

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15644

研究課題名(和文) 小児期の放射線、化学療法によるゲノム障害の二次癌発症および遺伝的伝播に関する検討

研究課題名(英文) Effects of genomic damage by chemo-radiation therapy during childhood for secondary malignancy and genetic inheritance

研究代表者

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：00218744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：1980年以降広島大学にて治療を行い次世代の児を持ちえた小児がん患者と配偶者、その児の15組のゲノム解析を施行した。進行小児がん経験者6例の治療前と治療後の体細胞DNAのエクソーム解析で、治療後に変異が2、9、12、16、32、84個検出された。また、二次がんを発症した2例を含む4例の全ゲノムシーケンスでは126、87、73と198であった。児について3組のエクソーム解析では、1例では84個中3個、1例で12個中1個が児に伝播している可能性が示唆された。先の2例を含む二次がん症例4例のエクソーム解析では、二次がん発症例に共通の変異や変異シグネチャーは同定できなかった。

研究成果の概要(英文)：Genomic sequencing analysis was performed in the 15 groups consisting of the survivor who had undergone the treatment for childhood cancer after 1980, its partner, and descendant. Among 6 survivors whose tumors had been advanced of stage, exome analysis revealed 2, 9, 12, 16, 32, and 84 mutations occurred after treatment, respectively. Among 4 survivors including 2 survivors with secondary malignancy, whole genome sequencing revealed 126, 87, 73, 198 mutations occurred after treatment. The genomic analysis of 3 descendants using exome analysis, 3 of 84, 1 of 12, and 0 of 34 mutations were suspected to be inherited, respectively. The exome analysis of 4 cases with secondary malignancies showed no common mutations nor mutation signatures.

研究分野：小児腫瘍学、小児外科学

キーワード：ゲノム 放射線 がん 遺伝学 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

小児がんは、診断と治療法の進歩によってその治癒率が向上し今や治癒率が全体で約8割に迫り、小児がん経験者は20歳代では1,000人に一人を越え、全体で700人に一人という時代を迎えようとしている。そうした中で、小児がん経験者が小児期に受けた治療による晩期合併症、特に、二次がんの発症リスクの増加が指摘され、30年後には20人に1人が二次がんを発症するとの報告もある(*J Cancer Survivor 2013; 7:544-50*)。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も示されている(*Lancet 2010; 376:624-30, J Clin Oncol 2010; 28:2824-2830.*)。しかし、放射線療法や化学療法後のゲノム異常について詳細に検討した報告はない。

2. 研究の目的

そこで、1980年頃から当科及び関連施設で治療した小児がん患者では、そのほとんどの症例で治療前の血液と腫瘍が同意のもとに保存されていることから、本研究では、小児がんから治癒した症例で、その患者と二次がんを発症例、また、次世代が出生している場合はその児を再度同意の上対象とし、治療(放射線療法、化学療法など)による患者自身のゲノムへの影響と晩期合併症、特に二次がんとの関連を、近年のゲノム研究ツールを用いて、次世代のゲノムとともに検討することで、化学療法や放射線療法のゲノム障害とさらに遺伝的影響の検討を行うことを目的とした。

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、同意を得て血液検体(ゲノム)を保存し得た約800例のうち、小児がんが治癒し、その後フォローアップされ成人に至った96例で、とくにその中で次世代の

児を持ちえた28組を中心に以下の検討を行う。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。

28例は、神経芽腫9例、腎芽腫6例、肝芽腫3例、悪性リンパ腫4例、横紋筋肉腫3例、悪性胚細胞腫1例、その他2例であり、化学療法を全例が、放射線療法を21例が受けている。

また、二次がんを発症した7例についても同意を得て、以下の検討を行う予定とした。

1) 治療前後のゲノム解析

1.1 エクソーム解析: 現有の次世代シーケンサー(Hi-seq2500)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、当科で開発したエクソーム解析ソフト(Partek 6.6、Mazeソフト)を用いて、ゲノムのエクソン上に生じている差異を検討した。

1.2 全ゲノム解析: 現有する次世代シーケンサーを用いて、low depthにて全ゲノムシーケンスを治療前後で行い、エクソン以外のゲノム異常についてスクリーニングする。また、二次がんを発症した7例中2例を中心に治療前後の血液細胞と二次がん組織の全ゲノムの変化を通常のdepthで検索し、共通の異常部位の有無を探索した。

2) 次世代のゲノム解析

小児がん経験者とその児、さらに可能であれば経験者の妻(または夫)について、1.で認められた変異部位を中心に解析し、遺伝的異常について評価する。解析には、ターゲットシーケンスあるいは通常のシーケンシング法、PCR法、マイクロサテライト・ミニサテライト解析などを用いて検索する。

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、これらの治療への関与を検討する。また、二次がん症例については共通の部位、あるいは変異のパターンなどを解析し、二次がん発症の成因を探索する。

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する。

4. 研究成果

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、小児がんが治癒し、その後フォローアップされ成人に至り次世代の児を持ちえた 28 組中、同意を得て実際に検体が入りできた 15 組および配偶者のゲノムについて解析した(表 1)。神経芽腫 6 例、腎芽腫 3 例、肝芽腫 1 例、悪性リンパ腫 2 例、横紋筋肉腫 2 例、悪性胚細胞腫 1 例であり、化学療法を全例が、放射線療法を 6 例が受けていた。また、二次がんを発症した 4 例についても同意を得て、検討した。

1. 治療前後のゲノム解析:エクソーム解析：進行小児がん経験者 6 例の治療前と治療後の体細胞 DNA のエクソーム解析を行ったところ、エクソーム上に生じた変異が 2、9、12、16、32、84 個検出された。また、2 例について、low depth にて全ゲノムシーケンスを治療前後で行い、全ゲノム上での変異の検出を試みたところ 126、187 個であった。また、二次がんを発症した 2 例も同様に治療前後と二次がん組織の全ゲノムシーケンスを施行したが、治療後は 73 と 198 でそのうち二次がんではさらに 2,000 個以上の変異を認められた。

2. 次世代のゲノム解析:小児がん経験者とその配偶者と児について 3 組のエクソーム解析を行った。3 組とも、化学療法と放射線療法がおこなわれた症例で 1 . で認められた変異

部位を中心に解析したところ、2 歳時に治療を受けた 1 例では 84 個中 3 個、3 歳時に治療を受けた 1 例で 12 個中 1 個が児に伝搬している可能性が示唆された。前者は、患者の治療年齢、治療内容とくに腹部の放射線療法が影響している可能性が示唆され、今後症例を重ねて検討することとした。また、二次がん症例については 1 . の 2 例に加えて二次がんを発症した体細胞ゲノムを 2 例のエクソーム解析を行って検討したが、二次がん症例に共通の部位、あるいは変異のパターンは同定できず、今後さらに症例を追加して検討することが必要と考えられた。

表 1：小児がん患者の治療後のゲノム上の変異数と児への伝播

症例	病名	放射線療法	変異数	児への伝播
1	神経芽腫	なし	0	-
2	神経芽腫	なし	0	-
3	神経芽腫	なし	16	0
4	神経芽腫	あり	32	-
5	神経芽腫	あり	126*	-
6	神経芽腫†	あり	73*	-
7	腎芽腫	なし	0	-
8	腎芽腫	なし	0	-
9	腎芽腫	あり	9	-
10	肝芽腫†	なし	198*	-
11	悪性リンパ腫	なし	0	-
12	悪性リンパ腫	なし	12	1
13	横紋筋肉腫	あり	187*	-
14	横紋筋肉腫	あり	84	3
15	悪性胚細胞腫	なし	0	-

†: 二次がん発症例、*: 全ゲノム解析(他は、エクソーム解析)、- : 未検討
全例化学療法を受けている。

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5件)

1. Honda S, Minato M, Suzuki H, Fujiyoshi M, Miyagi H, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A, Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma: Four novel tumor suppressor candidates, *Cancer Science*, 査読有, 2016, in press, DOI: 10.1111/cas.12928.
2. Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Sueda T, Ohta E, Morihara N, Hirano S, Irisuna F, Hiyama E, Circulating free DNA as non-invasive diagnostic biomarker for childhood solid tumors, *Journal of Pediatric Surgery*, 50, 査読有, 2015, pp2094-2097, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2015.08.033.
3. Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Yano M, Oue T, Iehara T, Hoshino K, Koh K, Tanaka Y, Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Mortality and morbidity in primarily resected hepatoblastomas in Japan: Experience of the JPLT (Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor) trials, *Journal of Pediatric Surgery*, 50, 査読有, 2015, pp2098-2101, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2015.08.035.
4. Hiyama E, Ali A, Amer S, Harada T, Shimamoto K, Furushima R, Abouleila Y, Emara S, Masujima T, Direct Lipido-Metabolomics of Single Floating Cells for Analysis of Circulating Tumor Cells by Live Single-cell Mass Spectrometry, *Analytical Sciences*, 1, 査読有, 2015, pp1215-1217, DOI:10.2116/analsci.31.1215.
5. Czauderna P, Haeberle B, Hiyama E, Rangaswami A, Krailo M, Maibach R, Rinaldi E, Feng Y, Aronson D, Malogolowkin M, Yoshimura K, Leuschner I, Lopez-Terrada D,

Hishiki T, Perilongo G, von Schweinitz D, Schmid I, Watanabe K, Derosa M, Meyers R, The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model, *European Journal of Cancer*, 1, 査読有, 2015, pp92-101, DOI: 10.1016/j.ejca.2015.09.023.

〔学会発表〕(計9件)

1. Hiyama E, Exome sequencing of hepatoblastoma identifies biological signatures and potential therapeutic targets, *International Pediatric Liver Tumor Symposium*, 25-26 Feb 2016, Texas (U.S.A)
2. 檜山 英三, 小児肝がんに対するゲノム解析と国際共同臨床試験へのアプローチ, 第53回日本癌治療学会学術集会, 2015年10月29-31日, 国立京都国際会館(京都市)
3. Watanabe K, Hishiki T, Ida K, Oue T, Yano M, Hoshino K, Iehara T, Koh K, Tanaka Y, Hiyama E, Congenital hepatoblastoma in JPLT-2 study, *SIOP 2015*, 8-11 Oct 2015, Cape Town (South Africa)
4. Yoneda A, Tajiri T, Hiyama E, Iehara T, Hishiki T, Sugito K, Hayashi Y, Maeda K, Yonekura T Changes in the clinical features of neuroblastoma 10 years after the cessation of mass screening in Japan, *SIOP 2015*, 8-11 Oct 2015, Cape Town (South Africa)
5. Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Ueda Y, Morihara N, Fukuba I, Komatsu R, Integrated exome analysis in childhood hepatoblastoma: Biological approach for molecular targeting, *SIOP 2015*, 8-11 Oct 2015, Cape Town (South Africa)
6. Hiyama E, Hishiki T, Ida K, Watanabe K,

Oue T, Yano M, Hoshino K, Iehara T, Koh K, Tanaka Y, Kurihara S, Ueda Y, Prediction of prognosis by preoperative chemotherapy response in hepatoblastoma patients treated by JPLT-2 protocol, SIOP 2015, 8-11 Oct 2015, Cape Town (South Africa)

7. Hiyama E, Kurihara S, Ueda Y, Hishiki T, Ida K, Iehara T, Oue T, Yano M, Watanabe K, Hoshino K, Ko K, Tanaka Y, Survival and late effects in the risk-stratified hepatoblastoma patients treated by JPLT-2 protocol, 2015 ASCO Annual Meeting, 29 May-6 Jun 2015, Chicago (U.S.A)

8. Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Yano M, Oue T, Iehara T, Hoshino K, Koh K, Tanaka Y, Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Mortality and morbidity in primarily resected hepatoblastomas in Japan: experience of JPLT (Japanese study group for pediatric liver tumor) trials, 48th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, 17-21 May 2015, Jeju (South Korea)

9. Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Sueda T, Ohta E, Morihara N, Hirano S, Irisuna F, Hiyama E, Circulating free DNA as non-invasive diagnostic biomarker for childhood solid tumors, 48th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, 17-21 May 2015, Jeju (South Korea)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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：00218744

(2)研究分担者

栗原 将 (KURIHARA SHO)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号：40724894