

令和元年6月18日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11304

研究課題名(和文) 眼部悪性腫瘍における網羅的ゲノム解析と臨床応用への展開

研究課題名(英文) Comprehensive genomic analysis for malignant eye tumors and development for clinical application

研究代表者

後藤 浩 (Goto, Hiroshi)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：10201500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：結膜やぶどう膜組織に発生する悪性黒色腫や眼内および眼付属器に生じる悪性リンパ腫は生命予後を脅かす疾患である。研究代表者の施設は眼部悪性腫瘍を診療する機会が多いため特徴を生かし、眼部悪性腫瘍に対する包括的かつ網羅的なゲノム解析を行った。次世代シーケンサーで解析を行っている眼窩悪性リンパ腫、IgG4関連眼疾患、ぶどう膜悪性黒色腫、眼内リンパ腫を中心に新しい遺伝子異常をみつけることができ、発癌メカニズムの詳細な解明、新たなバイオマーカーの探索、臨床経過との相関(生命予後予測や治療効果判定)と、得られた結果を統合し、個別治療の確立につなげる足掛かりとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

稀少疾患であるが故に本邦では同様の研究はほとんど行われていない。一方、欧米での報告が必ずしも日本人にも当てはまるとは限らず、本邦における独自の検証が必要である。当院は全国で最も眼部悪性腫瘍症例の多い施設のひとつであり、我々は生命予後や診断や再発の新規バイオマーカーになり得るゲノムの網羅的検索を行う責務があると考えている。また、ゲノムの包括的解析を臨床情報と組み合わせることで、発癌経路の解明へと発展していくことも期待される。ゲノムワイドに眼部悪性腫瘍の病態が解明されることで、個々の症例に有用な検査や治療を選択することが可能となれば、医療費の削減効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：Malignant melanomas occurring in the conjunctiva and uveal tissues as well as intraocular and ocular adnexal malignant lymphomas are life threatening diseases. In the applicant's institution, there are many opportunities to diagnose and treat ocular malignant tumors. Utilizing this advantage, we performed comprehensive genome analysis of ocular malignant tumors. Using next generation sequencing, we succeeded to identify novel gene abnormalities in orbital malignant lymphomas, IgG4-related ophthalmic disease, uveal melanomas, and intraocular lymphomas. These findings provide the basis for detailed elucidation of carcinogenic mechanism, search for novel biomarkers, and identifying correlation with the clinical course (prediction of survival prognosis and evaluation of treatment effect). Integration of the above research outcomes will give a foothold for the establishment of individual treatment.

研究分野：眼科学

キーワード：眼悪性腫瘍

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

眼部に発生する悪性腫瘍の中でもリンパ腫と悪性黒色腫は悪性度が高く、放置すれば視機能を失うだけでなく死に至る疾患である。特に眼内悪性リンパ腫やぶどう膜悪性黒色腫の5年生存率は約75%、10年生存率は約50%と生命予後不良な疾患であり、これらの数字については現在でもほとんど改善がみられていない。その最たる理由の一つはこれらが稀少疾患であるが故、世界的にも基礎研究および臨床研究に従事する者が極めて少ないことが考えられる。眼部悪性腫瘍の生命予後改善のためには、早期診断に役立つバイオマーカーの確立や、発癌機構の解明、および新規治療法の開発が必要である。一般に癌は複数のゲノムの変化が腫瘍の発症や進展、再発や治療抵抗性に関与し、その腫瘍としての特性を決定していると考えられることから、こうした遺伝的变化を網羅的に解析し、同定することは、腫瘍の病態のみならず、その治療戦略を考える上で重要である。また、これまでに報告されている眼部悪性腫瘍の主な原因遺伝子の異常は、他臓器癌と共通するものもあるが、例えばぶどう膜悪性黒色腫ではBAP-1遺伝子の突然変異 (Science 2010;330:1410-1413) や BRAF 遺伝子の突然変異を根拠に、BRAF 阻害剤および MAPK 阻害剤が開発されたように、ある種の眼部悪性腫瘍では特徴的な遺伝子異常を基盤にした個別化医療も試みられつつある (N Engl J Med. 2012;367:1694-703)。ただし、欧米で解明され、開発されたこれらのデータと治療薬が、そのまま日本人にも適応し奏功するとも限らない。すなわち、ゲノムワイドな変異情報を独自に、かつ包括的に解明していくことが求められている。

悪性腫瘍におけるゲノムの異常には、1)mRNA 発現異常 (Transcriptome 解析)、2)ゲノムコピー数異常解析 (高密度ヌクレオチドアレイ解析)、3)ゲノムの異常メチル化、4)microRNA の発現異常などのパラメータが存在し、それぞれの網羅的解析が多くの悪性腫瘍で行われている。このように個々の症例のゲノム異常の解析が複数のパラメータで評価されるようになってきており、データを統合して評価する必要性も高まっている。

2. 研究の目的

ゲノムの網羅的検索の方法は多岐に渡るため、cDNA マイクロアレイ、マイクロ RNA アレイ、高密度オリゴヌクレオチドアレイ、次世代シーケンサーを用いた解析に絞る。眼部悪性腫瘍についてもリンパ腫と悪性黒色腫に対象疾患を限定する。マイクロアレイにより高率に発現する遺伝子や、次世代シーケンサーにより検出された高率に変異する遺伝子を抽出し、遺伝子産物の臨床病理学的重要性の検証や、眼内液および血清中レベルでのタンパク質の同定も行う。また、得られた包括的データと眼部悪性腫瘍の臨床像や生命予後などの臨床データとの関連を解析し、臨床像との関連や新規診断マーカーとしての可能性や生命予後推定因子としての意義について明らかにする。

3. 研究の方法

結膜やぶどう膜組織に発生する悪性黒色腫や眼内および眼付属器に生じる悪性リンパ腫は生命予後を脅かす疾患であるが、稀少な疾患であるため他臓器の悪性腫瘍と比較して研究の立ち遅れは否めない。研究代表者の施設は眼部悪性腫瘍を診療する機会が非常に多い特徴を生かし、ポストシーケンス時代のゲノム科学環境のもと、まずは眼部悪性腫瘍に対する包括的かつ網羅的なゲノム解析を行うことを目的とした。

4. 研究成果

初年度では IgG4 関連眼疾患において病原微生物の網羅的解析を行い、HHV-6、HHV-7、EBV が抗原として病態に関与している可能性 (Sci Rep. 2016) を報告した。また、ぶどう膜悪性黒色腫における眼内液中のサイトカインを網羅的解析を行った結果、Angiogenin、MCP-1、IL-8 が診断マーカーになりえることを報告した (Graefe Arch Clin Ophthalmol. 2017)。次年度では、眼窩に生じるリンパ増殖性疾患、なかでも低悪性度リンパ腫 (MALT リンパ腫)、反応性リンパ組織過形成 (RLH)、IgG4 リンパ関連増殖疾患 (IgG4) の診断は、臨床的には画像診断検査を駆使しても鑑別はほぼ不可能であり、生検後の病理組織学的検索においても形態学的な類似性を示すことから診断に苦慮することがある。免疫組織化学染色は鑑別に有用なテクニックであるが、定性的な評価にとどまり、時に評価に難渋することがある。そこで、各疾患の生検組織を用い、免疫学的表現型の発現パターンをフローサイトメトリーで網羅的に検索を行い、病理組織学的に比較検討を行った結果、CD 23 および CD25 がマーカーとして鑑別に有用であることを報告した (Jpn J Ophthalmol. 2017)。現在 IgG4 関連眼疾患において、TRIOBP、INF2 など新規遺伝子変異を同定し論文執筆中である。

現在は眼窩悪性リンパ腫 6 検体、IgG4 関連眼疾患 12 検体、ぶどう膜悪性黒色腫 6 検体、眼内リンパ腫 3 検体に対して次世代シーケンサーを用いて遺伝子変異の網羅的検索を行っている。次世代シーケンサーにより検出された高率に変異する遺伝子を同定できた。特に FMN2、GLTSCR1、INF2、TFAP2A、TRIOBP、TTC19、XIST では、末梢血および口唇粘膜をコントロールとしても全例で遺伝子変異を認めた。

次世代シーケンサーを用いた RNAseq では生検組織に発現する RNA を網羅的かつ定量的に解析でき、未知なる遺伝子発現の異常を検出することができる。そこで、IgG4 関連眼疾患における生検組織中の RNA 発現量を、組織近傍に存在する脂肪組織をコントロールとして比較検討した (図 1)。結果、IgG4 関連眼疾患の生検組織と脂肪組織を比較すると extracellular matrix organization ($p=2.2 \times 10^{-16}$)、degradation of the extracellular matrix ($p=3.4 \times 10^{-11}$)、ECM proteoglycans ($p=1.1 \times 10^{-10}$)、Complement cascade ($p=1.8 \times 10^{-5}$) など細胞外マトリクスや

免疫システムに関連する経路で有意な関連が示され、221 遺伝子で発現に差がみられた。以上より、IgG4 関連眼疾患の生検組織において、細胞外マトリックス、B 細胞の発達、EBV に関連した遺伝子発現の増強がみられた。今後は、これらを Real-time PCR を用いて確認を行っていく。

IgG4 関連疾患の発症には IgG4 を産生する CD19+CD24-CD38+ の形質芽細胞が重要な役割を果たしていることが報告されている (Arthritis Research Therapy. 2014&2017)。我々は、IgG4 関連眼疾患と眼窩 MALT リンパ腫の CD19, CD24, CD38 発現パターンについてフローサイトメトリーを用いて検討を行った。その結果、IgG4 関連眼疾患では眼窩 MALT リンパ腫と比較して CD19+CD24-CD38+ の形質芽細胞の割合が生検組織中で有意に高かったが、末梢血では有意な差はみられなかった。メモリー B 細胞である CD19+CD24+CD38- やナイーブ B 細胞である CD19+CD24intCD38int の割合については組織および末梢血で有意な差はみられなかった。以上より、IgG4 関連眼疾患においても組織中の形質芽細胞が IgG4 を産生し、病態に重要な役割をはたしていることが推測された。

将来的にこれらのデータにより、本症の診断につながる新規のバイオマーカーや分子標的薬の開発などの発展が期待された。

今後は、次世代シーケンサーで解析を行っている眼窩悪性リンパ腫、IgG4 関連眼疾患、ぶどう膜悪性黒色腫、眼内リンパ腫を中心に症例数を増やしつつ遺伝子変異を調べることによって、発症メカニズムの詳細な解明、新たなバイオマーカーの探索、臨床経過との相関 (生命予後予測や治療効果判定) と、得られた結果を統合し、個別治療の確立につなげるデータとしていく予定である。また、これらの得られた研究成果を学術誌に投稿するとともに、国内および国際学会の場で研究成果を発表していく計画である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

(英文)

Usui Y, Mizusawa T, Goto H: Punctate retinal pigment epitheliopathy and choroidopathy after radiotherapy with chemotherapy. JAMA Ophthalmol. 136: e181754-e181754, 2018. DOI:10.1001/jamaophthalmol.2018.1754 査読有

Shirakashi M, Yoshifuji H, Kodama Y, Chiba T, Yamamoto M, Takahashi H, Uchida K, Okazaki K, Ito T, Kawa S, Yamada K, Kawano M, Hirata S, Tanaka Y, Moriyama M, Nakamura S, Kamisawa T, Matsui S, Tsuboi H, Sumida T, Shibata M, Goto H, Sato Y, Yoshino T, Mimori T: Factors in glucocorticoid regimens associated with treatment response and relapses of IgG4-related disease: a multicentre study. Sci Rep. 8:10262, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-28405-x 査読有

Goto H, Usui Y, Umazume A, Uchida K, Eishi Y: Propionibacterium acnes a possible pathogen of granuloma in patients with ocular sarcoidosis. Br J Ophthalmol. 101:1510-1513, 2017. DOI:10.1136/bjophthalmol-2016-309248 査読有

Shirota N, Nakayama H, Shiraishi S, Usui Y, Kimura K, Sanada T, Kennoki N, Okubo M, Goto H, Tokuyue K: Target volume dose and clinical outcome in radiotherapy for primary marginal zone lymphoma of the ocular adnexa. Mol Clin Oncol. 6: 833-838, 2017. DOI:10.3892/mco.2017.1241 査読有

Usui Y, Tsubota K, Agawa T, Ueda S, Umazume K, Okunuki Y, Kezuka T, Yamakawa N, Goto H: Aqueous immune mediators in malignant uveal melanomas in comparison to benign pigmented intraocular tumors. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 255: 393-399, 2017. DOI: 10.1007/s00417-016-3541-5 査読有

Usui Y, Rao NA, Takase H, Tsubota K, Umazume K, Diaz-Aguilar D, Kezuka T, Mochizuki M, Goto H, Sugita S: Comprehensive polymerase chain reaction assay for detection of pathogenic DNA in lymphoproliferative disorders of the ocular adnexa. Sci Rep. 6:36621, 2016. DOI: 10.1038/srep36621 査読有

(和文)

後藤 浩:眼窩・眼周囲組織にみられる腫瘍の診断・治療に関する検査 臨眼 71: 314-319, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計 22 件)

(国際)

Usui Y:Molecular analysis of orbital lymphoproliferative disorders. The 33rd Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, Hong Kong, China, 2018(Invited).

Goto H:Masquerade syndrome. The 7th Indo-China Intraocular Inflammation and Infection Meeting, Mongolia, 2018(Invited).

Tsubota K, Usui Y, Umazume K, Nemoto R, Shibata M, Goto H: Analysis of clinical features of primary vitreoretinal lymphoma followed for over 5years. The annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Honolulu, USA, 2018.

Ogawa M, Usui Y, Yamakawa N, Umazume K, Nemoto R, Goto H: Genetic analysis of IgG4-related ophthalmic disease using nextgeneration sequencing. The annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Honolulu, USA, 2018.

Imazeki M, Usui Y, Tsubota K, Umazue K, Nemoto R, Goto H:Clinical features of primary vitreoretinal lymphomas with lesions involving organs other than central nervous system.The annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Honolulu, USA, 2018.

Goto H:Masquerade syndrome. The 58th annual meeting of the Ophthalmological Society of Taiwan, Taipei, Taiwan, 2017(Invited).

Goto H:Behçet ' s disease:Stepladder approach to management. The 11th Asia-Pacific Vitreo-retina Society Congress, Kuala Lumpur, Malaysia, 2017 (Invited) .

Goto H:Masquerade syndrome. The 6th Indo-China Ocular Inflammation/Infection Meeting, Kuala Lumpur, Malaysia, 2017 (Invited).

Nemoto R, Usui Y, Goto H:Immunophenotypic profiles for inflammatory cell of Chalazion Pyogenic granuloma. The 18th International Society of Ocular Oncology Biennial Conference, Sydney, Australia, 2017.

Ogawa M, Usui Y, Yamakawa N, Umazume K, Tsubota K, Nemoto R, Goto H: Genetic alterations in IgG4-related ophthalmic disease identified using next-generations sequencing. The annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Baltimore, USA, 2017.

(国内)

後藤 浩:眼腫瘍に対する外科的治療の実際 第 4 回雪明・新潟眼科フォーラム, 2017 (招待講演).

後藤 浩:著しい眼球偏位を生じている眼窩腫瘍の診断と治療の是非 第 32 回日本眼窩疾患シンポジウム, 2017.

後藤 浩:日頃あまり見ることのない眼腫瘍の治療 第 1 回江東眼科学術研究会, 2017 (招待講演).

後藤 浩:眼腫瘍に対する外科的治療の現状 第 8 回千代田眼科夏のフォーラム, 2017.

後藤 浩:眼腫瘍に対する外科的治療の現状 平成 29 年度東京都眼科医会卒後研修会, 2017.

小川麻里奈, 臼井嘉彦, 山川直之, 馬詰和比古, 坪田欣也, 根本 怜, 後藤 浩:次世代シーケンサ-による IgG4 関連眼疾患の遺伝子解析から同定した遺伝子変異 第 96 回東京医科大学免疫アレルギー研究会, 2017.

後藤 浩, 上田俊一郎, 臼井嘉彦, 森 秀樹: 脈絡膜メラノーマの全体予後に関わる因子の検討 第 121 回日本眼科学会総会, 2017.

小川麻里奈, 臼井嘉彦, 山川直之, 馬詰和比古, 坪田欣也, 根本 怜, 後藤 浩: 次世代シーケンサ-による IgG4 関連眼疾患の遺伝子解析から同定した遺伝子変異 第 121 回日本眼科学会総会, 2017.

臼井嘉彦, 毛塚剛司, 後藤 浩, 高瀬 博: Multiplex および Broad-range PCR 法を用いた眼窩リンパ増殖性疾患における病原体遺伝子の網羅的解析 第 95 回免疫アレルギー研究会, 2016.

臼井嘉彦, 山川直之, 坪田欣也, 馬詰和比古, 根本 怜, 後藤 浩: 第 31 回日本眼窩疾患シンポジウム, 2016.

②1 臼井嘉彦, 山川直之, 成松明知, 後藤 浩, 金蔵孝介, 黒田雅彦, 浦野泰照: 新たに開発された蛍光プローブによる外眼部悪性腫瘍の迅速診断への応用 第 34 回日本眼腫瘍学会, 2016.

②2 後藤 浩, 臼井嘉彦, 森 秀樹, 上田俊一郎, 馬詰和比古: 脈絡膜メラノーマ組織を用いた染色体の検索と転移に関する検討 第 70 回日本臨床眼科学会, 2016.

〔図書〕(計 2 件)

後藤 浩: 眼瞼・結膜腫瘍アトラス 医学書院 総ページ数 176, 2017.

後藤 浩, 飯田知弘, 近藤峰生, 石龍鉄樹, 他: 眼底疾患パーフェクトアトラス 文光堂 総ページ数 402, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 臼井 嘉彦

ローマ字氏名: (USUI, Yoshihiko)

所属研究機関名: 東京医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 50408142

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。