

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17002

研究課題名(和文) デジタルPCR法を応用した非侵襲的小児がん診断法の開発

研究課題名(英文) Non-invasive diagnostic methods using digital PCR for childhood cancers

研究代表者

栗原 将 (Kurihara, Sho)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：40724894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：約100例の小児固形悪性腫瘍の患者血清を用いて検討した結果、とくにMYCN増幅神経芽腫、ALK変異神経芽腫、カテニン異常肝芽腫、キメラ遺伝子を有する胞巣型横紋筋肉腫、ユーイング肉腫などでは血中遊離DNAを用いたデジタルPCRにてこれらの遺伝子変異をスクリーニングすることが可能となった。また、神経芽腫では、特異的miRNAの検出も可能であった。特に、デジタルPCRを用いたMYCN増幅、カテニン遺伝子変異の感度と特異性は高く、診断のみならず治療効果判定、再発のモニタリングに極めて有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児腫瘍では、腫瘍特性の診断や悪性度判定は治療に不可欠であり、従来は、腫瘍生検にて腫瘍細胞を採取して検討されてきた。しかし、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。そのために、今回の研究によって血中や体液中遊離DNAを用いた非侵襲的検査によるリキッドバイオプシーにて診断や予後予測が可能となった重要性は大きい。こうしたリキッドバイオプシーは、今後臨床応用に向けて臨床試験などへの導入が望まれる。

研究成果の概要(英文)：The MYCN amplification and ALK mutations in neuroblastoma, β -catenin gene aberrations in hepatoblastoma, and chimeric genes in alveolar rhabdomyosarcoma and Ewing family sarcomas were detectable by digital PCR methods using cell-free DNA in the serum samples of approximately 100 cases of childhood solid malignant tumors. In neuroblastoma, specific miRNAs correlated with malignant grade were also detectable. In particular, the sensitivity and specificity of MYCN amplification and β -catenin gene mutations using digital PCR were high, and these might be extremely useful not only for diagnosis but also for evaluation of therapeutic efficiency and monitoring of recurrence.

研究分野：小児外科

キーワード：リキッドバイオプシー デジタルPCR 遊離DNA マイクロRNA 小児がん 診断 治療効果判定 再発マーカー

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、腫瘍特性の診断や悪性度判定は治療に不可欠であり、従来は、腫瘍生検にて腫瘍細胞を採取して検討されてきた。しかし、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。そのために、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

本研究では、保存している小児がん患者の体液中のcfDNAとcfRNAエクソソームRNAを用いて、微量でも高感度で特異性の高い解析が可能なデジタルPCR法を応用し、MYCN増幅などの遺伝子増幅、ALK 変異、キメラ遺伝子検出法の確立し、肝芽腫の カテニン変異は当方で開発した2プローブデジタルPCR法を用いた検出法を試みる。これらから、体液中のcfDNAとエクソソームを用いたデジタルPCR法の非侵襲的な小児固形悪性腫瘍の診断への有効性を明らかにするとともに、外科治療、治療効果判定、さらに再発の早期発見への有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

1990年から同意を得て保存しえた神経芽腫、肝芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫症例の外科的切除腫瘍および、術前と術後の血漿(血清)、骨髄、腹水、胸水が保存されている症例100例を対象に以下の検討を行う。

遺伝子変異スクリーニング:既に遺伝子異常が判明している腫瘍の腫瘍由来の DNA と診断時血漿(血清)由来遊離 DNA(cfDNA)、次世代シーケンサー(Cancer Panel 等)にて遺伝子異常をスクリーニングし、腫瘍のデータと照合し、遺伝子変異の正確な変異部位(点突然変異、欠失、転座部位)の同定と腫瘍組織内での変異細胞の存在比率、血漿 cfDNA と miRNA の感度、特異度を検証する。必また、腫瘍の miRNA と診断時血漿(血清)由来エクソソームを用いて、次世代シーケンサー(Small RNA deletion kit)にて特異的に発現している miRNA をスクリーニングし、腫瘍と血液中の発現レベルの相関を検証し、悪性度と治療効果について検討する。

MYCN 遺伝子増幅: 神経芽腫症例の腫瘍由来 DNA と血漿(血清)由来 DNA を用いて、デジタル PCR 法による MYCN 増幅の検出感度、精度を検証する。診断のみならず、治療効果、さらに再発例においての再発予測の指標としての有効性を検証する。

遺伝子異常検索: 血漿由来 cfDNA を用いて神経芽腫での ALK 変異について、デジタル PCR での検出について検討する。さらに、肝芽腫で高頻度に見られる カテニン異常のうちエクソン 3 の変異のある症例の血漿(血清)cfDNA を用いたデジタル PCR でその検出率を検討し、腫瘍細胞から得られた欠失、変異のデータと照合する。

キメラ遺伝子検索: 横紋筋肉腫、ユーイング肉腫症例で、腫瘍からキメラ遺伝子が検出されている症例において、腫瘍キメラ遺伝子の部位から、特異的な PCR プライマーとプローブを設計し、血漿(血清)、胸水などの体液由来 cfDNA をデジタル PCR を用いて検索し、治療効果、化学療法の有効性、さらに再発例においての再発予測の指標としての有効性を検証する。。

microRNA 検索: 体液特に血液から得られたエクソソーム内の microRNA を用いて、腫瘍特異性が示唆されている microRNA を RT-PCR にて試みて、術前診断と術後経過について検討を加える。

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、カテニン異常肝芽腫、胞巣型横紋筋肉腫、ユーイング肉腫などの血漿（血清）cfDNA さらに特異的 miRNA を用いたデジタル PCR 法による非侵襲的診断法を提言する。また、デジタル PCR の感度と特異性を利用した骨髄や体液中の MRD 判定、治療効果判定、再発の早期診断法も合わせて提言し、小児がんの治療成績向上に寄与する。

4. 研究成果

遺伝子変異スクリーニング: 既に遺伝子異常が判明している小児固形腫瘍 12 例の腫瘍由来の DNA と診断時血漿（血清）由来遊離 DNA(cfDNA)、イルミナ Cancer Panel ver. 2.0 にて遺伝子異常をスクリーニングした。腫瘍のデータと照合し、遺伝子変異の正確な変異部位（点突然変異、欠失、転座部位）の同定と腫瘍組織と cfDNA のアレル頻度について比較検討した。さらに、神経芽腫血漿（血清）由来エクソソームを用いて、次世代シーケンサー（Small RNA deletion kit）にて特異的に発現している miRNA をスクリーニングし、腫瘍と血液中の発現レベルと悪性度、予後との相関を検討した。

***MYCN* 遺伝子増幅:** 神経芽腫症例の腫瘍由来 DNA と血漿（血清）由来 DNA を用いて、デジタル PCR 法による *MYCN* 増幅の検出感度、精度を検証した。研究期間前および期間中の 22 例について、増幅例は血清 DNA で診断可能でコピー数もほぼ一致した。また、2 例において骨髄 MRD の検索に応用した。

遺伝子異常検索: 血漿由来 cfDNA を用いて神経芽腫での ALK 変異について、デジタル PCR での検出について検討し、2 例で検出しえた。さらに、肝芽腫で高頻度に見られるカテニン異常のうちエクソン 3 の変異のある症例の血漿（血清）cfDNA を用いたデジタル PCR でその検出率を検討し、変異のスクリーニング法を確立した。

キメラ遺伝子検索: 横紋筋肉腫、ユーイング肉腫症例で、腫瘍からキメラ遺伝子が検出されている症例において、腫瘍キメラ遺伝子の部位から、特異的な PCR プライマーとプローブを設計し、血漿（血清）、胸水などの体液由来 cfDNA をデジタル PCR を用いて検索し、治療効果、化学療法の有効性、さらに再発例においての再発予測の指標としての有効性を検証するシステムを構築した。

microRNA 検索: 神経芽腫の血液から得られたエクソソーム内の microRNA を用いて、腫瘍特異性が示唆されている microRNA を RT-PCR にて試みて、術前診断と術後経過について検討を行い報告した。

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、カテニン異常肝芽腫、キメラ遺伝子を有する胞巣型横紋筋肉腫、ユーイング肉腫などでは血漿（血清）cfDNA さらに特異的 miRNA をデジタル PCR にてスクリーニングすることが可能となった。ただし、キメラ遺伝子の診断や遺伝子欠失に関しての特異性は十分ではなかった。一方、デジタル PCR を用いた *MYCN* 増幅、カテニン遺伝子変異の変異の感度と特異性は高く、診断のみならず骨髄や体液中の MRD 判定、治療効果判定、再発の補助診断に極めて有用と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 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 Hiyama E, Ueda Y, Kurihara S, Kawashima K, Ikeda K, Morihara N, Fukazawa T, Kanawa M	4. 巻 1
2. 論文標題 Gene expression profiling in hepatoblastoma cases of the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumors-2 (JPLT-2) trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Molecular Cancer	6. 最初と最後の頁 2-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31487/j.EJMC.2018.01.003	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 Tanaka Mio, Kohashi Kenichi, Kushitani Kei, Yoshida Misa, Kurihara Sho, Kawashima Masumi, Ueda Yuka, Souzaki Ryota, Kinoshita Yoshiaki, Oda Yoshinao, Takeshima Yukio, Hiyama Eiso, Taguchi Tomoaki, Tanaka Yukichi	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） 10.1016/j.humpath.2017.06.013	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19件（うち招待講演 0件／うち国際学会 9件）

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 將、檜山 英三、上田 祐華
2. 発表標題 当院のマ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回中国四国小児がん研究会
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 Group for Pediatric Liver Tumor protocol-2
3. 学会等名 ASCO Annual Meeting.
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 将, 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 将, 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 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 Maki Taniguchi, Shuhei Karakawa, Ayaka Suzawa, Kumi Chogahara, Ayaka Ohno, Maiko Shimomura, Sho Kurihara, Yuka Ueda, Eiso Hiyama, Hiroshi Kawaguchi
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 polyposis
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 Yuka Ueda, Eiso Hiyama, Sho Kurihara, Masumi Kawashima, Masato Kojima, Satoshi Hirahara, Keiko Hiyama
2. 発表標題 Cancer fluid biopsy using circulating tumor cells in childhood solid tumors
3. 学会等名 2018 PAPS meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurihara S, Hiyama E, Ueda Y, Kawashima M, Kojima M, Hirahara S
2. 発表標題 Surgical intervention for portosystemic venous shunt in children
3. 学会等名 2018 PAPS meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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 Survival and delayed effects of risk-stratified hepatoblastoma patients treated in the JPLT-2 trial
3. 学会等名 2018 ASCO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiyama E, Ueda Y, Kurihara S, Aoki Y, Iehara T, Ida K, Kazama T, Kihira K, Takama Y, taguchi T, Hishiki T, Fujimura J, Hoshino K, Honda S, Matsumoto K, Mori M, Yano M, Yokoi A, watanabe K, Tanaka Y
2. 発表標題 Decline in serum A-fetoprotein level before tumor resection as a prognostic factor for Hepatoblastoma
3. 学会等名 50th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) (国際学会)
4. 発表年 2018年

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 將, 檜山 英三, 河島 菜澄, 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 15.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 ntegrated 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
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

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