研究協力者氏名：森川 真紀

ローマ字氏名：Morikawa Maki

研究協力者氏名：齋藤 祐子

ローマ字氏名：Saito Yuko

研究協力者氏名：佐藤 工

ローマ字氏名：Sato Ko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。