

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2020

課題番号：16K10011

研究課題名（和文）毛様細胞性星細胞腫微小残存病変の検出と臨床応用

研究課題名（英文）Detection and clinical application of pilocytic astrocytoma minimal residual disease

研究代表者

渡辺 祐子（Watanabe, Yuko）

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医師

研究者番号：40610671

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：BRAF V600E変異退形成性星細胞腫の髄液cfDNAを用いたリキッドバイオプシーに内容を変更した。低頻度変異を検出するためdigital PCR法とBNAクランプ法、サンガーシークエンシスの両者の評価法を用いた。検体はBRAF V600E陽性の退形成性星細胞腫髄液で、陰性コントロールは原発性中枢リンパ腫、BRAF陰性脳腫瘍の髄液、陽性コントロールはBRAF陽性腫瘍由来ctDNAを用いた。髄液上清からcfDNA抽出され、腫瘍由来と考えられるBRAF V600EがdPCRで検出された。BNA添加では変異頻度の低いBRAF V600Eを検出できたが、BNA添加しない場合は変異検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児脳腫瘍では生検困難もしくは高リスクの場合があり、生検では腫瘍の一部しか評価できないためliquid biopsyではこれらを克服できる可能性がある。低頻度変異を検出するためdigital PCR法とBNAクランプ法、サンガーシークエンシスの両評価法を用い、BNA添加では変異頻度の低いBRAF V600Eを検出できたがBNA添加しない場合は変異検出されなかった。今回、BNAクランプ法を用いることでBRAF V600E変異退形成性星細胞腫の髄液cfDNAを用いたリキッドバイオプシーが可能であった。今後は画像診断困難な術後変化や放射線治療後と腫瘍との鑑別、再発の早期発見に利用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The content was changed to liquid biopsy using cerebrospinal fluid cfDNA of BRAF V600E mutant anaplastic astrocytoma. Both the digital PCR method, the BNA clamping method, and the Sanger sequence evaluation method were used to detect low-frequency mutations. The sample was BRAF V600E-positive anaplastic astrocytoma cerebrospinal fluid, the negative control was the cerebrospinal fluid of primary central lymphoma and BRAF-negative brain tumor, and the positive control was ctDNA derived from BRAF-positive tumor. Cerebrospinal fluid supernatant was extracted with cfDNA, and BRAF V600E, which is thought to be of tumor origin, was detected by dPCR. BRAF V600E, which has a low mutation frequency, could be detected with BNA addition, but no mutation was detected without BNA addition.

研究分野：小児腫瘍、小児脳腫瘍

キーワード：リキッドバイオプシー 神経膠腫 BRAF V600E BNAクランプ法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

毛様細胞性星細胞腫は、小児脳腫瘍最多で無病再発生存率が低い。非摘出例では化学療法を選択し、画像推移で治療中止時期を考える。しかし、画像診断の限界として、腫瘍サイズは単調に増大せず、嚢胞を含み、思春期に増大停止しても自然経過か治療効果か判断し難く、サイズからは進展を容易に判断できない。実際、治療期間は6カ月-14カ月と主治医判断になる弱点があった。

### 2. 研究の目的

上記の背景より、血漿核酸を用いた微小残存病変 (MRD) 検出を行う。本腫瘍では高頻度体細胞変異として BRAF-KIAA、BRAFV600E 変異があり、全体の 90%以上がいずれかを有する。経時的に血漿をとり、次世代シーケンスで定量的に変異アレル割合を検討する。本研究では、MRD 推移と画像評価、症状を統合し、この血漿マーカーを治療選択に生かせるか、腫瘍進展との関連を判断したいと考えた。

### 3. 研究の方法

神経膠腫は臨床的な悪性度に応じて、WHO 分類でグレード から に分類される。今回は、0 歳から 21 歳の初発、再発毛様細胞性星細胞腫症例 (グレード ) の腫瘍と血漿を対象とする。目標症例数は 50 例とする。既存の報告にある、KIAA1549-BRAF 融合遺伝子 : KIAA exon16 と BRAF exon9 (K16-B9) 同様に K15-B9、K16-B11、KIAA1549 exon15-BRAF exon11 reverse、BRAF V600E、そして BRAFV600E と同様に悪性転化時に高発現している CDKN2A 欠失をターゲットとする。研究期間を通じ、検体は提供者の同意を得て取得し利用する。

1. 摘出腫瘍検体より、 にある BRAF-KIAA 融合遺伝子、BRAF V600E、そして CDKN2A を、次世代シーケンスにて定量的に解析する。2. 腫瘍摘出時に採取した血漿および髄液を用いて MRD を検出する。3. 摘出術後の血漿核酸が減少しているか定量し比較検討する。4. 研究が計画通り進まず上記変異を MRD 検出できない場合には、CGH アレイによりコピー数が増加している変異を検出し、比較する。5. 治療終了時のマーカーとして、MRD と画像のいずれが優れるか比較する。Ion PGM&#8482; Hi-Q&#8482; Sequencing Kit (Life 社) 融合遺伝子検出に適した Ion reporter Software を使用し、迅速に行う。すでに、大腸がん和肺がんについて、RAS 経路のパネルが確立している。FISH 結果と合わせると 98.4%の正確さであるとされている。当大学実験室に配備している。MiSeq sequencings system (illumina 社) ペアエンド法により高精度での検出を狙う。Human genome CGH マイクロアレイ (Agilent technology 社) 標的遺伝子から MRD 検出できなかった場合には、ヒトゲノム全体で DNA コピー数の変化をプロファイリングする。

上記を当初の研究方法としたが、研究に適した症例集積が進まなかったために、以下のように目的を、BRAF V600E 変異退形成性星細胞腫の髄液 cfDNA を用いたリキッドバイオプシーへ変更した。

検体は、BRAF V600E 陽性の小児の退形成性星細胞腫瘍のオンマイヤーリザーバーより採取した髄液とした。陰性コントロールとして PCNSL (primary central nervous system lymphoma) の髄液由来の cfDNA および、BRAF 陰性脳腫瘍症例 (髄芽腫など) の髄液由来の cfDNA を使用した。検証および陽性コントロールとして BRAF V600E 陽性腫瘍由来 DNA (ctDNA) を使用した。遠心後 supernatant と pellet に分離し、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) のプロトコールに準じて cfDNA を抽出し、cfDNA の確認には Bioanalyzer system (Agilent) を使用した。低頻度変異を検出するため digital PCR 法と BNA クランプ法、サンガーシーケンスの両者の評価法を用いることとし、BRAF TaqMan dPCR Liquid Biopsy Assay (ThermoFisher) と QuantStudio 3D Digital PCR system、BRAF BNA Real-time PCR kit (Riken Genesis) の BNA と primer を使用した。

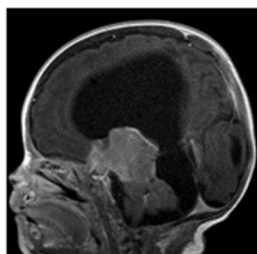
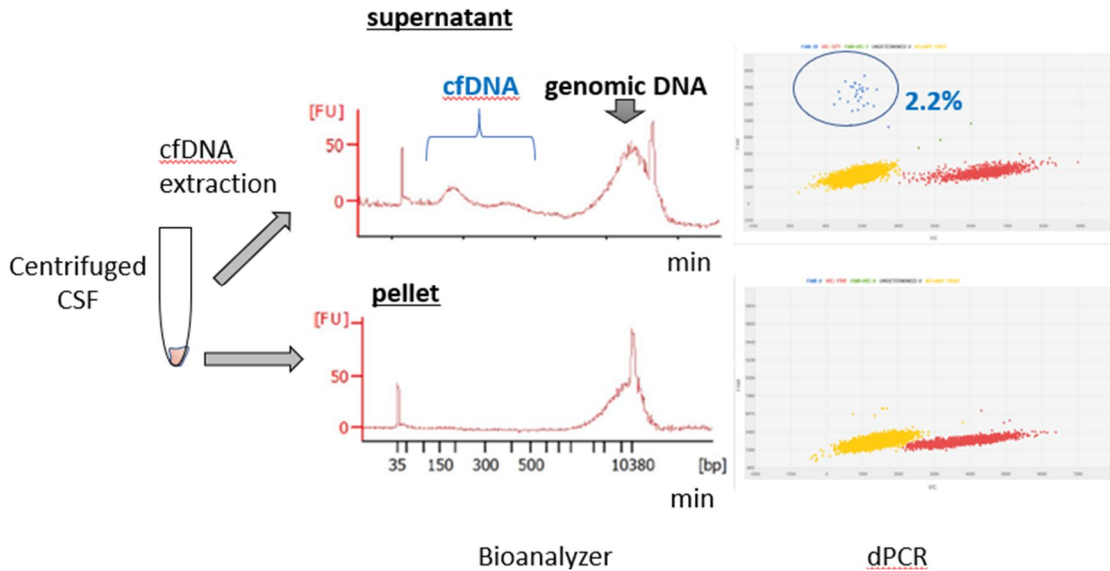


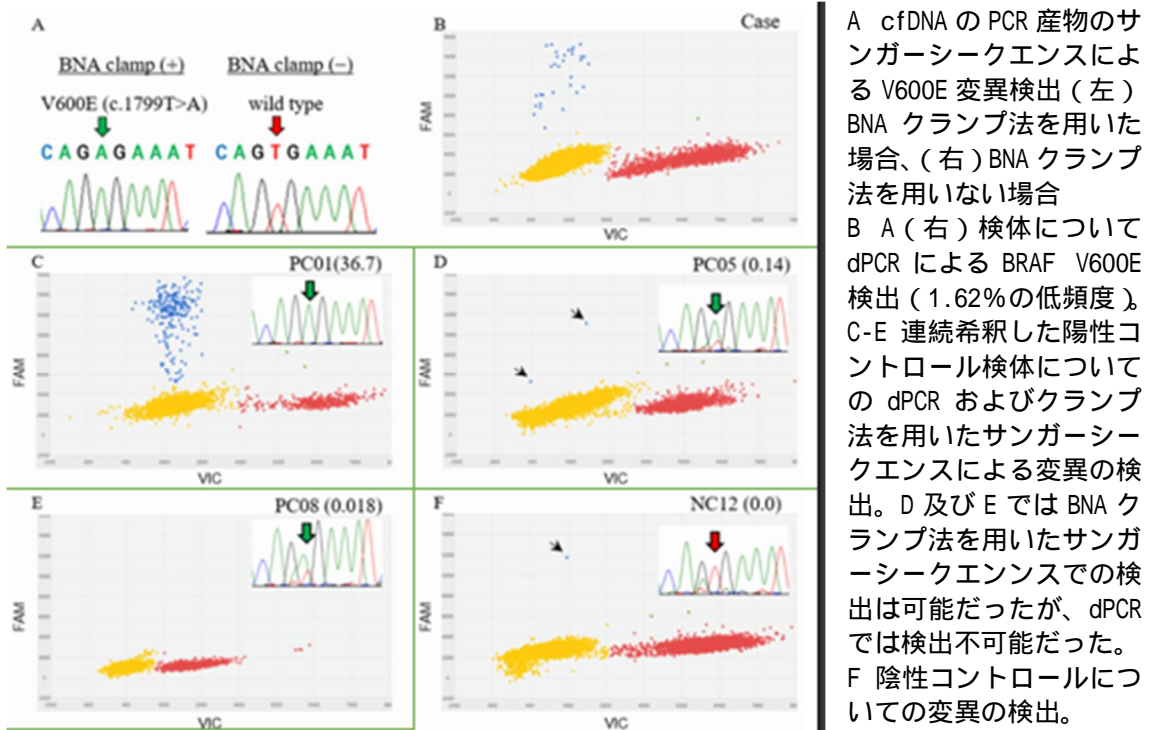
図 : BRAF V600E 変異陽性退形成性星細胞腫

### 4. 研究成果

髄液上清から cfDNA が抽出され、腫瘍由来と考えられる BRAF V600E が dPCR で検出された。



BNA 添加では変異頻度の低い BRAF V600E を検出できたが、BNA 添加しない場合は変異検出されなかった。すなわち、BNA クランプ法により野生型に結合する配列をもつ BNA を添加した PCR を行うことで、BRAF V600E 変異退形成性星細胞腫の髄液 cfDNA を用いたリキッドバイオプシーの検出率が上がった。



A cfDNA の PCR 産物のサンガーシーケンスによる V600E 変異検出 (左) BNA クランプ法を用いた場合、(右) BNA クランプ法を用いない場合  
 B A (右) 検体について dPCR による BRAF V600E 検出 (1.62% の低頻度)  
 C-E 連続希釈した陽性コントロール検体についての dPCR およびクランプ法を用いたサンガーシーケンスによる変異の検出。D 及び E では BNA クランプ法を用いたサンガーシーケンスでの検出は可能だったが、dPCR では検出不可能だった。  
 F 陰性コントロールについての変異の検出。

尚、( ) 内の値は各検体の推定変異頻度。

小児脳腫瘍では生検困難もしくは高リスクの場合があり生検では腫瘍の一部しか評価できないが、今回の手法による liquid biopsy によりこれらを克服できる可能性が見いだされた。他に、画像診断困難な術後変化や放射線治療後と腫瘍との鑑別、再発の早期発見に利用できる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshiko Nakano, Yuko Watanabe, Mai Honda-Kitahara, et al.	4. 巻 67:e28651.
2. 論文標題 Utility of a bridged nucleic acid clamp for liquid biopsy: Detecting BRAF V600E in the cerebrospinal fluid of a patient with brain tumor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pbc.28651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分担者	市村 幸一  (Ichimura Kouichi)  (40231146)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長   (82606)	
研究 分担者	中野 嘉子  (Nakano Yoshiko)  (00796005)	東京大学・医学部付属病院・助教   (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------