

令和 6 年 9 月 16 日現在

機関番号：82412

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06938

研究課題名(和文)非ランゲルハンス細胞組織球症の分子病理学的分類と治療標的分子の同定

研究課題名(英文)Molecular pathological classification and identification of molecular target in the non-Langerhans cell histiocytosis

研究代表者

中澤 温子(Nakazawa, Atsuko)

埼玉県立小児医療センター(臨床研究部)・臨床研究部・部長

研究者番号：90227736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：若年性黄色肉芽腫症(JXG)43例(全身型11例、皮膚以外の単臓器型7例、皮膚限局型25例)を対象として、免疫組織化学的にBRAFV600E変異蛋白、ALK、panTRKの発現を検討した。BRAFV600E変異蛋白、ALK、panTRKはそれぞれ0例、4例、2例が陽性であり、5例は多臓器病変であった。FISH解析では、解析したすべての症例でALKあるいはNTRK1の再構成が認められ、KIF5B-ALK融合遺伝子あるいはTPM3-NTRK1融合遺伝子が検出された。免疫染色は迅速なスクリーニング法として、特に多臓器に病変がある症例においては、分子標的薬の適応を考えるうえで有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若年性黄色肉芽腫症(JXG)は小児の多くは皮膚に発生する組織球症であるが、全身型として、皮膚だけでなく肝臓、骨髄、肺、中枢神経系などの多臓器に浸潤し、化学療法を必要とする重症例が認められる。ランゲルハンス細胞組織球症では、BRAFなどのMAPK経路の遺伝子変異があり、分子標的として注目されている。本研究の結果から、分子標的の同定法の最初の検査として、免疫染色の有用性が示された。がん遺伝子パネル検査などのNSG解析は時間と経費がかかるため、病理診断時に免疫染色をスクリーニングとして行うことは医療経済的にも優れた方法と考えられた。

研究成果の概要(英文)：BRAFV600E mutant, ALK, and panTRK expression were examined by immunohistochemistry in 43 cases of juvenile xanthogranuloma (11 systemic, 7 extra-cutaneous, 25 cutaneous). BRAFV600E mutant, ALK, and panTRK were positive in 0, 4, 2 cases, respectively. 5 cases out of 6 cases were systemic. FISH analyses revealed ALK or NTRK1 gene rearrangement in all of examined cases. Cancer multi-gene panel testing revealed KIF5B-ALK fusion in 3 of 3 ALK-positive and ALK rearranged cases, while TPM3-NTRK1 fusion was detected in 1 of 2 pan TRK-positive and NTRK1 rearranged cases. Immunohistochemistry was useful for identification of targetable tyrosine kinase gene mutation in children with systemic juvenile xanthogranuloma.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：組織球症 分子標的 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

組織球症は大きくランゲルハンス細胞組織球症 (LCH) とその他のまれな組織球症 (non-LCH) に分けられ、いずれも皮膚や骨に限局し良性の経過をたどるものから、全身に病変を形成し臓器不全を引き起こすものまで多彩である。WHO 分類改訂第 4 版 (2017) には non-LCH として、組織球肉腫、若年性黄色肉芽腫 (Juvenile xanthogranuloma; JXG)、エルドハイム・チェスター病 (Erdheim-Chester disease; ECD)、ロサイ・ドルフマン病 (Rosai-Dorfman disease; RDD) が含まれている。いずれも血球貪食症候群や肝脾腫、中枢神経系病変を呈することがあり、全身症状が強く、鑑別診断が困難な場合には悪性組織球症と総称され、予後不良であるが、その詳細な分子病理学的背景は不明である。

LCH は皮膚の樹状細胞であるランゲルハンス細胞の腫瘍性疾患で、CD1a, CD207 陽性の組織球が増殖する。核溝を有するコーヒー豆様の核が特徴的で、免疫染色にて確定診断される。Non-LCH では、CD1a, CD207 が陰性で、マクロファージの特徴である CD14, CD68, CD163, factor XIIIa が陽性となるが、典型的な組織像を示さない症例もあり、明確な病理組織学的診断基準は未だ不十分と考えられる。近年、LCH に認められる *BRAFV600E* 変異が ECD の半数以上にも認められることが判明し、病理組織学的分類と分子病態との関連性は混とんとしている¹⁾。

JXG は乳幼児に発症のピークを有するまれな組織球症の一病型であり、Dehner らの報告では診断時年齢の平均は 3.3 歳 (中央値 1 歳) で、45% は 1 歳未満であった。67% は皮膚に単発病変を認めるのみであったが、軟部組織浸潤が 16%、多発皮膚病変が 7%、皮膚に加えて臓器 (肝、肺、脾、腎、脳、消化管、膵) に浸潤を認める症例が 4% に認められた²⁾。*BRAFV600E* 変異は、LCH や ECD で認められる最も多い遺伝子変化であるが、JXG では *BRAFV600E* 変異は非常に少なく、*MAP2K1, NRAS/KRAS, CSF1R* の異常や、*NTRK1* 関連の融合遺伝子が認められることが明らかとなっている³⁾。ただし、これらの既報は皮膚単独例が大半であり、全身型については不明である。全身型 JXG では肝脾腫や血球減少のほか中枢神経症状を呈したり、肝不全に陥る症例も少なくなく、化学療法や肝移植の適応など治療方針の決定に科学的根拠がないために迷うことがある。特に乳幼児では臓器の未熟性により化学療法の副作用の予測が困難で、臓器毒性、敗血症などの重篤な副作用による治療関連死の危険性が高いため、治療選択に有用な新しい分子病理診断・分類が望まれている。

2008 年に Chan らは、血球減少および著明な肝脾腫を認める 3 例の組織球症を報告している。CD1a および CD207 陰性の non-LCH の表現型を示し、ALK 免疫染色が 3 例とも陽性であったことから、ALK 陽性組織球症という新たな疾患概念を提唱した。さらに 2019 年の報告では 10 例中 6 例で全身臓器に浸潤を認め、全身型 JXG の一部に ALK 陽性組織球症が含まれていると考えられた。網羅的遺伝子解析を行った 6 例のうち、5 例に *KIF5B-ALK*、1 例に *COL1A2-ALK* 融合遺伝子が同定されている^{4) 5)}。

BRAFV600E 変異、ALK 融合遺伝子の発見は、*BRAF*、*MET*、ALK 阻害剤といった分子標的治療薬の開発につながり、すでに悪性黒色腫、肺癌、大腸癌においては分子標的治療が行われている。ALK 阻害剤は未分化大細胞性リンパ腫や非小細胞肺癌のほか、希少な小児がんである神経芽腫や軟部腫瘍でもその有効性が示されている。また、non-LCH の一部は PD-L1 の発現があり、PD-L1 阻害薬も候補薬剤である。このように、がん腫は異なるものの実臨床での使用経験が豊富な分子標的薬をまれな non-LCH に対しても臨床応用できる可能性がある。

臓器浸潤を呈する全身型 JXG、ECD、ALK 陽性組織球症、および LCH は骨髄由来の組織球増殖性疾患であり、従来の病理組織学的分類を見直し、臨床像、分子病理学的検索結果と合わせて解析することにより、分子病態に基づいた新規分類が可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、非ランゲルハンス組織球症 (non-LCH) とくに全身型 non-LCH 症例について、臨床情報と合わせて分子病理学解析を行うことにより、生物学的悪性を客観的に判定するための統合的な分子病理学的診断アルゴリズムを構築し、最適な治療の選択 (層別化医療) と個別化医療の実践に貢献できる新分類を提案することであるが、まずは、小児で最も多い non-LCH である JXG について、臨床情報と合わせて分子病理学解析を行い、分子標的の同定にも資する診断アルゴリズムの構築を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 対象：全身型 JXG、ALK 陽性組織球症を中心とした non-LCH 18 例、対照群として、多臓器に浸潤する全身 (多臓器) 型 LCH 48 例、皮膚限局 JXG 25 例。
- (2) 臨床情報の収集
年齢、性別、病変部位、がん遺伝子パネル検査の結果、転帰情報を収集した。
- (3) 免疫組織化学的検索

CD1a、CD207、CD68、CD163、S-100 蛋白、BRAFV600E 変異蛋白、ALK、panTRK に対する免疫染色を施行した。病理組織像と免疫染色の結果を合わせて、病理診断の再検討を行った。

(4) 分子病理学的検索

ALK、panTRK に対する免疫染色が陽性の場合、break apart probe を用いた FISH にて *ALK*、*NTRK 1*、*NTRK 2*、*NTRK 3* 遺伝子の再構成について検討した。

病理組織標本(FFPE)あるいは凍結腫瘍検体より DNA を抽出し、Targetable gene mutation が報告されている遺伝子 (*BRAF*、*MAP2K1*、*ALK*)に関して、体細胞変異の好発部位に対しアンプリコンターゲット NGS シーケンス法で遺伝子変異解析を行った。

FFPE 由来 RNA を抽出し、cDNA 合成したのち、既知の融合遺伝子(ALK および *NTRK*) に関してマルチプレックス RT-PCR 法 (QuantiFast Multiplex RT-PCR Kits, Qiagen 社) により融合遺伝子の検出を行った。

4. 研究成果

Extracutaneous JXG 1例のみでがん遺伝子パネル検査(FoundationOne® CDx)で *BRAFV600E* 変異が検出されたが、免疫染色による *BRAFV600E* 変異蛋白の発現は解析できなかった。一方 systemic LCH では 9/24 例(37.5%) に *BRAFV600E* 変異蛋白が検出された。ALK 陽性 4 例はすべて systemic JXG で、解析可能であった 3 例は全例 FISH で *ALK* 再構成が認められ、がん遺伝子パネル検査(FoundationOne® CDx)にて KIF5B-*ALK* 融合遺伝子が検出された。panTRK 陽性例は systemic JXG と extracutaneous JXG が 1 例ずつで、いずれも FISH で *NTRK 1* 再構成が認められ、1 例はがん遺伝子パネル検査 (FoundationOne® CDx) にて *TPM3-NTRK1* 融合遺伝子が検出された。皮膚単独型についてさらに 23 症例を検討したところ、panTRK 陽性例は 3 例で、1 例に FISH にて *NTRK 1* 再構成が認められた。FISH にて *NTRK1*、*NTRK2*、*NTRK3* いずれも再構成が認められなかった 2 例は、細胞質のみに panTRK が陽性であった。

全身型(多臓器型) JXG の浸潤臓器は、肝 9 例、皮膚 6 例、肺 5 例、中枢神経系 3 例、腎 2 例で、肝臓が最も多く、2 例で肝移植が施行された。死亡例は 2 例でいずれも死因は全身型(多臓器型) JXG による肝不全であった。皮膚以外の単臓器型 JXG は眼(虹彩)、中枢神経系に発生し、生命予後は良好であったが、視力低下、てんかんなどの中枢神経系症状が問題となった。

JXG の多くは皮膚に発生するが、全身型として、皮膚だけでなく肝臓、骨髄、肺、中枢神経系などの多臓器に浸潤し、化学療法を必要とする重症例が認められる。LCH では、*BRAF* などの MAPK 経路の遺伝子変異があり、分子標的として注目されている。本研究の結果から、分子標的の同定法の最初の検査として、免疫染色の有用性が示された。がん遺伝子パネル検査などの NGS 解析は時間と経費がかかるため、病理診断時に免疫染色をスクリーニングとして行うことは医療経済的にも優れた方法と考えられた。

引用文献

- 1) Haroche J, Charlotte F, Arnaud L, et.al. High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2012;120:2700-3
- 2) Dehner LP. Juvenile xanthogranulomas in the first two decades of life: a clinicopathologic study of 174 cases with cutaneous and extracutaneous manifestations. *Am J Sur Pathol*. 2003;27:579-93
- 3) Durham BH. Molecular characterization of the histiocytoses: Neoplasia of dendritic cells and macrophages. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;86:62-76
- 4) Chan JKC, Lamant L, Algar E, et.al. ALK+ histiocytosis: a novel type of systemic histiocytic proliferative disorder of early infancy. *Blood*. 2008;112:2965-8
- 5) Chang KT, Tay AZ, Kuick CH, et.al. ALK-positive histiocytosis: an expanded clinicopathologic spectrum and frequent presence of KIF5B-*ALK* fusion. *Mod Pathol*. 2019;32:598-608.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Irie R, Shioda Y, Osumi T, Sakamoto KI, Kasahara M, Matsumoto K, Nakazawa A.	4. 巻 62
2. 論文標題 Pediatric liver failure with massive sinusoidal infiltration of histiocytes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Exp Hematop.	6. 最初と最後の頁 25-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3960/jslrt.21022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅野健、森本哲、中澤温子、塩田曜子、中沢洋三、八角高裕、土居岳彦、坂本謙一、古賀友紀.
2. 発表標題 稀な小児組織球症の全国調査
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenichi Sakamoto, Kudo Ko, Atsuko Nakazawa, Takako Yoshioka, Akira Morimoto, Yoko Shioda.
2. 発表標題 Immunohistochemistry-based screening for targetable molecules in patients with Juvenile xanthogranuloma.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 入江理恵、塩田曜子、坂本謙一、笠原群生、中澤 温子
2. 発表標題 肝臓類洞への高度の組織球浸潤から肝不全を呈した乳児・小児例の検討
3. 学会等名 第61回日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenichi Sakamoto, Kudo Ko, Atsuko Nakazawa, Takako Yoshioka, Akira Morimoto, Yoko Shioda.
2. 発表標題 Targetable Juvenile xanthogranuloma detected by immunohistochemistry-based screening system.
3. 学会等名 Histiocyte Society Annual meeting 2023
4. 発表年 2023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
研究分担者	工藤 耕 (Kudo Ko) (20455728)	弘前大学・医学部附属病院・助教 (11101)	
研究分担者	塩田 曜子 (Shioda Yoko) (30307532)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児がんセンター・医長 (82612)	

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
---------	---------