

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461573

研究課題名(和文)小児上衣腫の層別化および分子標的療法を目指した分子診断法の確立

研究課題名(英文)Classification of ependymoma of childhood and establishment of molecular diagnostic procedure for molecular target therapy of ependymoma.

研究代表者

塩原 正明 (Shiohara, Masaaki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00293514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 上衣腫13検体のSNP array解析では、1q gain、2q gain、5q lossが、それぞれ46%、31%、15%で認められた。(2) SNP arrayで確認できたcopy number variationのうち、1例の5q loss以外、FISH法で上記3種類のCNVが確認できた。(3) SNP arrayで確認できた、1q gain、2q gain、5q lossと上衣腫の予後との相関は明らかではなかった。また、nestin、tenascin-C、NELL2、LAMA2、KIF27の免疫染色の結果と上衣腫の予後との相関は明らかではなかった。

研究成果の概要(英文)：SNP array analysis using 13 samples of childhood ependymoma revealed that they have 1q gain (46%), 2q gain (31%), and 5q loss (15%), respectively. These copy number variations (CNV) are confirmed by FISH analysis, except for 1 sample of 5q loss. The relationship between these CNV revealed by SNP array and clinical prognosis of ependymoma are not revealed. The relationship between the results of immunostaining of samples (nestin, tenascin-C, NELL2, LAMA2, and KIF27) and clinical prognosis of ependymoma are not revealed, either.

研究分野：小児科学

キーワード：上衣腫 SNA array

1. 研究開始当初の背景

上衣腫は小児脳腫瘍では3番目に多い疾患である。手術、放射線照射および化学療法にも関わらず、中枢神経播種や再発が多く、長期生存は40%ほどしか得られない。組織診断のための特異抗体や疾患特異的遺伝子変異も見出されていないため、診断方法はいまだに光学顕微鏡レベルでの観察に依存している。またWHO gradingが必ずしも予後を反映しないことから、本疾患の不均一性が指摘され、そのことが有効な治療をさらに困難にしてきた。神経芽腫と異なり生物学的特性に裏付けられたリスク分類もなく、層別化に基づく臨床研究も行われてこなかった経緯がある。最近の本疾患の生物学的特性に関する報告では、遺伝子発現解析の結果から本疾患を臨床的、遺伝学的に2グループに分類可能(Cancer Cell 2011)とする報告、array comparative genomic hybridizationを用いた後頭蓋窩上衣腫の3つのサブグループ化(Cancer Cell 2005)などがある。これらの報告は、小児上衣腫における従来の組織病理的な悪性度分類に代わる分子分類の可能性を提示している。一方、上衣腫におけるエピジェネティックプロファイルに関する解析はほとんどなされていない現状がある。エピジェネティック解析が進んでいる神経芽腫では、アポトーシス関連遺伝子CASP81をはじめとした遺伝子群の高メチル化と予後との相関が報告されており、SNP arrayにより解析可能であるジェネティックな遺伝子構造の変化とエピジェネティックな特性の総合的解析により、上衣腫における生物学的特性を規定する重要な新規因子を解明できる可能性がある。

2. 研究の目的

上衣腫検体を用いて、1) 高密度 SNP array による全染色体の DNA 解析(図1)、2) 450K メチル化アレイを用いたメチル化プロファイル解析を行う。1)および2)による包括的解析により、従来の光学顕微鏡に依存した病理診断に代わる新規分子診断や層別化のための基礎データを提供できる。今まで見出すことができなかった上衣腫の難治化と関連した遺伝学的特性を明らかにすることで、上衣腫における分子標的療法を含めた新規治療への手掛かりをもたらすことが期待される。

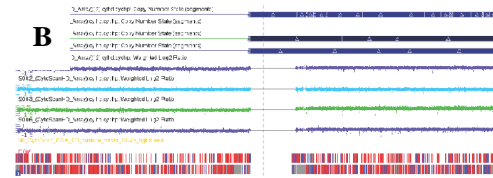


図1 SNP array による 1q 増幅解析例

A) Affymetrix 社 GeneChip Scanner 3000 7G
B) 上衣腫患者検体を用いて、高密度 SNP array を用いた copy number variation の解析を行った際の 1q gain の例。

3. 研究の方法

(1) 信州大学附属病院および長野県立こども病院における上衣腫 30 例(このうち 14 例では再発時検体も解析可能)の凍結検体、もし凍結検体がない場合はパラフィン包埋サンプルを用いて DNA を抽出する。Affymetrix 社 High Density SNP Array による全染色体にわたる allelotyping を CytoScanHD で行い、重複、欠失および LOH につき検討する。特に予後との相関がみられる 1q25 領域のコピー数増幅の有無との関連に着目する。

(2) 450K メチル化アレイを用いて上衣腫のメチル化プロファイル解析を行う。特に今までに報告のあるがん遺伝子、がん抑制遺伝子、およびエピジェネティック関連遺伝子に着目し、高メチル化/低メチル化が確認された遺伝子群における RNA レベルにおける発現を定量 RT-PCR を用いて確認を行う。

(3) 上記(1)(2)の結果と臨床情報との相関につき詳細に検討し、生物学的特性や階層的クラスタリングによるグループ化の可能性につき総合的に解明する。他に予後との相関が報告されている nestin, tenascin-C, NELL2, LAMA2 などの免疫組織染色によるマーカー発現との関係についても解析する(図2)

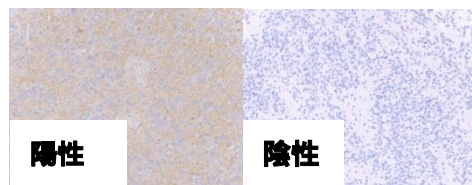


図2 nestin の免疫組織染色の結果の例

4. 研究成果

(1) 上衣腫 30 例のうち解析可能であった 13 検体(初発検体のみ)についての SNP array 解析では、1q gain、2q gain、5q loss が、それぞれ 46%(6/13)、31%(4/13)、15%(2/13)の割合で認められた(図3)。(2) SNP array で確認できた copy number alteration(CNA)のうち、1例の 5q loss 以外、FISH 法で上記 3 種類の CNA が確認できた。(3) SNP array で確認できた、1q gain、2q gain、5q loss

と上衣腫の臨床的予後(無増悪生存率および全生存率)とのログランク検定による相関は明らかではなかった。また、nestin、tenascin-C、NELL2、LAMA2、KIF27 の免疫染色の結果と上衣腫の臨床的予後とのログランク検定による相関は明らかではなかった(表1、図4)。なおメチル化プロファイル解析については、手技的な課題と残存検体量の問題から解析には至らなかった。

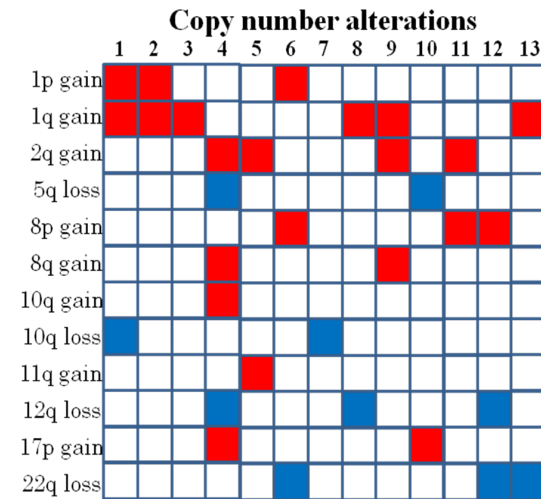


図3 SNP array 解析による copy number alteration の結果

		LAMA2	TenascinC	NELL2	KIF27	Nestin
1	テント上	-	-	+	±	+
2	テント下	-	-	-	-	-
3	テント下	-	-	-	-	+
4	テント下	-	-	-	-	-
5	テント下	-	-	-	-	-
6	テント下	-	-	-	-	-
7	テント下	-	-	-	-	+
8	テント下	-	-	-	-	+
9	テント上	+	-	-	-	-
10	テント下	-	-	-	-	+
11	テント下	-	+	-	-	+
12	テント下	-	+	-	-	+
13	テント下	-	-	-	-	-

表1 免疫組織染色の結果

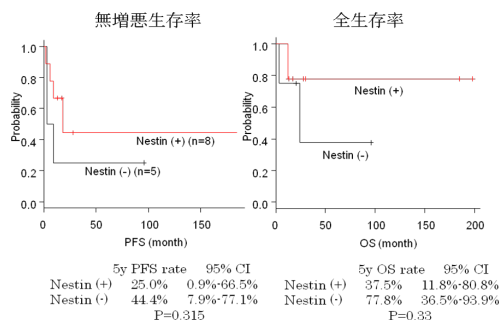


図4 nestin の発現と臨床的予後 (Kaplan-Meier 曲線) の解析
nestin の発現と無増悪生存率および全生存率との間に有意な相関はみられなかった。

<引用文献>

Witt H, Mack SC, Ryzhova M, Bender S, Sill M, Isserlin R, Benner A, Hielscher T, Milde T, Remke M, Jones DT,

Northcott PA, Garzia L, Bertrand KC, Wittmann A, Yao Y, Roberts SS, Massimi L, Van Meter T, Weiss WA, Gupta N, Grajkowska W, Lach B, Cho YJ, von Deimling A, Kulozik AE, Witt O, Bader GD, Hawkins CE, Tabori U, Guha A, Rutka JT, Lichter P, Korshunov A, Taylor MD, Pfister SM (2011) Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma. *Cancer Cell*. 20:143-57. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.07.007
Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X, Liu Y, Jensen P, Magdaleno S, Dalton J, Calabrese C, Board J, Macdonald T, Rutka J, Guha A, Gajjar A, Curran T, Gilbertson RJ (2005) Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell*. 8:323-35. Erratum in: *Cancer Cell*. 2006 9:70.

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10件)

Tanaka M, Kamata T, Yanagisawa R, Morita D, Saito S, Sakashita K, Shiohara M, Kurita H, Koike K, Nakazawa Y (2017) Increasing risk of disturbed root development in permanent teeth in childhood cancer survivors undergoing cancer treatment at older age. (査読有)*J Pediatr Hematol Oncol*. 39:150-154. DOI:10.1097/MPH.0000000000000788
Yanagisawa R, Shimodaira S, Sakashita K, Hidaka Y, Kojima S, Nishijima F, Hidaka E, Shiohara M, Nakamura T (2016) Factors related to allergic transfusion reactions and febrile non-haemolytic transfusion reactions in children. *Vox Sang*. 110:376-84. DOI: 10.1111/vox.12373.
Yanagisawa R, Takeuchi K, Komori K, Fujihara I, Hidaka Y, Morita D, Futatsugi A, Ono T, Hidaka E, Sakashita K, Shiohara M (2016) Hypoglycemia During the Temporary Interruption of Parenteral Nutrition Infusion in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. (査読有)*J Parenter Enteral Nutr*. PII: 0148607116665797.
Shibazaki T, Hirabayashi K, Saito S, Shigemura T, Nakazawa Y, Sakashita K, Takagi M, Shiohara M, Adachi K, Nanba

E, Sakai N, Koike K (2016) Clinical and laboratory outcomes after umbilical cord blood transplantation in a patient with mucopolysaccharidosis II alpha/beta. (査読有) Am J Med Genet 170:1278-1282.

DOI: 10.1002/ajmg.a.37563.

Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Saito S, Tanaka M, Shiohara M, Shimodaira S, Koike K (2016)

Intrathecal donor lymphocyte infusion for isolated leukemia relapse in the central nervous system following allogeneic stem cell transplantation: a case report and literature review. (査読有) Int J Hematol 103:107-111.

DOI: 10.1007/s12185-015-1902-1.

Komori K, Yanagisawa R, Miyairi Y, Sakashita K, Shiohara M, Fujihara I, Morita D, Nakamura T, Ogiso Y, Sano K, Shirahata M, Fukuoka K, Ichimura K, Shigeta H (2016) Temozolomide

Treatment for Pediatric Refractory Anaplastic Ependymoma with Low MGMT Protein Expression. (査読有) Pediatr Blood Cancer 63:152-155.

DOI: 10.1002/pbc.25696.

Shigemura T, Shiohara M, Kato M, Furuta S, Kaneda K, Morishita K, Hasegawa H, Fujii M, Gorlach A, Koike K, Kamata T (2015) Superoxide-generating Nox5 is functionally required for HTLV-1-induced cell transformation phenotype. (査読有) J Virol 89:9080-9089.

DOI: 10.1128/JVI.00983-15.

Yanagisawa R, Nakamura T, Ogiso Y, Hachiya A, Fujihara I, Morita D, Sakashita K, Kitamura M, Matsui H, Nishijima F, Hayashi H, Hidaka E, Sano K, Shiohara M, Yasukochi S (2015) Interleukin-8-producing primary cardiac undifferentiated sarcoma in a child with sustained fever. (査読有) Pediatr Int 57:742-745.

DOI: 10.1111/ped.12621.

Yanagisawa R, Ishii E, Motoki N, Yamazaki S, Morita D, Sakashita K, Shiohara M, Tanaka M, Hidaka Y, Kubota N, Hidaka E, Ogiso Y, Nakamura T, Yasukochi S (2015)

Pretransplant-corrected QT dispersion as a predictor of pericardial effusion after pediatric hematopoietic stem cell transplantation. (査読有) Transpl Int 28:565-574.

DOI: 10.1111/tri.12532.

Saito S, Yanagisawa R, Yoshikawa K, Higuchi Y, Koya T, Yoshizawa K, Tanaka M, Sakashita K, Kobayashi T, Kurata T, Hirabayashi K, Nakazawa Y, Shiohara M, Yonemitsu Y, Okamoto M, Sugiyama H, Koike K, Shimodaira S (2015) Safety and tolerability of allogeneic dendritic cell vaccination with induction of Wilms tumor 1-specific T cells in a pediatric donor and pediatric patient with relapsed leukemia: a case report and review of the literature. (査読有) Cytotherapy 17:330-335.

DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.10.003.

〔学会発表〕(計1件)

塩原正明、ほか 11 名 小児血縁末梢血ドナーにおける幹細胞採取量に関する検討 第38回日本造血細胞移植学会総会 2016年3月4日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩原 正明 (SHIOHARA, Masaaki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 00293514

(2) 研究分担者

重村 倫成 (SHIGEMURA, Tomonari)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号: 70623916