

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月29日現在

機関番号：82729

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09633

研究課題名(和文) 小児褐色細胞腫/パラグングリオーマの発症機序の解明

研究課題名(英文) Genetic and Pathogenic Mechanism of Pheochromocytoma and Paraganglioma in Childhood.

研究代表者

室谷 浩二 (MUROYA, Koji)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部長

研究者番号：60239556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：褐色細胞腫/パラグングリオーマ(PCC/PGL)患者9例について検討した。発症年齢は6-15歳、内訳は、片側PCC6例、両側PCC1例、片側PGL2例であった。全例、高血圧以外の非特異的な症状を主訴に初診していた。

患者の末梢血白血球および摘出した腫瘍からゲノムDNAを抽出し、分子遺伝学的解析を実施した。9例中7例に末梢血and/or 腫瘍組織で、VHL、SDHB変異を証明した(生殖細胞系列変異は5例)。生殖細胞系列変異の同定されなかった4例中2例で腫瘍組織由来での体細胞変異を同定した。生殖細胞系列変異の同定された5例中2例で、生殖細胞系列変異に加えて体細胞変異(2nd hit)を同定した。

研究成果の概要(英文)： We examined the clinical features of nine patients with pheochromocytoma/paragangliomas (PCC/PGL). The age of onset was 6-15 years. Six cases had unilateral PCC, one case had bilateral PCC, and two cases had unilateral PGL. All patients were diagnosed with PCC/PGL because of nonspecific symptoms other than hypertension. Most cases lacked at least one of three typical symptoms (headaches, palpitations, and excessive sweating).

After obtaining informed consent, we extracted genomic DNA from peripheral blood leukocytes and excised tumors, and performed genetic analysis. We found VHL or SDHB mutations in the DNA from leukocytes and/or excised tumors in seven out of nine cases. Germline mutations were identified in five cases (three VHL and two SDHB mutations). Somatic VHL mutations of tumor tissues were identified in two of four cases without germline mutations. Somatic SDHB mutation (2nd hit) was identified in two of five cases with germline mutations.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小児内分泌学 褐色細胞腫 パラグングリオーマ SDHB遺伝子 VHL遺伝子 GAPP分類

1. 研究開始当初の背景

(1) 褐色細胞腫/パラングリオーマ (以下 PCC/PGL) は、それぞれ副腎髄質、副腎外傍神経節のクロム親和性細胞より発生し、カテコラミンを産生する。近年、本症の病態形成に關与する生殖細胞系列変異、体細胞変異が次々報告されている (Burnichon N, et al. Hum Mol Genet 2011)。遺伝子変異の同定は、合併症や悪性化の予測に加え、将来的に分子標的薬の選択に有用であることが期待されるため、末梢血のみならず腫瘍組織での遺伝子解析の重要性が高まっている。有病率は 100 万人に 2 人、好発年齢は 40-50 歳であり、小児例は全体の 10% と稀である。しかし、小児では高血圧以外の非特異的症状を初発とする場合が多く、しばしば診断確定に長期間を要している。

(2) これまで小児例の遺伝学的背景についての報告は世界的に少なく、本邦小児例については未検討である。また、本邦成人例の診断数は増加しているものの、分子遺伝学的検討は十分に行われておらず、本邦では小児例、成人例ともに生殖細胞系列変異、体細胞変異の頻度は未確定である。海外では、遺伝子変異の創始者効果、人種差が想定されており、本邦患者を対象にした検討が急務である。

(3) 加えて小児例では、成人例よりも遺伝子解析の重要性が高いと予想される。過去の報告 (Neumann HP, et al. N Engl J Med 2002) では、生殖細胞系列変異が成人例 16% に対し、20 歳以下症例で 54%、10 歳以下症例に限ると 70% もの高い頻度で見いだされた。患児の両親、同胞、次子の罹患リスクが評価可能になること、および診断後の終生にわたる観察期間の長さを考慮すると、小児患者で生殖細胞系列変異を同定する意義は大きい。小児例で体細胞変異を同定する意義については知見に乏しいが、成人例と同様、体細胞変異は病態形成に關与すると推測される。

2. 研究の目的

小児褐色細胞腫/パラングリオーマ (PCC/PGL) は稀だが、高血圧以外の非特異的症状を初発とする場合が多いとされる。本研究の目的は、本邦 PCC/PGL 患者における遺伝学的特徴と腫瘍の生物学的特性を明らかにすることである。具体的には、本症患者において、1. 末梢血での生殖細胞系列遺伝子変異、腫瘍組織での体細胞遺伝子変異の検討、2. 腫瘍組織での GAPP 分類 (the Grading system for Adrenal Pheochromocytoma and Paraganglioma) による悪性度予測と各種免疫染色による変異遺伝子の推定、3. 臨床情報の収集と各遺伝子変異との関連性の検討を行う。遺伝子変異の同定は、合併症や悪性化の予測に有用であると同時に、近い将来、分子標的薬の選択に役立つことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 臨床症状の検討

小児期発症 PCC/PGL 患者を集積し、臨床症状を検討した。収集した臨床情報は、患者の年齢、性別に加えて、術前安静時の血圧および心拍数、術後の経時的変化、身長、体重の推移、術前における動悸、発汗過多、頭痛などカテコラミン過剰症状、術後の変化、家族性か散発例か、両側性か片側性か、多発性か単発性か、転移の有無、腫瘍が産生するカテコラミンの種類、他の合併症の有無、血清クロモグラニン A など腫瘍マーカーの推移、画像検査所見、である。

(2) 分子遺伝学的検討

今回集積した小児 PCC/PGL 9 症例からインフォームド・コンセントを取得後、末梢血白血球および摘出した腫瘍からゲノム DNA を抽出した。抽出した末梢血由来 DNA、腫瘍由来 DNA を対象に、既知原因遺伝子を包括的に解析した。まず、Sanger 法で、RET、VHL、SDHB、SDHD 遺伝子の変異解析を施行。変異が同定されなかった場合、MLPA 法 (multiplex ligation-dependent probe amplification) で、VHL、SDHB、SDHD 遺伝子の欠失解析を追加した。

4. 研究成果

(1) 臨床症状の検討

小児期発症 PCC/PGL 患者 9 例を集積した。発症年齢は 6-15 歳、内訳は、片側 PCC 6 例、両側 PCC 1 例、片側 PGL 2 例であった。全例、高血圧以外の非特異的な症状を主訴に初診していた。成人症例では、高血圧に加えて、頭痛、動悸、発汗過多が 3 主徴と言われているが、今回の 9 症例では、これら 3 主徴が揃わない症例が多くみられた。小児では高血圧以外の非特異的症状を初発とする場合が多いことから、しばしば診断確定に長期間を要していると推測される。日常診療における血圧測定的重要性や、非特異的症状から褐色細胞腫の可能性を想起することを、広く一般小児科医に啓蒙していく必要があるものと考えられた。

(2) 分子遺伝学的検討

分子遺伝学的解析の結果、9 例中 7 例に、末梢血 and/or 腫瘍組織で VHL、SDHB 変異を証明した。末梢血由来 DNA で変異 (生殖細胞系列変異) が同定されたのは 5 例であった。生殖細胞系列変異の同定されなかった 4 例のうち 2 例で、腫瘍組織由来 DNA での変異 (体細胞変異) を同定した。生殖細胞系列変異の同定された 5 例のうち 2 例で、生殖細胞系列変異に加えて同じ遺伝子の体細胞変異 (2nd hit) を同定した。

今回同定された変異を症例順に記載する。症例 1: VHL の体細胞変異 c.514_522dupCCTGAGAAT (p.172P_174Ndup) を同定。症例 2: VHL の体細胞変異 c.482G>A (p.R161Q) を同定。症例 3: VHL の生殖細胞

系列変異 c.482G>A (p.R161Q) を同定 (von Hippel-Lindau 病と確定). VHL の生殖細胞系列変異が de novo であることも確認した. 症例 4: SDHB の生殖細胞系列変異 c.423+1G>A (g.25572G>A) に加え, 体細胞変異として SDHB 遺伝子全体の欠失 (2nd hit) を同定. SDHB の生殖細胞系列変異が de novo であることも確認した. 症例 5: 生殖細胞系列変異, 体細胞変異とも同定されず. 症例 6: SDHB の生殖細胞系列変異 c.137G>A (p.R46Q) に加え, 体細胞変異として SDHB 遺伝子 exon 2&3 の欠失 (2nd hit) を同定. SDHB の生殖細胞系列変異が母由来であることも確認した. 症例 7: 生殖細胞系列変異, 体細胞変異とも同定されず. 症例 8: VHL の生殖細胞系列変異 c.482G>A (p.R161Q) を同定 (von Hippel-Lindau 病と確定). VHL の生殖細胞系列変異が de novo であることも確認した. 症例 9: VHL の生殖細胞系列変異 c.496 G>T (p.V166F) を同定 (von Hippel-Lindau 病と確定). VHL の生殖細胞系列変異が母由来であることも確認した.

今後, さらなる病態解明をめざし, 1. VHL 体細胞変異のみを認めた症例において, 腫瘍組織での VHL 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析, 2. 生殖細胞系列変異, 体細胞変異いずれも認めなかった症例において, 他の既知原因遺伝子を対象とした Sanger 法による解析, 腫瘍組織でのアレイ CGH 解析, を行う方針である. 加えて, 摘出腫瘍の病理組織標本を用いて GAPP 分類, SDHB 免疫染色を行い, 悪性化, 変異遺伝子との関連性を検討する計画である.

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4件)

1) Miyado M, Muroya K, Katsumi M, Saito K, Kon M, Fukami M. Somatic Acquired Isodicentric Y and Mosaic Loss of Chromosome Y in a Boy with Hypospadias. *Cytogenet Genome Res* 154(3): 122-125, 2018. doi: 10.1159/000488162. [査読あり]

2) Nakamura A, Muroya K, Ogata-Kawata H, Nakabayashi K, Matsubara K, Ogata T, Kurosawa K, Fukami M, Kagami M. A case of paternal uniparental isodisomy for chromosome 7 associated with overgrowth. *J Med Genet* 2018 Feb 17. [Epub ahead of print]doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104986. [査読あり]

3) Handa A, Muroya K, Ishii T, Nishimura G. Additional report on Moreno-Nishimura-Schmidt overgrowth syndrome. *Am J Med Genet A* 173(10): 2834-2837, 2017. doi: 10.1002/ajmg.a.38368. [査読あり]

4) Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Yamashita S, Nozawa K, Masudo K, Yamakawa T, Asakura Y, Hasegawa T, Adachi M. Potential utility of cinacalcet as a treatment for CDC73-related primary hyperparathyroidism: a case report. *Clin Pediatr Endocrinol* 25: 91-98, 2016. doi: 10.1297/cpe.25.91. [査読あり]

[学会発表](計2件)

1) Iwano R, Muroya K, Nakajima H, Hanakawa J, Asakura Y, Kagimoto M, Yatsu K, Okuyama T, Adachi M. LC-MS/MS screening analysis of plasma lyso-Gb3 for Fabry disease in patients with left ventricular hypertrophy. The 14th Asian Symposium of Inherited Metabolic Diseases, 2016.

2) Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Oto Y, Asakura Y, Kitagawa N, Shinkai M, Tanaka Y, Imamura H, Nunoi H, Onishi T, Kimura N, Takekoshi K, Hasegawa T, Adachi M. Clinical features of four Japanese pediatric patients with PHEO/PGL: the implications of clinical heterogeneity. International Symposium on Pheochromocytoma and Paraganglioma 2014, 2014.

[図書](計1件)

室谷 浩二, 佐藤 武志. 小児の褐色細胞腫. 褐色細胞腫診療マニュアル改訂第3版(成瀬 光栄, 平田 結喜緒, 田辺 晶代 編集) p121-p124, 診断と治療社, 2017.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他] 特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室谷 浩二 (MUROYA, Koji)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構
神奈川県立こども医療センター・臨床研究
所・部長(採択時は, 医長)

研究者番号: 60239556

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

佐藤 武志 (SATO, Takeshi)

慶應義塾大学・医学部小児科・助教

木村 伯子 (KIMURA, Noriko)

国立病院機構函館病院・病理診断科・部長

竹腰 一博 (TAKEKOSHI, Kazuhiro)
筑波大学・医学医療系・教授