

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19662

研究課題名(和文)ランゲルハンス細胞組織球症における微小残存病変評価法の確立

研究課題名(英文)Minimal residual disease analysis in Langerhans cell histiocytosis

研究代表者

翁 由紀子(OH, YUKIKO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30438650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)患者の血液中では、病変由来の変異遺伝子BRAF V600Eが、28.5%(84症例中24症例)の確率で陽性だった。BRAF V600E変異陽性の24症例中、13症例が、寛解導入療法前後のペアで、血漿を得ることができた。13例中、11例が治療後に低下していた。血液検査だけで、治療効果判定をすることができるようになるかもしれない。LCH患者では炎症性サイトカインが高値で病勢を反映していた。炎症性サイトカインをターゲットにした治療が予後の改善に役立つかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、ランゲルハンス細胞組織球症の治療効果判定は、症状、理学所見、非特異的血液検査所見、画像所見など総合的に評価していたが、本研究の成果により、明確な効果判定、残存腫瘍量の評価ができる可能性がある。血漿BRAF V600E定量が初期治療効果判定として使えることになれば、BRAF V600E変異陽性のLCHに対するBRAF阻害薬の使用を最適化できる可能性がある。従来はBRAF V600E変異有無は生検による組織検体でしか確認できなかったが、血漿を用いBRAF V600E変異が検出できるようになれば、一般診療で採取した血液の残余検体を用いるため患者の負担が非常に少なく検査が可能となる。

研究成果の概要(英文)：About thirty percent of patients with LCH(Langerhans cell histiocytosis) carried the BRAF-V600E mutation in peripheral blood. BRAF-V600E allele frequency decreased after induction therapy.

The LCH patients had significantly higher serum levels of inflammatory cytokine.

Numerous inflammatory cytokines and chemokines play a role in LCH. It is thought that the most responsible cytokines and chemokines may become future candidate therapeutic targets in LCH.

研究分野：小児血液学

キーワード：ランゲルハンス細胞組織球症 微小残存病変 炎症性サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

### 【LCHの病像は多彩で、腫瘍量を明確に評価する方法はない】

- LCHは乳幼児に好発する炎症性骨髄腫瘍である。LCH細胞は、骨髄由来で未熟樹状細胞の形質をもち、MAPキナーゼ経路の遺伝子に発がん性変異がみられる。LCHの病変部には、LCH細胞以外に様々な炎症細胞浸潤があり多量のサイトカインが分泌され、組織障害が生じる。

(Morimoto A, Oh Y. *Pediatr Int.* 2014)

- 病変は、皮膚、骨、肝脾、肺、造血器、中枢神経など全身に及ぶが、病型により予後は大きく異なる。骨単独病変、単一皮膚病変はしばしば自然治癒する。一方、多臓器型は抗がん剤による治療は必須であり、肝または脾・造血器に浸潤があり初期治療反応が不良な例は死亡率は40%に上る。また、病型に関わらず、しばしば再燃する。
- 治療反応性や病勢評価は治療選択において重要であり、画像や血液検査でなされるが、腫瘍マーカーはなく、標準的な方法はない(翁由紀子, 森本哲, 小児がん診療ハンドブック. 2011)。

### 【血漿中 cell-free DNA における BRAF V600E 定量 (血漿 BRAF V600E) は腫瘍の病勢を反映する】

- LCH細胞のMAPキナーゼ経路の遺伝子変異の中で、*BRAF V600E*が最も多く、LCH患者の約半数にこの変異が検出される (Bubolz AM, *Oncotarget.* 2014)。
- 転移性直腸癌患者での検討では、腫瘍が*BRAF V600E*陽性の場合、100%の確率で、血漿中に*BRAF V600E*を検出できる。この*BRAF V600E*は、血液を流れる腫瘍細胞に由来するのではなく、血漿 cell-free DNA に由来する (Thierry AR, *Nat Med.* 2014)。
- LCH患者8例での検討では、血漿*BRAF V600E*は、病勢を反映し、治療効果判定に有用である可能性がある (Kobayashi M, *blood.* 2014)。
- LCH含む組織球症患者での検討では、治療が進むにつれ、尿中 cell-free DNA 由来*BRAF V600E*は減少する (Hyman DM, *Cancer Discov.* 2015)。
- 2015年2月から国内で販売されている*BRAF V600E*陽性悪性黒色腫に適応がある*BRAF*阻害薬、ベムラフェニブは、化学療法の無効なハイリスクLCHの治療選択肢となる可能性がある (Heritier S, *JAMA Oncol.* 2015)。

## 2. 研究の目的

ランゲルハンス細胞組織球症 (Langerhans cell histiocytosis; LCH) における微小残存病変 (minimal residual disease; MRD) の評価方法を確立する。

LCHは、炎症性骨髄腫瘍であるが、病変は、皮膚、骨、肝脾、肺、造血器、中枢神経など全身に渡り、また腫瘍を形成しないこともあり、治療効果判定に必要な病変の定量が困難である。そこで、一般診療において採取する血液の残余検体を用いて、MRD評価方法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

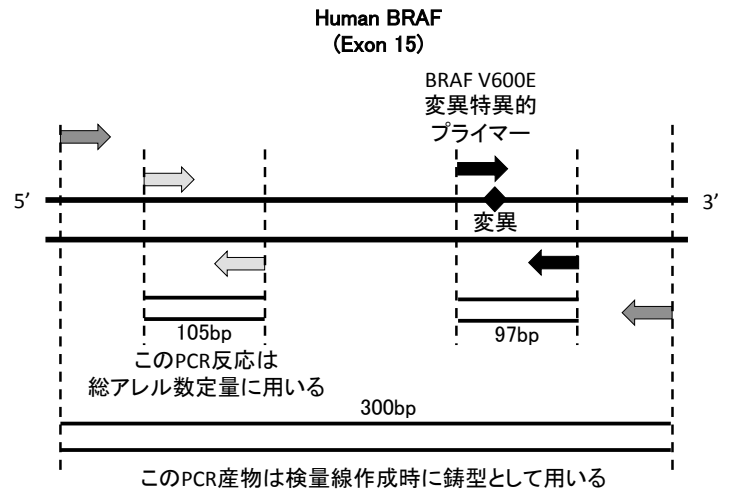
### (血漿 BRAF V600E について)

LCH患者において、治療前と6週間の寛解導入療法後の血漿*BRAF V600E*コピー数の変化が、予後に関連するかを検討する。

### **BRAF V600E の定量**

(検量線作成)

- (1). 当研究室で所有している、*BRAF* V600E 変異ホモ接合型の細胞株 FRO (ヒト甲状腺未分化癌細胞株) から DNA を抽出し、変異部分を含む約 300 base pair の領域 (右図) を、PCR 反応によって増幅する。



Thierry AR, Nat Med.2014 改変

- (2). (1) の PCR 産物を、QIAquick PCR purification kit (Qiagen) で精製し、電気泳動でバンドを確認する。分光光度計で DNA 濃度を測定し、分子数 (コピー数) を求める。
- (3). (2) の DNA を 6 段階に希釈し、これらを鑄型とし、総アレル定量用および *BRAF* V600E 変異検出用のプライマーを用い、リアルタイム PCR を行い、鑄型濃度と threshold cycle (Ct) 値から検量線を作成する。

総アレル定量用プライマー	forward	TTATTGACTCTAAGAGGAAAGATGAA
	reverse	GAGCAAGCATTATGAAGAGTTTAGG
BRAF V600E変異特異的プライマー	forward	GATTTTGGTCTAGCTACAGA
	reverse	TAGCCTCAATTCTTACCATCCACA
BRAF blocker*		GCTACAGTCAAATCTCGATGG-PHO

\*: 正常BRAFアレルが、BRAF V600E変異特異的プライマーによって増幅されることを防ぐ。

Thierry AR, Nat Med. 2014 改変

(患者血漿 *BRAF* V600E の定量 PCR)

- ① SYBR® Premix EX Taq™ (TaKaRa) 10  $\mu$  l、総アレル数定量用および *BRAF* V600E 変異検出用のプライマー計 0.8  $\mu$  l、*BRAF* blocker 0.4  $\mu$  l (前項表)、ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$  l、患者血漿由来 DNA 2  $\mu$  l、滅菌蒸留水 6.4  $\mu$  l を混合し、ウェルに注入する。
- ② 陰性コントロールとして、患者検体の代わりに、滅菌蒸留水を入れたウェルをおく。
- ③ Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR systems (Life Technologies) を用いて、95°C, 30 秒、[95°C, 3 秒、60°C, 30 秒] x 40 サイクル反応させる。
- ④ 得られた患者サンプルの Ct 値より、作成した検量線を用いて、コピー数を計算する。
- ⑤ 総アレルコピー数に対する、*BRAF* V600E アレルコピー数の割合を計算する。

(血清中サイトカイン・ケモカイン濃度の測定)

52 人の小児 LCH 患者 (多臓器型リスク臓器浸潤あり 8 人、多臓器型リスク臓器浸潤なし 25 人、単一臓器型 19 人) と 34 人の小児コントロールの血清を収集し、Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 21-plex & 27-plex Assay と Bio-Plex™ Suspension Array System (Bio-Rad) を使用して、48 種類のサイトカイン (IL-1 $\alpha$ , IL-2R $\alpha$ , IL-3, IL-12 (p40), IL-16, IL-18, CTACK, GRO- $\alpha$ , HGF, IFN- $\alpha$  2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG,  $\beta$ -NGF, SCF, SCGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TRAIL, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF) を測定した。

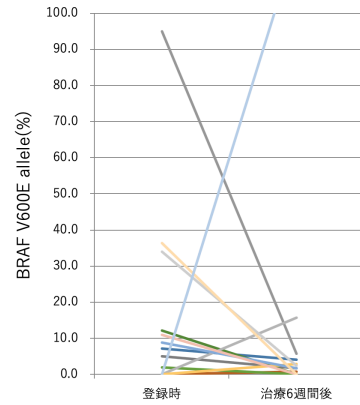
#### 4. 研究成果

##### <LCH 患者血漿 *BRAF* V600E コピー数は治療後に減少した>

LCH 患者血漿 *BRAF* V600E は 84 症例中 24 症例が陽性で、陽性率は 28.5%であった。

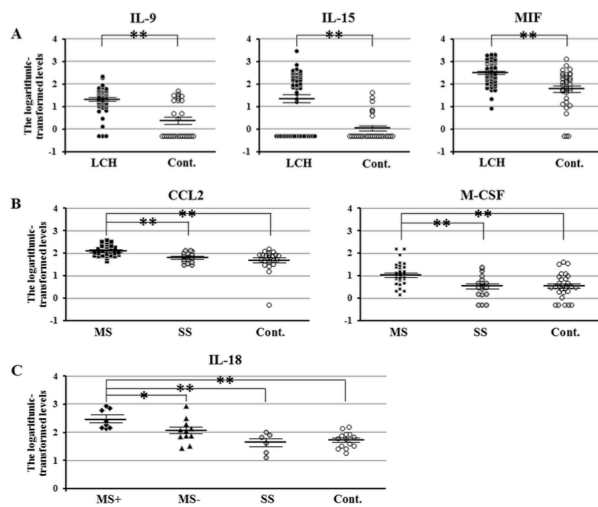
*BRAF* V600E 変異陽性の 24 症例中、13 症例が、寛解導入療法前後のペアで、血漿を得ることができた。13 例中、11 例が治療後に低下した。

*BRAF* V600E 変異陽性の患者では、血液検査だけで、治療効果判定をすることができるようになるかもしれない。



##### <LCH 患者では炎症性サイトカインが高値で病勢を反映していた>

LCH 患者では、正常コントロールと比較して、IL-1Ra, IL-3, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, TNF- $\alpha$ , G-CSF, M-CSF, MIF, HGF, VEGF, CCL2, CCL3, CCL7, CXCL1, CXCL9 が高値で、特に IL-9, IL-15, MIF が高かった。しかし多臓器型と単一臓器型では、差はなかった。多臓器型は単一臓器型と比較して、特に IL-2R, IL-3, IL-8, IL-18, M-CSF, HGF, CCL2, CXCL1, CXCL9 が高かった。IL-18 は、多臓器型リスク臓器浸潤ありが多臓器型リスク臓器浸潤なしより有意に高かった。LCH 患者では、多くの炎症性サイトカインが重要な役割を果たしており、特に病変の進展度と関係していた。炎症性サイトカインをターゲットにした治療が予後の改善に役立つかもしれない。



(A) LCH vs. Control. (B) Multisystem (MS) disease vs. single-system (SS) disease. (C) MS with risk organ involvement (MS+) vs. MS without risk organ involvement (MS-). The values (pg/ml) were decadic logarithm-transformed. The long bars indicate the mean value and the short bars indicate the standard error. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oh Y, Hayase T, Ito T, Kawahara Y, Morimoto A.	4. 巻 61(4)
2. 論文標題 Cladribine-related myelodysplastic syndrome in Langerhans cell histiocytosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 419-421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.13792	査読の有無 有
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 3.Morimoto A, Oh Y, Nakamura S, Shioda Y, Hayase T, Imamura T, Kudo K, Imashuku S; Japan Langerhans cell histiocytosis Study Group.	4. 巻 97
2. 論文標題 Inflammatory serum cytokines and chemokines increase associated with the disease extent in pediatric Langerhans cell histiocytosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cytokine.	6. 最初と最後の頁 73 79.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cyto.2017.05.026	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 翁 由紀子
2. 発表標題 11q部分トリソミーを伴ったパーキット様リンパ腫の一例
3. 学会等名 日本小児血液がん学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 森本哲、翁由紀子	4. 発行年 2016年
2. 出版社 小児内科	5. 総ページ数 5
3. 書名 小児疾患診療のための病態生理	

1. 著者名 森本哲、翁由紀子	4. 発行年 2016年
2. 出版社 日本臨床	5. 総ページ数 5
3. 書名 免疫症候群(第2版)-その他の免疫疾患を含めて-	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----