

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07813

研究課題名(和文)ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)における骨髄病変の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular Mechanisms of Bone Marrow Disease in Langerhans cell histiocytosis (LCH)

研究代表者

工藤 耕(Kudo, Ko)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20455728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ランゲルハンス細胞組織球症(LCH)においては、全身性の病変を有する多臓器型があり、なかでも骨髄、肝臓、脾臓などのリスク臓器に病変を有する症例は、リスク臓器陽性多臓器型と呼ばれ治療反応性が不要である。我々は小児LCHの腫瘍と骨髄をペアで遺伝子解析を行った。その結果、リスク臓器陽性例では全例、初診時骨髄病変としてのBRAFV600E遺伝子変異が陽性でしかも遺伝子変異比率が高値であった、さらに年齢や予後にも相関を認めた。以上から、初診時の骨髄病変陽性例の特徴は、臨床的に規定されてきたリスク臓器陽性例と多くの特徴が一致したことから、骨髄病変陽性例が真のリスク症例である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、これまで存在は知られていたが意義が不明であった、LCHにおける骨髄における遺伝子変異陽性細胞は、新規の予後因子である可能性が高い、という臨床的意義を明らかにした。この結果を、各種学会で発表し論文報告した。多臓器型と呼ばれる全身性のLCHにおいては、骨髄に加えて末梢血での遺伝子変異の定量的解析が、白血病における微小残存病変のような疾患活動性や予後を推定する重要な予後因子である可能性が示された。この成果をもとに、現在進行中の日本小児がん研究グループによるLCHの前向き臨床試験で本研究の結果が追試、検証されている。

研究成果の概要(英文)：Langerhans cell histiocytosis (LCH) has a systemic high-risk form of the disease. In addition, cases with involvement of risk organs such as bone marrow, liver, and spleen, termed risk organ-positive multisystem disease, have a poor response to therapy. We performed a retrospective genetic analysis of tumor-bone marrow pairs in pediatric LCH. We found that all patients with risk organ-positive LCH had BRAFV600E mutation-positive bone marrow disease at initial diagnosis, with a high mutation ratio, which correlated with age and prognosis.

Many of the characteristics of patients who were positive for bone marrow disease at initial presentation were consistent with those of clinically defined risk organ positive patients, suggesting that bone marrow disease positivity may be a new risk factor.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：組織球症 ランゲルハンス細胞組織球症 BRAF遺伝子 微小残存病変

## 1. 研究開始当初の背景

ランゲルハンス細胞組織球症 (LCH) は、MAPK 経路の遺伝子変異を有する単核食細胞系列の血液悪性腫瘍である。BRAFV600E 変異は、約 60% の症例で認められ、初期治療反応性不良および再発と相関があることが報告されている。また、造血器、肝臓および脾臓に腫瘍浸潤を認めるリスク臓器 (RO) 陽性例は、再発リスクが高いとされる。この造血器浸潤を規定する血球減少は、LCH の骨髓浸潤により生じるとされ、CD1a 陽性免疫組織化学染色で診断される。しかしながら、LCH における骨髓病変 (BMD) の分子レベルでの BRAF 変異の頻度、定量性および臨床的意義は十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の 3 つを目的とした。

- (1) 小児 LCH における診断時の BMD の臨床的意義を明らかにする。
- (2) BRAFV600E 陽性および陰性の LCH における BMD の頻度は差があるかを明らかにする。
- (3) 治療中の BMD が疾患活動性を反映するかを検証する。

## 3. 研究の方法

LCH における BMD の臨床的意義を明らかにするため、高感度な遺伝子変異解析方法を用いて、LCH における腫瘍病変および骨髓血のペア検体で体細胞変異を定量的に解析した。

- (1) 1996 年から 2021 年の期間、国内 13 施設で病理診断された LCH 腫瘍 65 検体と、ペアとなる骨髓血 41 検体を後方視的に解析した。PCR 反応増幅不良 6 検体を除いた LCH 腫瘍の計 59 検体において、LCH の体細胞変異好発部位である BRAF エクソン 12 と 15、MAP2K1 エクソン 2 と 3 の領域を次世代シーケンサー (NGS) によるターゲットシーケンス法により解析した。
- (2) 次に、ペアとなった骨髓血 41 検体について、腫瘍での遺伝子解析で同定された体細胞変異に特異的なプライマーを設計し、変異アレル特異的ドロップレットデジタル PCR (ddPCR) 法を用いた定量的解析を行った。測定可能な BMD は変異アレル頻度が 0.01% 以上と定義した。解析可能であった 38 例について BMD の臨床的意義について検討した。また、そのうち 11 例については、治療中も経時的に BMD の定量解析を行い臨床経過と比較した。

## 4. 研究成果

- (1) 腫瘍検体の遺伝子変異解析により、59 例中 54 例 (92%) で、さまざまなアレル頻度 (範囲: 2.3~35%, 中央値 10%) で体細胞変異が検出された。BRAF V600E 変異は全体の 33 例 (56%) で同定され、BRAF エクソン 12 インフレーム欠失は 10 例 (17%) で検出された。また、新規変異として BRAF V600delinsDL を同定し、活性化変異であることを確認した。
- (2) 解析可能であった 38 例について BMD の臨床的意義について検討した。治療開始前の BMD 陽性例は 38 例中 21 例 (55%) であった。BRAF V600E 陽性 LCH に限定すると、25 例中 21 例 (84%) で検出されたが、他の変異タイプでは BMD は検出されなかった。(図 1)

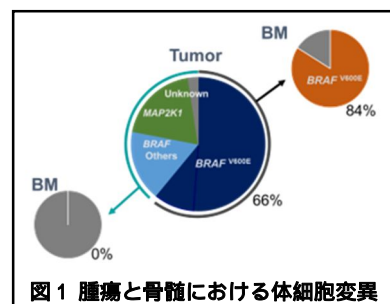


図 1 腫瘍と骨髓における体細胞変異

- (3) BMD の臨床的意義に関し、BMD と LCH における 4 つの臨床病型との関係を調べたところ、多臓器型リスク臓器陽性群、多臓器型リスク臓器陰性群、多発骨型、単一臓器型における BMD

陽性率はそれぞれ 100%、54%、25%、0%であった。多臓器型リスク臓器陽性群、多臓器型リスク臓器陰性群、多発骨型、における変異アレル頻度の中央値は、それぞれ 1.0% (範囲: 0.20-7.0%)、0.030% (範囲: 0-2.2%)、0% (範囲: 0-0.51%) で、BMD が LCH の臨床病型を規定する可能性が示唆された (Kruskal-Wallis 検定,  $P < 0.001$ )。また、BMD と年齢、増悪および再発についても検討した。BMD 陽性例は陰性例より年齢中央値が低かった (0.9 歳 対 5.4 歳, Mann-Whitney 検定,  $P = 0.012$ )。また、診断時の BMD 陽性 21 例の増悪および再発の累積発生率は、BMD 陰性 17 例に比較し高かった (79% 対 36%, ログランク検定,  $P = 0.006$ )。このことから、BMD 陽性は再発リスク因子であることが示唆された。(図 2)

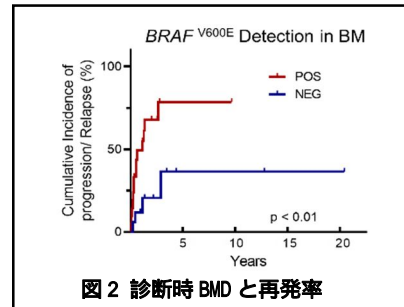


図 2 診断時 BMD と再発率

- (4) 変異陽性細胞の起源を特定するために、骨髓血と末梢血単核球の 13 症例のペア検体 31 検体で変異アレル頻度を測定し比較した。BRAF V600E の変異アレル頻度中央値は、骨髓血で 0.65% (範囲: 0.016-6.7%)、末梢血単核球で 0.16% (範囲: 0-4.0%) で、前者で変異量が高かった (ペア t 検定,  $P < 0.001$ ) (図 3) これらの結果から、BRAF V600E 陽性 LCH における腫瘍起源は、末梢血ではなく骨髓血であることが示唆された。さらに、治療中の複数の時点で検体が得られた 12 例において、BMD を測定した。難治性の経過を示す症例において、治療中も高い BRAFV600E 変異アレル頻度を示したことから、化学療法後も持続し陽性を示す BMD は、BRAF V600E 陽性 LCH において、微小残存病変として治療標的となる可能性があることが示唆された。(図 4)

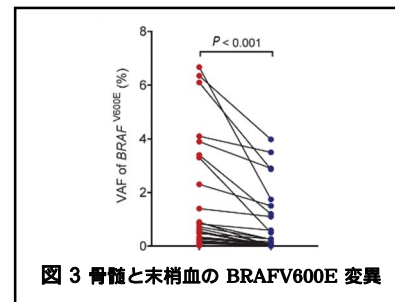


図 3 骨髓と末梢血の BRAFV600E 変異

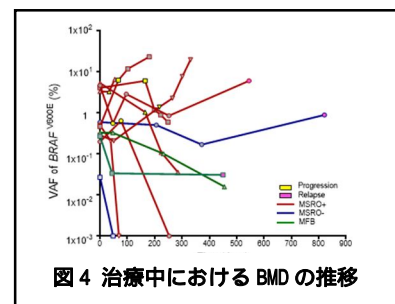


図 4 治療中における BMD の推移

- (5) 最後に、BRAFV600E 陽性 25 例において、現在の骨髓浸潤の診断基準である血球減少および CD1a 陽性の陽性率を BMD の陽性率と比較した。BMD の陽性率 84% に対し、血球減少は 32%、CD1a 免疫染色陽性は 11% で認められ、BMD が最も鋭敏に骨髓病変を検出可能であることが示唆された。(図 5)

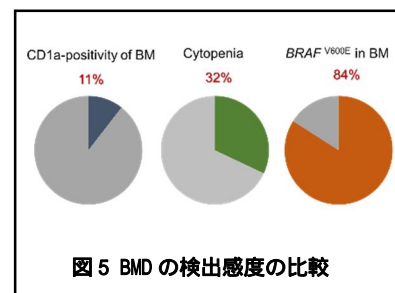


図 5 BMD の検出感度の比較

- (6) 結論として、BRAF V600E 陽性の小児 LCH では、BMD が高頻度に認められた。また、骨髓血における遺伝子変異陽性細胞を反映する BMD は、これまで高リスク群とされる、リスク臓器陽性多臓器型 LCH および低年齢群と、相関を認めた。さらに BMD は、治療中の増悪および再発と有意に相関を示し、臨床的に重要な予後因子であることが示された。また、血球減少や CD1a 陽性に代替え可能な新規のリスク因子であることが示唆された。今後、前向き大規模臨床試験での検証が期待される。

(引用文献)

1. Kudo K, Toki T, Kanazaki R, et al. BRAF V600E-positive cells as molecular markers of bone marrow disease in pediatric Langerhans cell histiocytosis. *Haematologica*. 2022;107(7):1719-1725.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 3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 Kudo K, Toki T, Kanazaki R, Tanaka T, et al.	4. 巻 107
2. 論文標題 BRAFV600E-positive cells as molecular markers of bone marrow disease in pediatric Langerhans cell histiocytosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1719 ~ 1725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2021.279857	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 Shimizu Soichiro, Sakamoto Kenichi, Kudo Ko, Morimoto Akira, Shioda Yoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of BRAF V600E mutation in radiological Langerhans cell histiocytosis-associated neurodegenerative disease using droplet digital PCR analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-023-03588-w	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 Takahashi Yuka, Kudo Ko, Ogawa Kaoru, Sato Tomohiko, Kamio Takuya, Sasaki Shinya, Kobayashi Akie, Ito Tatsuya, Yamamoto Tatsuya, Asano Kenichiro, Ohkuma Hiroki, Kurose Akira, Ito Etsuro, Terui Kiminori	4. 巻 44
2. 論文標題 Isolated Bone Recurrence of Medulloblastoma With MYCN Amplification and TP53 Loss: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 e593 ~ e596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPH.0000000000002234	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 Kudo Ko, Kubota Yasuo, Toki Tsutomu, Kanazaki Rika, Kobayashi Akie, Sato Tomohiko, Kamio Takuya, Sasaki Shinya, Shiba Norio, Tomizawa Daisuke, Adachi Souichi, Yoshida Kenichi, Ogawa Seishi, Seki Masafumi, Takita Junko, Terui Kiminori	4. 巻 epub ahead
2. 論文標題 Childhood acute myeloid leukemia with 5q deletion and <i>HNRNP1-MLLT10</i> fusion: The first case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2021006383	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 Karasawa Takao, Kudo Ko, Tanita Kay, Takahashi Yoshihiro, Kanegane Hirokazu, Terui Kiminori	4. 巻 41
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus-Negative Granulomatous Disease Due to SAP Deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1372 ~ 1375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-021-01032-4	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 Kudo Ko, Sato Tomohiko, Takahashi Yuka, Yuzawa Kentaro, Kobayashi Akie, Kamio Takuya, Sasaki Shinya, Shimada Jun, Otani Katsuki, Tusjimoto Shinichi, Kato Motohiro, Toki Tsutomu, Terui Kiminori, Ito Etsuro	4. 巻 43
2. 論文標題 Association of Multiple Gene Polymorphisms Including Homozygous NUDT15 R139C With Thiopurine Intolerance During the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 e1173 ~ e1176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/mp.0000000000002085	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 Taniguchi Maki, Sakamoto Kenichi, Shioda Yoko, Doi Takehiko, Kudo Ko, Fujino Hisanori, Kudo Kazuko, Morimoto Akira	4. 巻 113
2. 論文標題 Salvage therapy with 2-chlorodeoxyadenosine for refractory and relapsed pediatric Langerhans cell histiocytosis: an updated nationwide survey in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 461 ~ 463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03073-8	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 工藤 耕
2. 発表標題 小児ランゲルハンス細胞組織球症における骨髄血 BRAFV600E 陽性細胞の臨床的意義
3. 学会等名 日本小児血液がん学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤 耕
2. 発表標題 小児のランゲルハンス細胞組織球症
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会 教育講演（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 工藤 耕
2. 発表標題 小児のランゲルハンス細胞組織球症における骨髓血中BRAF V600E陽性細胞の意義について
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 工藤 耕
2. 発表標題 BRAFV600E-positive cells as molecular markers of bone marrow disease in pediatric Langerhans cell histiocytosis
3. 学会等名 第37回国際組織球症学会（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 工藤 耕
2. 発表標題 小児ランゲルハンス組織球症の骨髓病変におけるBRAFV600E変異
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	土岐 力  (Toki Tsutomu)  (50195731)	弘前大学・医学研究科・講師    (11101)	

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