

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07828

研究課題名(和文) 小児ランゲルハンス細胞組織球症の遺伝子変異に基づくリスク層別化の確立

研究課題名(英文) Establishment of risk stratification based on genetic mutation in pediatric Langerhans cell histiocytosis

研究代表者

森本 哲 (Morimoto, Akira)

自治医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：30326227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：後方視的コホート59例(小児50、成人9)では、BRAF V600E変異を46%に認めた。前方視的コホート104例(20歳未満)では、BRAF V600E変異を40.4%、BRAF indelを6.7%、MAP2K1変異を31.7%に認めた。BRAF V600E変異は疾患活動スコア(DAS)が7以上の例に有意に多かった($p=0.014$)。いずれのコホートにおいても、遺伝子変異型と性別、診断時年齢、病型・初期治療反応性・無イベント生存率・全生存率・中枢神経関連合併症との間に関連を認めなかった。BRAF V600E変異はDASと関連するがLCHの転帰とは関連しない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LCH細胞にはMitogen-activated Protein Kinase経路の遺伝子に相互排他的な発がん性変異があることが報告され、BRAF V600E変異は最も高頻度な変異で50%前後の例に見いだされる。欧米では、BRAF V600E変異は、高リスク(高い病勢スコア(DAS)・高い再発率・高い中枢神経関連続発症頻度)と報告されている。しかし、日本のシタラピン中心の治療を受けた患者においては、BRAF V600E変異は、DASが高いこととは関連するが転帰とは関連せず、BRAF V600Eの有無により治療を層別化する意義は低いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：In a retrospective cohort of 59 patients (50 children, 9 adults), 46% had BRAF V600E mutation. In a prospective cohort of 104 patients (aged <20 years), 40.4% had BRAF V600E mutation, 6.7% had BRAF indel, and 31.7% had MAP2K1 mutation. BRAF V600E mutation was significantly more common in patients with a disease activity score (DAS) of 7 or more (76.9% vs. 38.5%, $p=0.014$). No association was found between genetic variants and sex, age at diagnosis, disease type, initial treatment response, event-free survival, overall survival, or CNS-related complications in any cohort. BRAF V600E mutation was associated with DAS but not outcomes of LCH.

研究分野：組織球症

キーワード：ランゲルハンス細胞組織球症 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ BRAF V600E変異 予後因子

1. 研究開始当初の背景

LCH は、骨髄由来の未分化樹状細胞の性質をもつ腫瘍性の LCH 細胞が、様々な臓器で異常に集簇し、組織傷害をおこす、乳幼児に好発する疾患である。病変は、皮膚、骨、肝脾、肺、造血器、中枢神経など全身に及ぶ。多臓器に病変がおよぶ例は難治性である。肝または脾・造血器に浸潤があり(高リスク) 初期治療反応が不良な例では、死亡率は 40% に上る。また、しばしば再燃し、再燃例では特に、尿崩症や中枢神経変性症などの非可逆的病変を高頻度に合併する^{1, 2)}。白血病などの血液腫瘍では、遺伝子変異に基づくリスク層別化治療により治療成績の向上は目覚ましいが、LCH においては遺伝子変異に基づくリスク層別化は確立していない。

LCH 組織には多数の炎症細胞が浸潤しているため、LCH 細胞の遺伝子変異検索は、検出感度の問題で困難であった。2010 年に LCH 細胞に BRAF V600E 変異を高頻度に認め、BRAF 変異の有無に関わらず、LCH のほぼ全例で ERK のリン酸化が亢進していると報告された³⁾。BRAF は、Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 経路のシグナル伝達蛋白であり、機能亢進変異である V600E 変異は半数以上の LCH 患者で認められると、海外から報告された⁴⁾。以降、BRAF 以外に、MEK1 や EGF 受容体遺伝子など MAPK 経路の遺伝子に相互排他的な発がん性変異が相次いで見出され⁵⁻⁷⁾、MEK1 変異は約 1/4 の LCH で認められると報告されている。

BRAF V600E 変異と予後との関連については、ビンブラスチン/プレドニゾロンにより小児 LCH が治療されている欧米から、再発率が高い⁸⁾、高リスク群に多く、疾患活動性スコア (Disease Activity Score: DAS) が高く、治療抵抗性で、尿崩症などの非可逆的病変の合併も高い⁹⁾との報告がある。

一般に、腫瘍性疾患の最大の予後因子は治療反応性である。日本ではシタラビン/ビンクリスチン/プレドニゾロンにより小児 LCH の寛解導入治療が行われ、欧米に比べ治療成績は良好であり^{10,11)}、日本のレジメンにより治療を受けた患者においても BRAF V600E 変異が予後不良因子となるのか検討が必要である。BRAF V600E 変異は様々な悪性腫瘍に加え色素細胞母斑など非悪性病変にも認められることから、BRAF V600E 変異が直接に予後の違いを生む以外に、付加的な遺伝子異常が予後に影響している可能性も考えられる。

後方視的に収集した高リスク LCH 患者の病変組織検体から、whole exome sequencing により、MAP2K1 変異に付随する新たな遺伝子 (X 遺伝子) の機能喪失変異を見出した (未発表データ)。X 遺伝子はファミリー遺伝子を形成し、細胞の分化やアポトーシスなどに関与し、片アリルの機能喪失変異により発がんに関与すると報告されている。X 遺伝子の機能喪失変異により高リスクとなった可能性が考えられ、新たな予後因子となる可能性がある。

2. 研究の目的

小児 LCH 患者における遺伝子変異と予後との関連を明らかとする。

3. 研究の方法

後方視的に収集した小児と成人の LCH 患者の病変の生検試料、および、小児 LCH を対象とした LCH-12 臨床試験に前方視的に登録された患者の病変の生検試料を対象とし、BRAF V600E 変異、および、V600E 以外の BRAF 遺伝子変異・MAP2K1 遺伝子変異、新たに見出した X 遺伝子ファミリーの変異を、高感度 (変異細胞頻度 1% で検出可能) の変異特異的 PCR 法、Droplet PCR 法、次世代シーケンサーによる target sequencing により解析した。

臨床情報と遺伝子変異との関連を探索的に解析し、予後と関連する遺伝子変異を検討した。

4. 研究成果

(1) 後方視的に収集した検体の解析

日本人の LCH 患者 59 例 (小児 50 例、成人 9 例) の病変組織検体を収集した。BRAF V600E 変異解析では、陽性率は全体で 46% (小児 48%、成人 33%) であった。同変異が陰性で十分な量と質の DNA が得られた 17 例において、BRAF および MAP2K1 の Ex.2 と Ex.3 の target sequence を行ったところ、計 14 例に BRAF V600E 変異以外の変異を認めた (BRAF Ex.12 in-frame deletion 3 例、BRAF Ex.12 splice-site mutation 2 例、MAP2K1 Ex2 in-frame deletion 7 例、MAP2K1 Ex.3 missense mutation 1 例、MAP2K1 Ex.3 in-frame deletion 1 例)。最終的に Full に解析できた 44 例中 41 例 (93%) で BRAF または MAP2K1 に変異が確認された。小児例において BRAF V600E 変異と臨床像との関連を解析したが、性別、診断時年齢、病型、初期治療反応性、再発、中枢神経関連合併症との関連は認めなかった¹²⁾。

十分な量と質の DNA が得られた例において、X 遺伝子ファミリーの変異を解析したが、再現性のある変異は確認できなかった。

(2) 前方視的に収集した臨床試験登録例の解析

前方視的介入試験 (LCH-12 試験)¹³⁾ の対象となった診断時年齢 20 歳未満の LCH 患者 104 例の腫瘍検体において BRAF および MAP2K1 変異の解析を行った。BRAF V600E 変異を 40.4%、BRAF

indel を 6.7%、MAP2K1 変異を 31.7%に認めた。BRAF V600E 変異は DAS が 7 以上の例に有意に頻度が高かった(76.9% vs. 38.5%, p=0.014)。遺伝子変異型と病型・初期治療反応性・無イベント生存率・全生存率との間に関連は認めなかった。

(3)研究成果のまとめと考察

日本の LCH 患者においては、BRAF V600E 変異の頻度は 40%台で、欧米に比べてやや少ない。BRAF V600E 変異は、欧米と同様に DAS が高いことと関連していたが、欧米とは異なり転帰とは関連していなかった。その理由として、first line 治療として、欧米ではビンブラスチン/プレドニゾロンが用いられているのに対して、日本ではシタラピン/ビンクリスチン/プレドニゾロンが用いられており、日本のほうが治療強度が高いことが挙げられる。日本の治療においては、BRAF V600E 変異を治療層別化に用いる意義は低いと考えられた。

引用文献

1. 森本 哲, 組織球症 ランゲルハンス細胞組織球症. 日本小児血液・がん学会(編), 小児血液・腫瘍学改訂第 2 版, 東京, 診断と治療社, 2022.; pp523-526.
2. Morimoto A, Oh Y, Shioda Y, et al. Recent advances in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Int.* 2014; 56: 451-461.
3. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, et al. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2010; 116: 1919-1923.
4. Bubolz AM, Weissinger SE, Stenzinger A, et al. Potential clinical implications of BRAF mutations in histiocytic proliferations. *Oncotarget.* 2014; 5: 4060-4070.
5. Brown NA, Furtado LV, Betz BL, et al. High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E-negative Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2014; 124: 1655-1658.
6. Chakraborty R, Hampton OA, Shen X, et al. Mutually exclusive recurrent somatic mutations in MAP2K1 and BRAF support a central role for ERK activation in LCH pathogenesis. *Blood.* 2014; 124: 3007-3015.
7. Nelson DS, van Halteren A, Quispel WT, et al. MAP2K1 and MAP3K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015; 54: 361-368.
8. Berres ML, Lim KP, Peters T, BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J Exp Med.* 2014; 211: 669-683.
9. Heritier S, Emile JF, Barkaoui MA, et al. BRAF Mutation Correlates With High-Risk Langerhans Cell Histiocytosis and Increased Resistance to First-Line Therapy. *J Clin Oncol.* 2016; 34: 3023-3030.
10. Morimoto A, Ikushima S, Kinugawa N, et al. Improved outcome in the treatment of pediatric multifocal Langerhans cell histiocytosis: Results from the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 protocol study. *Cancer.* 2006; 107: 613-619.
11. Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, et al. Intensified and prolonged therapy comprising cytarabine, vincristine and prednisolone improves outcome in patients with multisystem Langerhans cell histiocytosis: results of the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-02 Protocol Study. *Int J Hematol.* 2016; 104: 99-109.
12. Hayase T, Saito S, Shioda Y, et al. Analysis of the BRAF and MAP2K1 mutations in patients with Langerhans cell histiocytosis in Japan. *Int J Hematol.* 2020; 112: 560-567.
13. Morimoto A, Shioda Y, Kudo K, et al. Intensification of treatment with vinca alkaloid does not improve outcomes in pediatric patients with Langerhans cell histiocytosis: results from the JPLSG LCH-12 study. *Int J Hematol.* 2023 Mar 4. doi: 10.1007/s12185-023-03568-0. Online ahead of print

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12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 Kudo K, Maeda M, Suzuki N, Kanegane H, Ohga S, Ishii E, Shioda Y, Imamura T, Imashuku S, Tsunematsu Y, Endo M, Shimada A, Koga Y, Hashii Y, Noguchi M, Inoue M, Tabuchi K, Morimoto A	4. 巻 111
2. 論文標題 Nationwide retrospective review of hematopoietic stem cell transplantation in children with refractory Langerhans cell histiocytosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 137-148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02760-5.	査読の有無 有
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 Morimoto A, Shioda Y, Sakamoto K, Imamura T, Imashuku S	4. 巻 64
2. 論文標題 Bone lesions of Langerhans cell histiocytosis triggered by trauma in children.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 e15199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.15199.	査読の有無 有
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 Taniguchi M, Sakamoto K, Shioda Y, Doi T, Kudo K, Fujino H, Kudo K, Morimoto A.	4. 巻 113
2. 論文標題 Salvage therapy with 2-chlorodeoxyadenosine for refractory and relapsed pediatric Langerhans cell histiocytosis: an updated nationwide survey in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 461-463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-03073-8.	査読の有無 有
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 Shimizu S, Sakamoto K, Kudo K, Morimoto A, Shioda Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of BRAF V600E mutation in radiological Langerhans cell histiocytosis-associated neurodegenerative disease using droplet digital PCR analysis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-023-03588-w.	査読の有無 有
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 Sakamoto K, Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Imashuku S	4. 巻 192
2. 論文標題 Long-term complications in uniformly treated paediatric Langerhans histiocytosis patients disclosed by 12 years of follow-up of the JLSG-96/02 studies.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 615-620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17243.	査読の有無 有
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 Morimoto A, Shioda Y, Kudo K, Kanegane H, Imamura T, Koh K, Kosaka Y, Yuza Y, Nakazawa A, Saito AM, Watanabe T, Nakazawa Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Intensification of treatment with vinca alkaloid does not improve outcomes in pediatric patients with Langerhans cell histiocytosis: results from the JPLSG LCH-12 study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-023-03568-0.	査読の有無 有
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 Sakamoto K, Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Imashuku S	4. 巻 200
2. 論文標題 Relapses of multisystem/multifocal bone Langerhans cell histiocytosis in paediatric patients: Data analysis from the JLSG-96/02 study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Br J Haematol .	6. 最初と最後の頁 769-775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.18583.	査読の有無 有
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 Shioda Y, Sakamoto K, Morimoto A.	4. 巻 198
2. 論文標題 New biomarker paves the way for a clinical trial for neurodegeneration in Langerhans cell histiocytosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Br J Haematol .	6. 最初と最後の頁 623-624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.18308.	査読の有無 有
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 Morimoto A, Shioda Y, Sakamoto K, Kudo K, Imamura T, Kudo K.	4. 巻 63
2. 論文標題 Elucidated pathogenesis and therapeutic prospects in Langerhans cell histiocytosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki .	6. 最初と最後の頁 373-382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.63.373.	査読の有無 有
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 Nakatani H, Takasawa K, Kashimada K, Morimoto A, Oshiba A, Nagasawa M	4. 巻 30
2. 論文標題 Central diabetes insipidus developing in a 6-year-old patient 4 years after the remission of unifocal bone Langerhans cell histiocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Pediatr Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 149-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.30.149.	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 -

1. 著者名 Hayase T, Saito S, Shioda Y, Imamura T, Watanabe K, Ohki K, Yoshioka T, Oh Y, Kawahara Y, Nijima H, Imashuku S, Morimoto A	4. 巻 112
2. 論文標題 Analysis of the BRAF and MAP2K1 mutations in patients with Langerhans cell histiocytosis in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 560 ~ 567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02940-8.	査読の有無 有
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 Oh Y, Hayase T, Ito T, Kawahara Y, Morimoto A	4. 巻 61
2. 論文標題 Cladribine related myelodysplastic syndrome in Langerhans cell histiocytosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 419 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.13792.	査読の有無 有
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akira Morimoto, Yoko Shioda, Kazuko Kudo, Hirokazu Kanegane, Toshihiko Imamura, Katsuyoshi Koh, Yoshiyuki Kosaka, Yuki Yuza, Atsuko Nakazawa, Akiko Saito, Tomoyuki Watanabe, Yoza Nakazawa
2. 発表標題 INTENSIFICATION OF TREATMENT WITH VINCA ALKALOID DOES NOT IMPROVE OUTCOMES IN PEDIATRIC PATIENTS WITH LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS* RESULTS FROM THE JPLSG LCH-12 STUDY
3. 学会等名 38th Annual Meeting of Histiocyte Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenichi Sakamoto, Akira Morimoto, Yoko Shioda, Toshihiko Imamura, Shinsaku Imashuku
2. 発表標題 RELAPSES IN PEDIATRIC PATIENTS WITH MULTI-SYSTEM OR MULTI-FOCAL BONE LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS - DATA FROM THE JLSG 96/02 STUDY
3. 学会等名 37th Annual Meeting of The Histiocyte Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Morimoto, Yoko Shioda, Kenichi Sakamoto, Ko Kudo, Toshihiko Imamura, Kazuko Kudo
2. 発表標題 Elucidated pathogenesis and therapeutic prospects in LCH
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早瀬朋美
2. 発表標題 ANALYSIS OF BRAF V600E MUTATION IN JAPANESE PATIENTS WITH LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS (LCH)
3. 学会等名 日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 森本哲	4. 発行年 2022年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 611
3. 書名 小児血液・腫瘍学改訂第2版	

1. 著者名 森本哲	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 329
3. 書名 小児造血器腫瘍 Strategy and Practice	

〔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	翁 由紀子 (Oh Yukiko) (30438650)	自治医科大学・医学部・非常勤講師 (32202)	
研究分担者	早瀬 朋美 (Hayase Tomomi) (50433587)	自治医科大学・医学部・客員研究員 (32202)	削除：2022年6月16日

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
---------	---------