

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16873

研究課題名（和文）網羅的遺伝子解析に基づく本邦の小児神経膠腫のデータの構築と新規治療標的の探索

研究課題名（英文）Comprehensive molecular analysis of pediatric glioma

研究代表者

中野 嘉子（Nakano, Yoshiko）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00796005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：約300例の小児神経膠腫の解析を行った。パイロシーケンスやRT-PCRを用いた簡易かつ安価な方法により、53%で典型的な遺伝子異常が検出され、診断や治療法の選択に寄与し得ることが示唆された。神経膠腫に含まれる様々な病理型における遺伝子異常の頻度、各遺伝子異常から見た病理組織型の頻度は、海外からの小児神経膠腫の報告と同様の傾向を示していた。病理診断が難しい症例を中心にRNAシーケンスやメチル化解析を実施したところ、新たな病型と考えられる症例の同定や稀な症例からNTRK融合遺伝子が検出され、このような解析を臨床に活用することが小児脳腫瘍の臨床の向上、予後の改善につながることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

簡易な解析を行うことで小児神経膠腫の50%以上で診断に寄与し得る典型的な遺伝子異常が検出される。また、BRAF V600EやNTRK融合遺伝子は、神経膠腫に含まれる様々な病理組織型、さらには神経膠腫以外の病型とも鑑別の難しい症例からも検出された。さらに、次世代シーケンサーを用いることで、診断困難例の生物学的特徴も明らかにすることができた。これらは、分子遺伝学的解析の実施の意義、すなわち、小児脳腫瘍における診断の精度の向上による適切な治療の選択、また分子標的薬を用いた予後の改善につながることを示唆している。

研究成果の概要（英文）： To reveal the molecular profile of pediatric glioma in Japan, 300 cases of pediatric glioma were analyzed in two years.

Analyses included sequencing for hot spot mutations in H3, BRAF, IDH1, IDH2, TERT promoter, FGFR1, and RT-PCR for KIAA1549-BRAF for all cases and RNA sequencing and methylation analysis for selected cases, which were difficult to diagnose pathologically and showed atypical clinical course. Genetic abnormalities were detected in 53% of glioma cases through pyrosequencing or RT-PCR. The distribution of typical genetic abnormalities in each histological subtype was the same as that was reported previously from other international groups. Targetable BRAF V600E were detected in 45 cases and NTRK fusion was detected not only in infantile hemispheric glioma but also CNS ganglioneuroblastoma. This suggest the importance of molecular analysis for pediatric glioma regardless of the histological diagnosis to find candidate for molecular targeted therapy.

研究分野：小児脳腫瘍

キーワード：小児脳腫瘍 神経膠腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児脳腫瘍は、小児がんの死亡の最大の原因であり、腫瘍そのものや治療の影響により成長や発達の遅れ、麻痺や高次機能障害をきたすことも多いため、治療の進歩、予後の改善が望まれる。また、脳腫瘍の種類は多岐にわたるため病理診断が難しい場合も多い。2010年以降、アメリカ、カナダ、ドイツを中心に大規模に行われた小児脳腫瘍の研究の成果により、組織型や発生部位に特徴的な遺伝子異常やメチル化異常が明らかになり、診断や予後因子、治療標的としても注目され、WHO分類や臨床現場にも積極的に取り入れられるようになってきた。しかし、本邦においては小児脳腫瘍について解析した報告例は限られており、海外のように多くの症例数を集めて検討されたことはない。小児脳腫瘍の診断の精度や分子標的薬の使用を含めた臨床の向上のためには、まずは本邦での現状を明らかにするために多施設共同で研究を行いデータを構築すること、そして探索的解析を通じて、病態解明や治療標的となる異常を同定することが不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、小児脳腫瘍の中でも頻度が高い神経膠腫を中心に多施設共同研究として検体を集めて遺伝学的解析を行い、本邦の小児神経膠腫における生物学的特徴と臨床像を明らかにし、治療標的や予後予測因子の同定することを目的としている。

3. 研究の方法

神経膠腫の検体からDNA、RNAを抽出し、パイロシークエンスによりBRAF、H3、FGFR1、TERT promoter、IDH1/IDH2のホットスポット変異の検出、RT-PCRによりBRAF融合遺伝子の検出を行った。診断が困難な症例や臨床経過が非典型的と考えられる症例についてはメチル化解析やRNAシークエンスを行った。

4. 研究成果

2年間で約300例の神経膠腫の解析を行った。本研究開始前に先行して実施した症例も含めてパイロシークエンスとRT-PCRを用いた解析により53%(N=212/390)の症例において何らかの遺伝子異常が認められ、診断に有用であった。BRAF融合遺伝子は毛様細胞星細胞腫(pilocytic astrocytoma, PA)と病理診断された症例の52%にみとめられ、BRAF融合遺伝子陽性例の83%はPAであり診断に有用であった。また、BRAF阻害剤、MEK阻害剤の治療標的となるBRAF V600E変異は45例において検出され、びまん性星細胞腫(diffuse astrocytoma, DA)が38%と最も頻度が高いものの、高悪性度、低悪性度いずれにも検出され、年齢も0歳からAYA世代の症例でも検出された。また治療標的となるNTRK融合遺伝子は乳児期の脳発症の高悪性度神経膠腫に頻度が高いことが知られているが、Central nervous system (CNS) ganglioneuroblastomaのような稀な病型にも検出された。したがって、これらの分子標的薬の恩恵を受けられる症例の検出には幅広く解析を行うことが重要であることが示唆された。また成人で多いIDH1変異陽性例は2%にとどまり、中央値が22歳(10-38歳)であった。小児神経膠腫における特徴的な遺伝子異常の頻度および、遺伝子異常側から見た病理組織型の頻度は、海外の既報と同様であった。

一方で、非典型的な症例や新たな病型の存在を示唆する症例も認められた。例えば、H3F3A K27Mは、mid line(脳幹部や視床)に発症する高悪性度神経膠腫に特徴的であるが、病理診断、臨床経過としても低悪性度の症例や、ときに脳炎脳症とも鑑別が困難な大脳神経膠腫症(gliomatosis cereberi)の症例においても検出され、このような症例における診断にも有用であることが示唆された(Pediatr Blood Cancer. 67(9):e28270, 2020)。

さらに、原則として凍結検体を用いて解析を行ったが、脳腫瘍では、発症部位によっては安全に生検で採取できる検体が限られている場合、緊急手術で凍結検体が確保できない場合、腫瘍含有量が少ない場合もあるためFFPEから抽出した核酸を用いた解析やddPCRを用いて、パセシークエンスでは検出されなかった頻度の少ない異常を検出し、診断に寄与すると考えられた。

診断が困難な症例については、ドイツがんセンターで公開されているmethylation classifierを利用し、メチル化分類も行った。SMARCA4の変異が検出された症例では、遺伝子解析のみではその変異の意義づけが困難であったが、メチル化解析でSMARCB1異常を特徴とする胎児性腫瘍に分類されたことから、この異常が病態に関与していることを支持すると考えられた(Pediatr Blood Cancer. 68(9):e29192, 2021)。「メチル化解析で”high-grade neuroepithelial tumor with MN1 alteration (HGNET-MN1)” “に分類された複数の症例(病理診断は様々)において、MN1融合遺伝子が検出されずBEND2融合遺伝子が共通して検出され、BEND2の高発現がみられたことから、BEND2が腫瘍の病態に重要な関わりをもつことが示唆された(Neuropathol Appl Neurobiol. 46(2):190-193, 2020)。現在、さらにin vitroでの機能解析を計画中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4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 Yamasaki K., Nakano Y., Nobusawa S., Okuhiro Y., Fukushima H., Inoue T., Murakami C., Hirato J., Kunihiro N., Matsusaka Y., Honda Kitahara M., Ozawa T., Shiraiishi K., Kohno T., Ichimura K., Hara J.	4. 巻 46
2. 論文標題 Spinal cord astroblastoma with an EWSR1 BEND2 fusion classified as a high grade neuroepithelial tumour with MN1 alteration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology and Applied Neurobiology	6. 最初と最後の頁 190 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nan.12593	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 Ito Jumpei, Nakano Yoshiko, Shima Haruko, Miwa Tomoru, Kogure Yasunori, Isshiki Kyohei, Yamazaki Fumito, Oishi Yumiko, Morimoto Yukina, Kataoka Keisuke, Okita Hajime, Hirato Junko, Ichimura Koichi, Shimada Hiroyuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Central nervous system ganglioneuroblastoma harboring MY05A-NTRK3 fusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 105 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-020-00371-1	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 Nakano Yoshiko, Yamasaki Kai, Satomi Kaishi, Fukushima Hiroko, Okuhiro Yuki, Okada Keiko, Osugi Yuko, Sakamoto Hiroaki, Inoue Takeshi, Yoshida Akihiko, Ichimura Koichi, Hara Junichi	4. 巻 67
2. 論文標題 A case of pediatric gliomatosis cerebri harboring H3F3A K27 mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 e28270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28270	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 中野 嘉子	4. 巻 57
2. 論文標題 小児脳腫瘍におけるALK、ROS1、NTRK融合遺伝子について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本小児血液・がん学会雑誌	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11412/jspho.57.85	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 Tsutsui Takeyoshi, Arakawa Yoshiki, Makino Yasuhide, Kataoka Hiroharu, Mineharu Yohei, Naito Kentaro, Minamiguchi Sachiko, Hirose Takanori, Nobusawa Sumihito, Nakano Yoshiko, Ichimura Koichi, Haga Hironori, Miyamoto Susumu	4. 巻 38
2. 論文標題 Spinal cord astroblastoma with EWSR1-BEND2 fusion classified as HGNET-MN1 by methylation classification: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 283 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-021-00412-3	査読の有無 無
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 Nakano Yoshiko, Satomi Kaishi, Okada Keiko, Gotoh Masahiro, Ushiyama Mineko, Sakamoto Hiromi, Yoshida Teruhiko, Kunihiro Noritsugu, Hira Kouta, Fukushima Hiroko, Inoue Takeshi, Hirato Junko, Ichimura Koichi, Hara Junichi	4. 巻 68
2. 論文標題 Malignant brain tumor in an infant showing histopathological features of yolk sac tumor but genetic and epigenetic features of AT/RT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 e29192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.29192	査読の有無 無
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 1件)

1. 発表者名 Yoshiko Nakano, Junko Hirato, Takako Yoshioka, et al.
2. 発表標題 Establishment of centralized integrated diagnostic system for pediatric brain tumors: A report from Japan Children's Cancer Group (JCCG)
3. 学会等名 The 6th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------