

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05102

研究課題名(和文)遊離核酸を用いた小児悪性腫瘍に対するFluid Biopsy法の確立

研究課題名(英文)Cancer fluid biopsy for childhood malignancies using cell-free nucleotides

研究代表者

上田 祐華 (Ueda, Yuka)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：70624641

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文): 広島大学で経験した小児がん患者で腫瘍と血漿が保存されている約200検体の血漿からの遊離DNAとマイクロRNAを用いた次世代シーケンス解析(NGS)にて腫瘍特異的な遺伝子変化とmiRNA発現を検索した。神経芽腫のMYCN増幅、ALK変異、肝芽腫のCTNNB1異常が検出され。また、神経芽腫の悪性度と関連するmiRNA3種(miR-375, miR-92a-3p and miR-99a-5p)が見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児固形がんは、100を超える様々な腫瘍があり、小円形細胞が多く病理診断に加えて分子診断による確実な診断の基に的確な治療を行うことが必須で、通常は外科的に生検を施行する。小児に対する腫瘍生検は全身麻酔が必要でさらに、部位により必ずしも容易でない。本研究にて、体液特に血液中の腫瘍由来の遊離核酸とエクソソームを用いた次世代シーケンサーによる低侵襲で迅速かつ正確な小児Cancer Liquid Biopsyの確立が可能となると考えられ、今後、分子標的による個別化療法の選択、治療効果判定や再発モニタリングへの展開が期待される。

研究成果の概要(英文): Tumor-specific genetic changes (mutation, deletion, translocation) and specific miRNA expression were analyzed by next-generation sequence analysis (NGS) using cell-free nucleic acids (cell-free DNA and microRNA) derived from plasma samples of approximately 200 children with solid malignant tumors. These patients were treated in Hiroshima University Hospital and whose tumor and plasma samples were simultaneously stored. As genetic alterations, MYCN amplification and ALK mutations in neuroblastoma, and CTNNB1 abnormalities in hepatoblastoma were detected. In neuroblastoma, three miRNAs associated with malignancy (miR-375, miR-92a-3p and miR-99a-5p) were also identified. From these results, it was considered that the NGS analysis method using cell-free nucleic acid and miRNA could be available for a bedside cancer fluid biopsy method that is highly reliable and minimally invasive in children.

研究分野：小児外科

キーワード：小児がん リキッドバイオプシー 遊離DNA マイクロRNA 神経芽腫 肝芽腫 次世代シーケンサー 遺伝子変化

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児腫瘍では、悪性度が腫瘍特性に依存し、悪性度の高い腫瘍では特徴的な不可逆的な遺伝子変化があることを当教室では報告してきた。最近、少量のサンプルから同時に多数の変異を検出する解析法が可能となり、また、エクソソームの抽出により体液中のマイクロ RNA (miRNA) も測定可能となった。既に申請者らは、小児がん患者の血漿中遊離 DNA (cfDNA) が病期の進行とともに増加し、ヒトがん用に開発された Cancer Panel を用いた次世代シーケンス (NGS) 法で **cfDNA から遺伝子変異を複数検出できている**。現在、小児腫瘍の診断に用いられる生検は、全身麻酔下で行われ、中には腫瘍組織の採取が困難な例や、また、たとえ採取されたとしても均一でない腫瘍では十分な診断ができない場合がある。一方、腫瘍由来血中遊離核酸 (cfDNA および miRNA) は、腫瘍の様々な部位に由来し、感度と特異度を上げることができれば、これらの生検の欠点の補填が可能で、さらに、全身麻酔ができない例や治療中の経過にも応用できる Cancer fluid biopsy への期待は大きい。

この Cancer liquid biopsy は、**低侵襲ながん分子診断を可能とするだけでなく、分子マーカーから分子標的療法による個別化療法が可能となり、また、治療効果、MRD(微量残存病変)の診断、さらに heterogeneity の検索も可能で、小児がんにおける診断と治療法への革新的成果が期待される**

小児に対する腫瘍生検は全身麻酔が必要でさらに、部位により必ずしも容易でない。そのため、血中や体液中遊離 DNA (cfDNA) を用いた非侵襲的検査法の重要性は大きく、申請者らは cfDNA を用いた MYCN 増幅診断や遺伝子変異検出について報告してきた。また、血液中には腫瘍由来の遊離循環 RNA (cfRNA) やエクソソーム由来 RNA が存在する。

### 2. 研究の目的

小児固形がんは、100を超える様々な腫瘍があり、小円形細胞が多く病理診断に加えて分子診断による確実な診断の基に的確な治療を行うことが必須で、通常は外科的に生検を施行する。本研究では、体液(血液・胸水・腹水)中の腫瘍由来の遊離核酸とエクソソームを用いて低侵襲で迅速かつ正確に分子診断を行い、さらに悪性度診断だけでなく、分子標的を明らかにして有効な個別化療法の推進に貢献し、さらに治療効果判定や経過観察マーカーにも応用するLiquid Biopsyの確立を目的としている。そこで、次世代シーケンサーとデジタルPCRを用いて、臨床の場で小児がんの診断効率を向上させうる新たな低侵襲の小児がん分子診断法を確立する。

すなわち、今回は、当施設で保存している初診時の血液や体液中のcfDNA のゲノム解析とエクソソーム内 miRNA 発現を網羅的な NGS 法解析にて判定し、小児固形腫瘍の診断とともに分子標的選択の一助とし、さらに感度の高いデジタル PCR 法に連動させることでごく少量の変異や発現も評価できるバイオマーカーを見出すこと、また、治療効果や MRD 判定、さらに再発マーカーへの応用を視野に入れて、血液や体液中の腫瘍由来 cfDNA、miRNA を用いたがん診断 (Cancer fluid biopsy) 法を開発することを最終目的としている。本研究は、小児固形腫瘍症例を主な対象として、**広島大学で培ってきた分子生物学的手法を応用して血液や体液中のがん由来の cfDNA、miRNA を用いた小児 Cancer Liquid Biopsy による診断法の確立に寄与することを目的としている。**

### 3. 研究の方法

広島大学小児腫瘍研究グループに過去約20年間に保存され、既に予後調査が完了した神経芽腫、肝芽腫、腎芽腫横紋筋肉腫を含む約1000例のうち、治療前の初代培養にて腫瘍細胞のみ選別され、血漿が同時に保存されている200検体、樹立株23株、腹水・胸水80検体を対象とする。

腫瘍特異的選別マーカーの検出: : 既存の細胞株、樹立株の培養液中の遊離核酸およびエクソソームを抽出し次世代シーケンサー (NGS、illumina HiSeq2500)を用いて腫瘍特異的な遺伝子変化(変異、欠失、転座)、miRNA発現を検索する。

遊離DNA (cfDNA)抽出: 血漿・体液(胸水・腹水)や培養液中のエクソソームとcfDNAを抽出し、定量するとともに、デジタルPCR法で開発した断片化判定法にて断片化を検索し、担癌児での疾患や病期、年齢別のcfDNA抽出量を詳細に比較する。

遊離DNA(cfDNA)での遺伝子変異の検討: 1で得られた遺伝子変異と周知の遺伝子異常(MYCN増幅、CTNBB1変異、WT1変異など)を含めた遺伝子変化について、小児担癌患者でのcfDNAを用いてNGSにて測定する。

エクソソーム由来miRNAの検討: 2で抽出したエクソソームを抽出し、その中のがん由来のmiRNAを中心に、NGSにて解析し、その検出感度、定量性を検討する。

**Cancer fluid biopsyのバイオマーカー確定:** 腫瘍細胞の遺伝子変化との相補性、部位、進行度による陽性率、治療中の経過、再発時のデータなどから、cfDNAにおける各小児悪性腫瘍のバイオマーカーを同定する。また、診断時に血漿や体液から抽出したエクソソーム内のmiRNA発現量、治療経過中の発現量を定量し、腫瘍内miRNA量との相関を検索し、各小児悪性腫瘍のなるmiRNAのバイオマーカーを同定する。

**Cancer fluid biopsyの臨床例への応用:** 実際の小児がん症例から、全血を採取し、血漿の遊離核酸解析を行い、実際の診断、治療効果の判定、早期再発のモニタリングへの有用性を検証し、ベッドサイドで検証できるシステムを構築する。

上記の結果から、遊離核酸やmiRNAの解析データから、小児がんにおける**最小限の侵襲で確実性の高いCancer fluid biopsy法を確立する。**

#### 4. 研究成果

腫瘍特異的選別マーカーの検出: : 既存の神経芽腫、肝芽腫の細胞株、樹立株の培養液中の遊離核酸およびエクソソームを抽出し次世代シーケンサー (NGS、illumina HiSeq2500)を用いて腫瘍特異的な遺伝子変化(変異、欠失、転座)、miRNA 発現を検索した。その特異的な遺伝子変化として神経芽腫の MYCN 増幅、ALK 変異、肝芽腫の CTNNB1 遺伝子変化が見いだされた。また、神経芽腫の血清由来エクソソームから悪性度と関連する miRNA を 3 種抽出した。

遊離DNA (cfDNA)抽出: 保存された血漿・体液(胸水・腹水)や培養液中のエクソソームとcfDNAを抽出し、定量し、で見出された遺伝子変化やmiRNA発現について検討し、デジタルPCR, RT-PCRで検出可能な系を確立した。

遊離DNA(cfDNA)での遺伝子変異の検討: 得られた遺伝子変異について(MYCN増幅、CTNBB1変異など)を30例の小児担癌患者でのcfDNAを用いてNGSにて測定し、MYCN増幅、CTNBB1変異に加えて、WT1変異、TP53変異、ALK変異なども検出可能であった。

エクソソーム由来miRNAの検討: 抽出したエクソソーム由来のmiRNAを用いて、NGSにて解析し、その検出感度、定量性を検討し、神経芽腫において悪性度を反映する3種のmiRNA(miR-375, miR-92a-3p and miR-99a-5p)を用いた悪性度判定システムを確立した。

**Cancer fluid biopsyのバイオマーカー確定:** 腫瘍細胞の遺伝子変化との相補性、部位、進行度による陽性率、治療中の経過、再発時のデータなどから、cfDNAにおけるバイオマーカーとして、神経芽腫のMYCN増幅・ALK変異、肝芽腫のCTNNB1変異、腎芽腫のWT1変異などが同定された。また、診断時に血漿や体液から抽出したエクソソーム内の

miRNA発現量、治療経過中のmiRNA発現量を定量したところ、神経芽腫の3種のmiRNAを用いた悪性度判定の有用性が示唆された。

**Cancer fluid biopsyの臨床例への応用**：実際の小児がん症例から、全血を採取し、血漿のcfDNA解析を26例で行い、NGSあるいはデジタルPCRでMYCN増幅、ALK変異、CTNNB1遺伝子変異を7例、2例、5例に検出し、MYCN増幅・ALK変異例は神経芽腫、CTNNB1変異例は肝芽腫と診断し、病理学的診断と一致した。変異の検出されない症例での他の変異との関連については症例を重ねて検討すること必要と考えられた。

上記の結果から、遊離核酸やmiRNAの解析データから、小児がんにおける**最小限の侵襲で確実性の高いベッドサイドで可能なCancer fluid biopsy法が確立した**

上記の結果を総合し、小児がんとくに MYCN 増幅神経芽腫、ALK 変異神経芽腫、CTNNB1 変異肝芽腫、は血漿（血清）cfDNA を用いた NGS で、さらに神経芽腫では悪性度と関連する 3 種の miRNA (miR-375, miR-92a-3p and miR-99a-5p) についても NGS にて、診断や悪性度判定に対し感度とともに特異度が高く診断に有用と考えられた。さらに、診断のみならず MRD 判定、治療効果判定、再発の補助診断に極めて有用な **Cancer fluid biopsy のシステムとなるもの**と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka M, Kohashi K, Kushitani K, Yoshida M, Kurihara S, Kawashima M, Ueda Y, Souzaki R, Kinoshita Y, Oda Y, Takeshima Y, Hiyama E, Taguchi T, Tanaka Y	4. 巻 66
2. 論文標題 「Inflammatory myofibroblastic tumors of the lung carrying a chimeric A2M-ALK gene: report of 2 infantile cases and review of the differential diagnosis of infantile pulmonary lesions」	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human Pathology	6. 最初と最後の頁 177-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka M, Kohashi K, Kushitani K, Yoshida M, Kurihara S, Kawashima M, Ueda Y, Souzaki R, Kinoshita Y, Oda Y, Takeshima Y, Hiyama E, Taguchi T, Tanaka Y	4. 巻 27
2. 論文標題 術後3年5ヵ月で再手術を要した巨大水腎症の1例 遅発性再発の要因についての一考察.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児泌尿器科学会雑誌.	6. 最初と最後の頁 62-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Faisal HKP, Horimasu Y, Hirano S, Yamaoka E, Fukazawa T, Kanawa M, Tanimoto K, Hattori N, Kohno N, Ueda Y, Sueda T, Hiyama E	4. 巻 68
2. 論文標題 Cell-Free DNA Analysis for EGFR mutations in Lung Adenocarcinoma Patients by Droplet Digital PCR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hiroshima Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Hiyama E, Kurihara S, Ueda Y, Oue T, Kitagawa N, JCCG Liver Tumor Committee(JPLT), Japan
2. 発表標題 NABIGATION SURGERY USING ICG FLUORESCENCE IMAGING FOR HEPATOBLASTOMA LUNG METASECTOMY
3. 学会等名 SIOPEL SPRING MEETING 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗原 将, 檜山 英三, 河島 茉澄, 上田 祐華
2. 発表標題 巨大な後腹膜リンパ管腫に単径ヘルニアが合併し鼠径部に滑脱していた1例
3. 学会等名 第54回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hirahara S, Hiyama E, Kimura S, Kurihara S, Kawashima M, Ueda Y, Onitake Y.
2. 発表標題 PHARMACOGENETICS ANALYSIS for TREATMENT-RELATED TOXICITIES OF HEPATOBLASTOMA PATIENTS IN JAPAN
3. 学会等名 The 49th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiyama E, Hishiki T, Hoshino K, Yokoi A, Tamata T, Kazama T, Honda S, Taguchi T, Kurihara S, Kawashima M, Ueda Y
2. 発表標題 Surgical and Interventional Treatment for ruptured hepatic Tumors in Japanese Study Group Experience
3. 学会等名 The 49th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiyama E, Kurihara S, hirano S, Irisuna F, Ueda Y, Kawashima M
2. 発表標題 Integrated Genetic and Epigenetic Analysis novel Molecular Subgroups in Hepatoblastoma
3. 学会等名 The 49th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kurihara S, Hiyama E, Ueda Y
2. 発表標題 The probability of liquid biopsy as non-invasive diagnostic tool for childhood solid tumors (小児悪性固形患児における非侵襲的診断法としてのリキッドバイオプシーの可能性)
3. 学会等名 第59回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗原 將, 檜山 英三, 上田 祐華
2. 発表標題 初診時に呼吸循環障害が危惧された神経芽腫の8例.
3. 学会等名 第59回中国四国小児がん研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗原 將, 檜山 英三, 上田 祐華, 田中 祐吉
2. 発表標題 当院で最近経験した小児肺腫瘍性病変の3例.
3. 学会等名 第55回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗原 將, 上田 祐華, 檜山 英三
2. 発表標題 器質的疾患を認めず膀胱肉柱形成所見を認めた2症例.
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会中国四国地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗原 将, 檜山 英三, 上田 祐華
2. 発表標題 小兒固形腫瘍初診時における外科的生検についての検討 (The examination about surgical biopsy for childhood solid tumors).
3. 学会等名 第60回日本小兒血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiyama E, Ueda Y, Kurihara S, Hiyama K
2. 発表標題 Circulating Tumor Cells and tumor DNA in Liquid Biopsy for childhood malignancy
3. 学会等名 PAPS 52nd Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原 将, 檜山 英三, 上田 祐華
2. 発表標題 当院のマススクリーニング終了後の神経芽腫群症例の検討
3. 学会等名 第60回中国四国小兒がん研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiyama E, Kurihara S, Ueda Y, Hishiki T, Ida K, Iehara T, Oue T, Yano M, Watanabe K, Hoshino K, Ko K, Tanaka Y
2. 発表標題 Late toxicities, especially second malignancies, with GWAS analysis in hepatoblastoma cases treated in the Japanese Study
3. 学会等名 ASCO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 栗原將、兒島正人、上田祐華、檜山英三
2. 発表標題 新生児腸重積症（回腸-回腸型）の一例
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会中国四国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arfan Ahmad、檜山 洋子、木村 真吾、上田 祐華、栗原 將、山岡 絵美、檜山 英三
2. 発表標題 次世代シーケンサ を用いた神経芽腫患者のマイクロRNAの検討
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原 將、上田 祐華、兒島 正人、唐川 修平、川口 浩史、檜山 英三
2. 発表標題 肝中央二区域切除を施行した肝芽腫の2 例Two Cases of central bisectionectomy of liver for hepatoblastoma
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 祐華、栗原 將、兒島 正人、谷口 真紀、下村 麻衣子、唐川 修平、川口 浩史、檜山 英三
2. 発表標題 当院で経験した18 トリソミーに発症した肝芽腫症例の検討Clinical investigation of hepatoblastoma cases with 18 trisomy
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Kojima, Sho Kurihara, Yuka Ueda, Eiso Hiyama
2. 発表標題 肝芽腫に対する カテニン遺伝子異常を用いたリキッドバイオプシーの開発Liquid biopsy using -catenin aberrations in
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maki Taniguchi, Shuhei Karakawa, Ayaka Suzawa, Kumi Chogahara, Ayaka Ohno, Maiko Shimomura, Sho Kurihara, Yuka Ueda, Eiso
2. 発表標題 家族性大腸腺腫症の家族歴をもつ、肝芽腫の2 例Two cases of hepatoblastoma with a parental history of familial adenomatous
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兒島正人, 栗原 將, 上田祐華, 檜山英三
2. 発表標題 腸重積症を発症し開腹手術を施行したPeutz-Jeghers 症候群の11歳男児の1例
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原 將, 上田祐華, 兒島正人, 檜山英三
2. 発表標題 当院での小児縦隔腫瘍の初診時外科的介入についての検討
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----