

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08927

研究課題名(和文) テロメアバイオロジーからの予後不良神経芽腫層別法の確立

研究課題名(英文) Risk stratification of unfavorable neuroblastoma using telomere biology

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫の臨床検体において、TERT-PR(プロモーター領域)のrearrangement(再構成)について検討を行った。TERT-PR rearrangementは、Chr5.p15.33領域内のTERTの上流と下流にそれぞれ違った蛍光の標識したプローブを設計して多重染色FISH法にて検討をした。MYCN非増幅症例の2例でTERT-PR rearrangementを認めた。それぞれの症例でTERT mRNAの発現量を測定したところ、4513, 5359 copies/GAPDHと明らかにTERTの発現量が増幅していた。この2症例とも治療が奏功しておらず予後不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いまだ予後不良な小児がんの一種である神経芽腫の分子生物学的バイオロジーの検討のため、テロメアに注目して研究を行った。ごく一部の症例でTERT-PR rearrangementを認め、予後不良因子となっていると考えられた。その判定方法として、多重染色FISH法の有用性について検討を行い検出は可能と考えられた。早期診断のためのスクリーニング手段として有用であるが、その判定には主観を伴い、Realtime-PCR法などによる確認を要した。テロメアに関連して、1例でMYCN増幅と変異が初診時に共存した症例を認め、世界的にも稀な症例としてこれを報告した。

研究成果の概要(英文)： TERT-PR (promoter region) rearrangement was examined in cultured cells from clinical neuroblastoma samples. TERT-PR rearrangement was observed in 2 of 11 MYCN non-amplified cases. The expression levels of TERT mRNA in each case were measured: 4513 and 5359 copies/GAPDH in the TERT-PR rearrangement-positive group and 0-139.5 copies/GAPDH (mean 53.6) in the TERT-PR rearrangement-negative group. The TERT expression level was clearly amplified in the TERT-PR rearrangement-negative group. Both patients had a poor prognosis due to lack of response to treatment. While, FISH could be detected in the same way in FFPE.

研究分野：小児がん

キーワード：神経芽腫 テロメア TERT FISH法 MYCN CTC

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、その予後が腫瘍の生物学的特性に大きく依存し、時に自然退縮が認められる予後良好群がある一方、予後不良群があり、腫瘍特性からの治療の層別化が必要である。小児外科においては、前者は手術法の縮小による合併症軽減を、後者は早期発見と適切な手術や新規治療を駆使した集学的治療による治癒率向上が必要である。従来、この腫瘍特性にテロメア長とテロメラーゼ活性の関与を指摘し、最近では ATRX 変異によるテロメア伸長と TERT rearrangement によるテロメラーゼ活性化が見いだされ、予後不良因子と考えられている。TERT rearrangement の検出には従来リアルタイム PCR 法にて検出を行ってきたが、検出には時間が掛るのが問題である。

2. 研究の目的

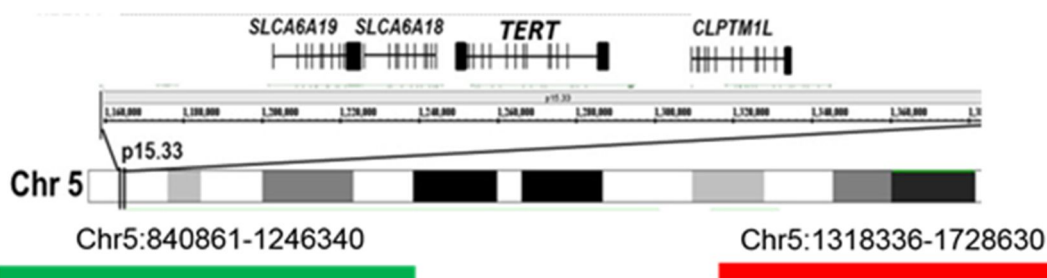
本研究では MYCN 増幅を含め、テロメアバイオロジーに規定される神経芽腫の腫瘍特性層別化を短時間に確実に実行する多重染色 FISH 法を確立するとともに、これらの腫瘍細胞の特性を一細胞解析にて検討し、新たな分子標的を見出すことを目的としている。

3. 研究の方法

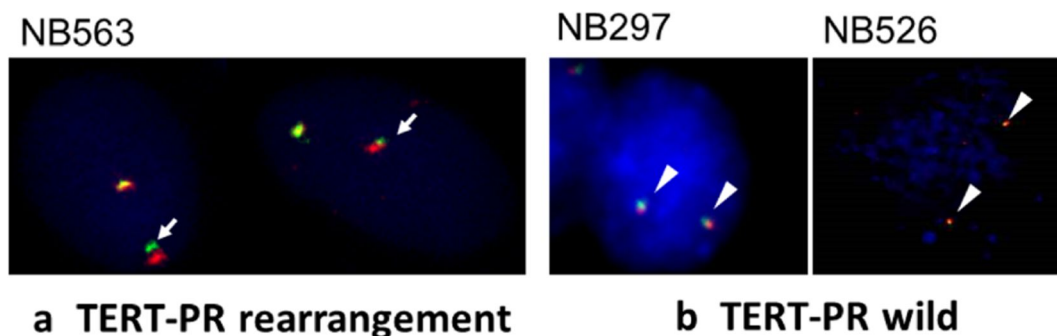
神経芽腫の臨床検体を用いて、多重染色 FISH 法を行い、TERT rearrangement の検出を試みる。またその他の神経芽腫の予後不良因子である MYCN 増幅についても検討を行い、全ゲノムシーケンシングによっても TERT rearrangement を確認する。MYCN 増幅については digital PCR 法により判定を行った。併せて広島大学で開発した一細胞分析を併用して腫瘍のヘテロジェニシティについても評価を行う。

4. 研究成果

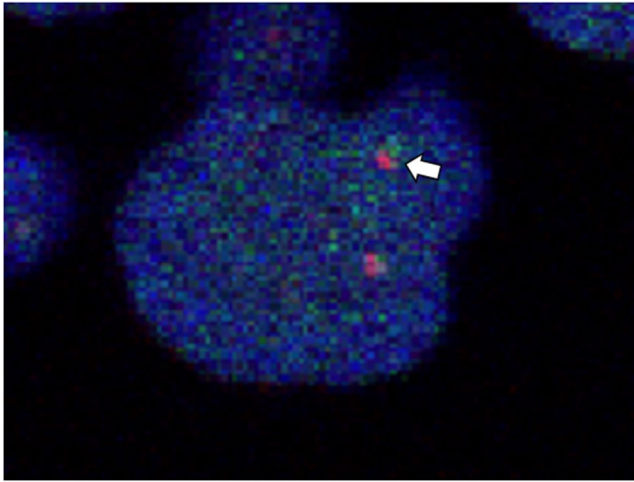
下図のように TERT の上流と下流にそれぞれプローブを設定し、TERT-PR 領域の再構成の有無について検討を行った。この蛍光が通常であれば同一部位に重なって観察されるが、これが分離して観察されるものは TERT の再構成ありと判定する。



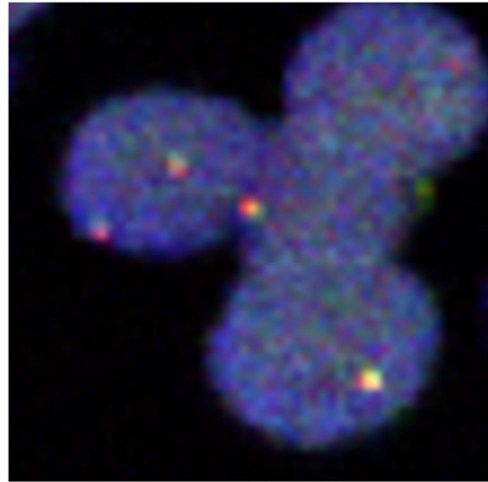
多重染色 FISH 法でのプローブの位置



腫瘍培養検体での検討



TERT-PR rearrangement +



TERT-PR wild

FFPE 検体での検討：TERT 再構成のある症例では緑と赤の蛍光が分離して確認でき、Wild タイプでは、接触または黄色の蛍光として確認される。

一部の症例にて培養検体と FFPE 検体ともに本法で TERT-PR rearrangement の検出が可能ではあったが、再構成部位が近接している場合には判定は難しいと考えられ、再構成が明らかではない症例においては、リアルタイム PCR 法などその他の方法での確認を要すると考えられた。研究期間中に新規に発生した 10 例の神経芽腫の症例を次世代シーケンサーにて検討を行ったが、TERT-PR rearrangement を認める症例は検出できず、本法のさらなる検討を進めることが出来なかった。

副次的に 1 例にて MYCN 増幅と MYCN 変異が共存している症例を認めた。これまでの定説では、MYCN 増幅と変異は共存しないと考えられていたため、世界的に稀な症例として報告を行った。

(<https://doi.org/10.1002/psc.31115>)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masato Kojima, Takanori Harada, Takahiro Fukazawa, Sho Kurihara, Ryo Touge, Isamu Saeki, Shinya Takahashi, Eiso Hiyama	4. 巻 -
2. 論文標題 Coexistence of MYCN activating mutation and amplication in a patient with neuroblastoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	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） 10.1002/pbc.31115	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 Kojima Masato, Harada Takanori, Fukazawa Takahiro, Kurihara Sho, Touge Ryo, Saeki Isamu, Takahashi Shinya, Hiyama Eiso	4. 巻 114
2. 論文標題 Single cell next generation sequencing of circulating tumor cells in patients with neuroblastoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1616 ~ 1624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15707	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 Hiyama Y, Yamaoka E, Fukazawa T, Kojima M, Sotomaru Y, Hiyama E	4. 巻 Oct 10;11(19)
2. 論文標題 In Vitro Transfection of Up-Regulated Genes Identified in Favorable-Outcome Neuroblastoma into Cell Lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11193171	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 Kojima M, Harada T, Fukazawa T, Kurihara S, Touge R, Saeki I, Takahashi S, Hiyama E	4. 巻 Apr;114(4)
2. 論文標題 Single-cell next-generation sequencing of circulating tumor cells in patients with neuroblastoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1616-1624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15707. Epub 2023 Jan 31	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 Masumi Kawashima, Yuka Ueda, Sho Kurihara, Eiso Hiyama	4. 巻 25
2. 論文標題 TERT promotor region rearrangements analyzed in high-risk neuroblastomas by FISH method and whole genome sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 2166-2174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01773-z	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12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Sho Kurihara, Masato Kojima, Ryo Touge, Isamu Saeki, Eiso Hiyama
2. 発表標題 MYCN amplification and mutation was detected in the one-year-old boy with neuroblastoma and pleural effusion at diagnosis
3. 学会等名 The Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 栗原 将, 藤解 諒, 兒島 正人, 佐伯 勇, 檜山 英三
2. 発表標題 肝限局性結節性過形成 (FNH) の自然退縮後に同部に肝芽腫を発症した18トリソミーの1例
3. 学会等名 第63回中国四国小児がん小児外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗原 将, 藤解 諒, 兒島 正人, 佐伯 勇, 檜山 英三
2. 発表標題 先天性胆道閉鎖症術後、肝門部空腸静脈瘤出血に対して開腹下血管塞栓術を施行した2例
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 兒島 正人, 栗原 將, 佐伯 勇, 石川 暢恒, 檜山 英三
2. 発表標題 抗 NMDAR 脳炎を合併した未熟奇形腫に対して腫瘍摘出術を施行した 2 例
3. 学会等名 第59回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 兒島 正人, 藤解 諒, 栗原 將, 佐伯 勇, 松村 梨紗, 岡田 賢, 恵美 純子, 檜井 孝夫, 檜山 英三
2. 発表標題 遺伝子検査により、リ・フラウメニ症候群と診断した骨肉腫の1例
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗原 將, 佐伯 勇, 見島正人, 檜山英三
2. 発表標題 膵原発mucinous cystic neoplasm 1歳9ヵ月女児の1例
3. 学会等名 第62回中国四国小児がん研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原 將, 佐伯 勇, 檜山英三
2. 発表標題 当科で経験した先天性門脈体循環シャント (CPSS) の8例
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 見島正人, 栗原 将, 佐伯 勇, 檜山英三
2. 発表標題 神経芽腫に対するctDNA、CTCを用いたMYCN増幅検出によるLiquid biopsy
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原 将, 兒島 正人, 佐伯 勇, 今治 玲助, 檜山 英三
2. 発表標題 初診時悪性腫瘍を疑った精索血管腫の7ヵ月男児の1例
3. 学会等名 第61回中国四国小児がん・小児外科研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原将, 兒島正人, 赤峰翔, 佐伯勇, 檜山英三
2. 発表標題 当科における末梢挿入式中心静脈カテーテル留置の経験
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原 将, 佐伯 勇, 兒島 正人, 檜山 英三
2. 発表標題 Li-Faumeni 症候群の巨大後腹膜原発横紋筋肉腫に対して局所療法を施行した一例
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原 将, 佐伯 勇, 檜山 英三
2. 発表標題 当科で経験した先天性門脈体循環シャント (CPSS) の8例
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会中国四国地方会
4. 発表年 2020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
研究分担者	檜山 英三 (Hiyama Eiso) (00218744)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・特任教授 (15401)	

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