

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2012～2012

課題番号：24650612

研究課題名（和文）放射線療法、化学療法によるゲノム異常と遺伝的影響に関する検討

研究課題名（英文）Genomic mutations and their transmission in survivors of childhood cancer treated with radiation and chemotherapy

研究代表者

上松瀬 新 (KAMIMATSUSE ARATA)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：90569881

研究成果の概要（和文）：小児がん経験者26例について、SNPアレイとマイクロサテライトマーカーを用いて治療前と現在の血液細胞のゲノムについて比較解析した。その結果、全例にゲノム上に21～2,754（平均476）箇所にSNPまたはコピー数変化を認めた。マイクロサテライトマーカー変異を2例に見出した。これらの小児がん経験者の児と配偶者の同様の解析から、児に変異が伝播していたのは3例で、このうち1例はマイクロサテライト変異も伝播していた。ゲノムの変異はアントラサイクリン系薬剤と放射線療法が関連し、伝播した3例はいずれも女性の経験者であった。以上から、小児がん治療で生じたゲノムの変化の一部は次世代に移行することが示された。

研究成果の概要（英文）：Genomic mutations and their transmission were analyzed using SNP array and microsatellite markers in the DNAs derived from peripheral blood cells before and after radiation and chemotherapy in 26 survivors of childhood cancer. In all cases, aberrations of SNP or copy numbers were detected between 21 and 2,745 markers (mean: 476). Microsatellite mutations were detected in 2 cases. The same analyses in the DNAs of children and partners in these cases, transmission of genomic mutation were confirmed in 3 cases and microsatellite mutations were detected in one of these 3 cases. These mutations were significantly correlated with usage of anthracycline agents and radiation therapy. All these survivors were female. These data suggested that genomic mutations derived from childhood cancer therapy transmit to the next generation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：小児腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

小児がんは、医療の進歩によってその治癒率が次第に向上し今や治癒率が全体で7割を越え、小児がん経験者は20歳代では1,000人に一人という時代となり、今後は700人に一人という時代も間もなくである。そうした中で、経験者が小児期に受けた治療による晩期合併症が次第にクローズアップされてき

ており、特に二次がんの発症への関与が指摘されている。すでに、欧米では既にこれらの研究に着手され、胎内死亡や低出生体重児の出生リスクが示されているが、ゲノム異常について詳細に検討した報告はない。

放射線治療をはじめ小児がんの治療を受けた小児がん経験者では、その後中枢神経系二次癌を発症するリスクが上昇することを

報告され、経験者へのゲノム異常は明らかである。平成 23 年 3 月の東日本大震災による福島原発の被曝は、被曝がどの程度ゲノムに影響しさらに遺伝的影響となるのかについての大きな問題提起となっている。

## 2. 研究の目的

当科に 1980 年から保存されている小児がん患者検体のうち、治癒しその後に児を作った症例の治療前の血液検体とさらに治療後血液とさらに次世代の児の血液由来の DNA を対象に、網羅的ゲノム解析やミニサテライトマーカーを用いて検討し、放射線や化学療法剤の遺伝的影響について検討する。これらの成果は、現在の放射線被曝問題を解決する一助となる。

## 3. 研究の方法

1980 年以降広島大学にて治療を行った小児がん患者のうち、同意を得てゲノム（血液検体）を保存し得た約 1000 例のうち、小児がんが治癒し、その後フォローアップ中に次世代の児を持ちえた 26 組を用いて以下の検討を行う。研究には、成人後に再度同意を得ており、可能であれば同意を得て夫婦の相手のゲノムについても対象とする。

26 例は、神経芽腫 9 例、腎芽腫 5 例、肝芽腫 3 例、悪性リンパ腫 4 例、横紋筋肉腫 2 例、悪性胚細胞腫 3 例であり、化学療法は全例が放射線療法を 20 例が受けている。他家骨髄移植例は除外した。

### (1) 治療前後のゲノム解析

マイクロアレイ解析：高密度で 100 万コピー数のマーカーが搭載されたマイクロアレイ (Affymetrix® SNP6.0 アレイ)、を用いて、小児がん経験者の治療前と治療後のゲノムについて解析し、ゲノム解析ソフト (コンソール、Partek 6.5) を用いて、ゲノム上に生じている差異を検討した。

ミニサテライト、マイクロサテライト解析：ゲノム上に存在する反復配列であり、ミニサテライト、マイクロサテライトマーカーを用いて、ゲノム上のこれらの配列への治療の影響を検討するため、治療前と治療後の差異を、48 カ所のサイトについて、蛍光ラベル PCR でフラグメント解析にて検討を行った。

### (2) 次世代のゲノム解析：

経験者のその児、さらに可能であれば経験者の妻 (または夫) のゲノムを同様のプラットフォームにて解析する。1. で認められた異常を中心に解析し、遺伝的異常について評価した。

ミニサテライト、マイクロサテライト解析では、(1) で変化が認められた反復配列の部

位について検討を行った。

### (3) ゲノムの変化の評価：

患者の治療年齢、治療内容とくに放射線療法 (放射線治療の部位、線量、回数など) と化学療法 (薬剤、投与量、投与回数) などとゲノム異常の頻度、部位などを検討し、これらへの治療への関与を検討した。

さらに、児への遺伝的継承について検討し、これらの治療とくに放射線療法や化学療法によるゲノム異常の遺伝への可能性を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 治療前後のゲノム解析

各症例の治療前に採取した血液検体と治療後の現在の血液検体から分離した DNA を SNP アレイにて比較検討した。その結果、差異認められた SNP 数またコピー数の変化は 21~2,754 (平均 476) で、これらにうち、同一領域に存在している症例が 21 症例存在し、欠

表 1：解析症例

症例	性	病名	治療	部位	年齢(治療時 / 採取時)
1	女	神経芽腫	化/放	副腎	2/36
2	女	神経芽腫	化/放	副腎	1/34
3	男	神経芽腫	化/放	副腎	5/37
4	女	神経芽腫	化/放	後腹膜	3/34
5	男	神経芽腫	化/放	副腎	1/28
6	女	神経芽腫	化/放	副腎	2/30
7	男	神経芽腫	化/放	胸部	4/32
8	女	神経芽腫	化/放	骨盤	7/30
9	女	神経芽腫	化/放	副腎	0/26
10	男	腎芽腫	化/放	腎	2/38
11	女	腎芽腫	化/放	腎	3/32
12	女	腎芽腫	化/放	腎	4/30
13	女	腎芽腫	化	腎	2/27
14	男	腎芽腫	化	腎	1/25
15	男	肝芽腫	化	肝	4/36
16	女	肝芽腫	化	肝	2/30
17	男	肝芽腫	化	肝	1/29
18	男	悪性リンパ腫	化/放	胸部	7/34
19	女	悪性リンパ腫	化/放	胸部	8/33
20	女	悪性リンパ腫	化/放	腹部	6/30
21	男	悪性リンパ腫	化	頸部	10/32
22	男	横紋筋肉腫	化/放	後腹膜	2/36
23	女	横紋筋肉腫	化/放	背部	4/33
24	男	胚細胞腫	化/放	胸部	8/35
25	女	胚細胞腫	化/放	腹部	6/32
26	男	胚細胞腫	化/放	骨盤	10/37

化：化学療法、放：放射線療法

失、増加となっている領域として 0.2~70MB であった。これらは、マイクロアレイの

測定誤差による可能性も否定できないが、同一領域にあり欠失と考えられる結果は、がん治療に由来した体細胞のゲノムに生じた変化と考えられた。そこで、この21例は症例9、13、15、17、21を除いた症例であり、放射線療法を受けた症例が多い傾向にあった。

この欠失部位については一定の傾向がなく、どの染色体にもみられるものであり、同一症例でも複数箇所（最大6か所）に分かれて検出される症例もあった。

さらに、48か所のマイクロサテライトの変異について検討した。748のマイクロサテライトのインフォーマティブアレルにおいて、変異を12か所で認めた。これらは、2例(症例23、25)に集積していた。

これらの変化が、体内のすべての細胞に同様に生じているかどうかは不明であるが、こうした変異は少なくとも血液幹細胞に生じている変異と考えられる。これらが、胚細胞変異として継代されるかどうかは、血液幹細胞に変異がある症例に多い可能性が考えられた。

#### (2) 次世代のゲノム解析：

経験者のその児、さらに可能であれば経験者の妻（または夫）のゲノムを SNP6 アレイで検索した。1. で認められた異常を中心に解析し、遺伝的異常について評価した。児のゲノムを同様のプラットフォームにて解析しえた症例は22組で、そのうち配偶者のゲノムも解析可能であったのは16例であった。1. で認められた異常 SNP の伝搬を中心に解析し、児に伝搬していると考えられた変化は、変化部位の12376箇所のうち、42箇所であった。この42箇所は3例に集積していた(症例8、11、23)。

マイクロサテライト解析では、(1)で変化が認められた反復配列の部位について検討を行ったが、児にも同様の変異したマイクロサテライトアレルは1例(症例23)に認められた。

#### (3) ゲノムの変化の評価：

上記で認められた小児がんサバイバーの変異は、血液幹細胞すなわち組織幹細胞に生じたものと考えられる。これらについて、SNP変異が400以下の症例(10例)とそれ以上の症例(16例)の二群に分けて、患者の治療法の内容について検討した。治療年齢には特に特徴はなかったが、放射線の投与量と回数に変異の多い症例が4例と14例であり、後者に有意に多かった ( $P < 0.05$ )。化学療法においては アンソラサイクリン系薬剤を投与している症例が、5例と15例で変異の多い群に多かった ( $P < 0.05$ )。

マイクロサテライト変異を認めた2例は両者とも放射線量と回数が多く、アンソラサ

イクリン系薬剤の投与も受けていた。放射線照射部位なども検討したが、特に特徴を見出せなかった。

一方、次世代の児に変異が伝搬していたことが示された3例(症例8、11、23)については、3例とも女兒であり、放射線量と回数が多い放射線療法を受けていた。これらの症例は、胚細胞に変異を生じて、これが児に伝搬していると考えられた。極めて興味深い結果であった。特に、マイクロサテライト変異も同時に伝搬している児もあり、こうした変異はゲノム上に蓄積してさらに次世代に伝搬する可能性が示唆された。

以上のデータから、今後、さらに配偶者の検討から、児に自然に生じた変異とこうした治療関連での変異を分別するなど、詳細な検討を行うこと。また、変異の蓄積量と治療内容の詳細に関連を検討することが必要であると考えられた。

さらに、児への遺伝的継承について検討し、これらの治療とくに放射線療法や化学療法によるゲノム異常の遺伝への可能性を検討した。

今回の検討では、小児がんの経験者の血液系細胞のゲノムの変化について、化学療法ではアンソラサイクリン系薬剤と放射線療法が関連していた。また、同時に検討しえた児の検討から、小児がん治療にて得たゲノムの変化の一部は次世代に移行することが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. López-Terrada D, et al. Proceedings of the Los Angeles COG International Liver Tumors Symposium. Modern Pathology. in press.
2. Ogura T, et al. Clinical feature of anaplastic lymphoma kinase-mutated neuroblastoma. Journal of Pediatric Surgery. 47: 1789-1796. 2012. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.05.007. 査読有
3. Iehara T, et al. Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12 months of age and older really excellent? European Journal of Cancer. 48: 1107-1112. 2012. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.01.010. 査読有.
4. Sakabe R, et al. Prognostic significance of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase expression in ampullary carcinoma. Annals of Surgical Oncology. 19: 3072-3080. 2012.

- DOI: 10.1245/s10434-012-2245-2. 査読有.
5. Yuasa Y, et al. Histological loss of pancreatic exocrine cells correlates with pancreatic exocrine function after pancreatic surgery. *Pancreas*. 41: 928-933. 2012. DOI: 10.1097/MPA.0b013e31823d837d. 査読有.
  6. Kanda A, et al. Establishment of ES cells from inbred strain mice by dual inhibition (2i). *J Reprod Dev*. 58: 77-83. 2012. URL: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/58/1/58\\_10-178A/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/58/1/58_10-178A/_article). 査読有.
  7. Tajiri T, et al. Surgical strategies for unresectable hepatoblastomas. *Journal of Pediatric Surgery*. 47: 2194-2198. 2012. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.09.006. 査読有.

[学会発表] (計 11 件)

1. Hiyama E, et al. Session of the discipline groups to plan for new trials. SIOPEL group Spring Meeting. March 15, 2013. Bologna, Italy.
2. Hiyama E, et al. Low risk hepatoblastoma. SIOPEL group Spring Meeting. March 14, 2013. Bologna, Italy.
3. Piotr Czauderna, et al. CHICS diagnostic risk grouping presentation. SIOPEL group Spring Meeting. March 14, 2013. Bologna, Italy.
4. Hiyama E. A genome-wide association study identifies new candidate loci associated with progression of hepatoblastoma in JPLT2 study experience. SIOP2012. October6, 2012. London. U.K
5. Kawashima M, et al. ALK activating infant neuroblastoma cases including mass-screening detected cases. SIOP2012. October6, 2012. London. U.K
6. Ueda Y, et al. Echanism of Wnt signal pathway activation in hepatoblastoma. SIOP2012. October6, 2012. London. U.K
7. Hiyama E. Identification of new candidate biomarkers in progression of neuroblastoma cells using differential transcriptome and proteome analysis. ANR2012. June 20, 2012. Toronto, Canada.
8. Hiyama E, et al. Next-generation sequencing: Integrated exotome analysis in human multiple neuroblastoma. ANR2012. June 19, 2012. Toronto, Canada.
9. Marcio H. Malogolowkin, et al. Hepatocellular carcinoma in children and Adolescents:The international Therapeutic experience. 43th APSA Annual Meeting APSA-IPSO SYMPOSIUM. MAY 19-20, 2012. TEXAS, USA.
10. 上松瀬 新, 他. 地方大学病院における小児がんの小児外科介入までの期間の検討. 第 49 回日本小児外科学会学術集会. 2012 年 5 月 14 日. 横浜市.
11. Hiyama E, et al. Cisplatin plus pirarubicin based chemotherapy for hepatoblastoma: Experience and future in japanese study group for pediatric liver tumor (JPLT). The 7th SIOP Asia Congress. April 22, 2012. Yogyakarta, Indonesia.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上松瀬 新 (KAMIMATSUSE ARATA)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号: 9 0 5 6 9 8 8 1

(2) 研究分担者

檜山 英三 (HIYAMA EISO)  
広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授  
研究者番号: 0 0 2 1 8 7 4 4

上田 祐華 (UEDA YUKA)  
広島大学・病院・医科診療医  
研究者番号: 7 0 6 2 4 6 4 1

(3) 連携研究者

なし