

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：82412

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15953

研究課題名（和文）減量放射線治療を受けた髄芽腫症例における予後バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Subtyping of Group 3/4 medulloblastoma as a potential prognostic biomarker among patients treated with reduced dose of craniospinal irradiation

研究代表者

福岡 講平（Fukuoka, KoheiKohei）

埼玉県立小児医療センター（臨床研究部）・血液腫瘍科・医長

研究者番号：60746717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：髄芽腫においては全脳脊髄照射（CSI）量の低減が喫緊の課題であるが、有望な予後分子マーカーは抽出されていない。今回我々は、標準治療よりも少ない照射量のCSIにて治療を受けた髄芽腫症例に対して分子遺伝学的解析を行い、予後因子の抽出を試みた。解析対象は合計38例の髄芽腫症例で、CSI線量は全例24.0Gy以下であった。Group 3/4の中で予後不良とされるサブタイプII、III、VIに分類された症例は有意に予後不良であった。本結果から、Group 3/4髄芽腫におけるサブタイプ分類はCSIを低減した症例においても予後因子である可能性が示され、本分類を用いたより適切な層別化の実施が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、減量放射線治療を受けた髄芽腫症例に対する分子遺伝学的解析を行う事で予後分子マーカーを見出し、真に本治療でも治療しうる髄芽腫症例を抽出する事であった。世界的にも、本腫瘍においては、低リスク症例には減量放射線治療を採用していく流れであり、我が国の現在進行中の臨床試験も同様であるが、それらには未だ明確な根拠に乏しく、今回回の研究成果は、減量放射線治療の髄芽腫に対する適応を考える上で、極めて重要なデータとなり得る。実際に減量放射線治療を受けた髄芽腫症例の分子遺伝学的解析の研究は国内初の研究となった。

研究成果の概要（英文）：One of the most significant challenges in patients with medulloblastoma is reducing the dose of craniospinal irradiation (CSI) to minimize neurological sequelae in survivors. Molecular characterization of patients receiving lower than standard dose of CSI therapy is important to facilitate further reduction of treatment burden. We conducted molecular genetic analysis to investigate molecular prognostic markers in 38 patients with medulloblastoma treated with reduced-dose CSI. There were 38 medulloblastoma patients who received CSI dosed under 24.0Gy. Patients with poor prognostic subtype showed worse prognosis than that of others (5-year progression survival rate 90.4% vs. 22.2%; $p < 0.0001$).

Although these findings require validation in a larger cohort, the present findings suggest that novel subtyping of Group 3/4 medulloblastoma may be a promising prognostic biomarker even among patients treated with lower-dose CSI than standard treatment.

研究分野：小児科学

キーワード：髄芽腫 メチル化解析 分子分類

1. 研究開始当初の背景

髄芽腫は、小児期に最も高頻度に発症する悪性脳腫瘍の一つである。治療は、手術、全脳脊髄への照射（以下 全脳脊髄照射）を含めた放射線治療、化学療法を行うが、これら集学的な治療の開発に伴い予後の大幅な改善が得られ、現在では、手術の摘出度が高く播種（転移）の無い標準リスクと呼ばれる症例であれば、5年無病生存率は80%程度とされている。一方、治療の最も重要な要素の一つである全脳脊髄照射は、認知機能への悪影響が強い事が知られ、治療後に非常に重大な問題となっている。その有害事象を低減するために、全脳脊髄照射量を減量する試み（以下 減量放射線治療）が北米と日本でなされた。世界最大の北米の小児がん研究団体の一つである Children's Oncology Group (COG)は、3歳から7歳までの標準リスク髄芽腫症例226例を減量放射線治療群と標準治療群の2群に無作為割り付けを行い、予後を比較したところ、前者で5年無病生存率72.1%と、後者の82.6%と比べて有意に悪かった（Michalski, et al. J Clin Oncol. 2021, 図1）。そのため、放射線線量減量の戦略は失敗に終わったといえるが、この結果からは70%前後の症例は減量放射線治療でも根治が望めると考えられ、それら減量放射線治療下での予後良好症例の臨床的、分子遺伝学的特徴の解析による予後バイオマーカーの抽出が、治療低減の成功に向けて、重要な課題となっている。

昨今、遺伝子解析の進歩により、単一の疾患だと認識されていた髄芽腫は、分子遺伝学的・臨床的特徴異なる WNT、SHH、Group3、Group4 と呼ばれる4つの分子分類（以下 4型分類）に分類される事が示された。その後、4型分類のデータに複数の遺伝子異常、コピーナンバー異常の情報を組み合わせた新たなリスク分類が提唱されている。この新規リスク分類は極めて有用であるが、標準治療での治療歴のある症例を後方視的に解析した結果得られたデータであり、減量放射線治療を受けた群に適用できるかは不明である。そのため、申請者は、自施設、共同研究施設で減量放射線治療を受けた髄芽腫症例に対し、ゲノムワイドな DNA メチル化解析、遺伝子変異解析による分子診断、分類を行い、減量放射線治療歴のある髄芽腫症例での予後に影響を与えうるバイオマーカーの探索を行う事を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、減量放射線治療を受けた髄芽腫症例に対する分子遺伝学的解析を行う事で予後分子マーカーを見出し、真に本治療でも治癒しうる髄芽腫症例を抽出する事であった。世界的にも、本腫瘍においては、低リスク症例には減量放射線治療を採用していく流れであり、我が国の現在進行中の臨床試験も同様であるが、それらには未だ明確な根拠に乏しく、今回の研究成果は、減量放射線治療の髄芽腫に対する適応を考える上で、極めて重要なデータとなり得る。実際に減量放射線治療を受けた髄芽腫症例の分子遺伝学的解析の研究は国内初の研究となる。

3. 研究の方法

1) Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel®にて腫瘍検体の変異解析を行った。その希少性から検体量が極めて限られており、FFPEのみしか検体が無い症例が多い事、かつ症例が古く死亡している症例もあり、全エクソン解析や全ゲノム解析を行うための正常コントロールを有していないケースも多い事から、今回は、FFPE 検体でも対応可能で、データ解析に正常検体が不要な、遺伝子パネルによる変異解析を行う。これらの腫瘍検体から DNA を抽出し、FFPE 検体での変異解析に定評のある、Thermo Fisher Scientific 社の Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel®を用いて、遺伝子変異解析を行った。

2) 得られた分子遺伝学的データと臨床データを統合的に解析し、本コホートの予後分子マーカーの抽出を行った。

DNA メチル化プロファイルは、腫瘍の cell of origin を反映しているとされ、近年診断学的な観点から注目されていて、メチル化プロファイルを解析することで、病理学的には同一の思われていた腫瘍が、分子遺伝学的には異なる腫瘍であることが明らかになったりするなど、小児脳腫瘍の研究に極めて大きなインパクトを与えている。さらに、Capper らは収集した膨大な reference data を元に、DNA methylation-classifier と呼ばれるメチル化プロファイルに基づいた分子診断を開発し、海外においては、正確な臨床診断を得るために実臨床にも用いられ始めている (Capper et al. Nature 2018)。また、上記髄芽腫の4型分類の探索も、メチル化解析が最も信頼のおける手法の一つとして知られている。これらのことから、DNA メチル化解析は、髄芽腫においては4型分類診断のみならず、髄芽腫の診断そのものの補完にもなり得るため、極めて有用である。ドイツがんセンターを中心に開発された上記の methylation classifier

を本研究で得られたデータを用いても実施し、病理診断結果と照らし合わせ、分子遺伝学にも髄芽腫の診断が妥当かどうかも含めて、検討を行った。また、reference data と unsupervised hierarchical clustering や T-distributed Stochastic Neighbor Embedding plotting (TSNE plotting) により解析を行い、臨床的、分子遺伝学に独立したサブグループの存在を探索した。

4. 研究成果

Japan Pediatric Molecular Neuro-Oncology Group にて収集した髄芽腫症例のうち、標準治療より少ない線量での CSI により治療した合計 38 例を解析対象とした。腫瘍検体に対し、変異解析、DNA メチル化解析を行い分子分類、コピーナンバー解析を行った。既報に従い、Whole chromosomal aberration (WCA) は、chromosome (chr) 7 gain, chr 8 loss, chr 11 gain のうち 2 つ以上を有している場合陽性と定義し、Group 3/4 の予後不良サブタイプについては subtype II, III, V を含めた。

合計 38 例のうち、臨床的標準リスク (SR: 残存腫瘍, 1.5cm² 以下かつ播種無し) 症例は 23 例、高リスク (HR: 播種あり) 症例は 15 例であり、発症時年齢中央値は SR 6.9 歳 (3.0 - 22.1)、HR 6.8 歳 (2.8 - 15.1)、観察期間中央値は SR 74.0 か月 (14.0 - 231.0)、HR 49.8 か月 (11.7 - 177.6) であった。CSI 線量中央値は SR 18.0Gy (15.0 - 18.0)、HR 24.0Gy (18.0 - 24.0) で標準的照射量より両者で少なく、HR でも 5 例が 18.0Gy の照射であった。

分子分類は WNT 5 例、SHH 2 例、Group3 13 例で 14 例は Group4 であった。HR の症例は全例 Group 3/4 であった。DNA methylation classifier (classifier) の分類結果と tSNE 解析での分類結果の比較を行うと、結果の乖離が見られたのは 2 例 (5%) のみであった。Classifier の確度示す calibrated score が 0.9 以下を示した症例は 7 例 (18%) 認められたが、上記 2 例を除いて全例 tSNE 解析と分類結果に相違は見られなかった。コピーナンバー解析では WNT 例は全例で chr 6 loss を認め、SHH 例のうち 2 例で MYCN 増幅を認めた。WCA は Group3/4 症例のうち、SR 5 例、HR 3 例に認め、MYC/MYCN 増幅は SR 1 例、HR 5 例に認めた。Group3/4 症例のうち、予後サブタイプに分類された症例は SR 2 例、HR 7 例であり、SR では 2 例とも再発を来している。

予後解析では、5 年無病生存率 (5yPFS) は SR 81.7%、HR 60.0% であった。再発時には全例遠隔転移を認めていた。分子分類別では WNT は全例無再発生存であり、SHH では MYCN 増幅を認めた 1 例が原病死で、Group 3 が 5yPFS 55.5% と最も予後不良で、Group 4 は 76.3% と中等度の生存率だった。分子マーカー毎の解析では、WCA は有意な結果は得られなかったが、MYC/N 増幅の有無、予後不良サブタイプの有無は有意に予後に影響を与え、HR 症例に絞った解析でも同様の結果であった。HR 症例のうち予後不良サブタイプではない場合、再発例は 1 例のみであった。多変量解析では、予後不良サブタイプのみ有意な予後因子として抽出された (Hazard ratio (HR) 12.77, 95% confidence interval (CI) for HR 2.38-99.21, p-value 0.0026 for progression free survival (PFS), HR 5.02, 95% CI for HR 1.03-29.15, p-value 0.044 for overall survival (OS))。

これらの結果から、限られた症例数ではあるが、低線量の全脳脊髄照射を受けた髄芽腫症例においても、Group 3/4 における新規サブタイプ分類は予後と相関する事が示唆された。日本でかつて実施された日本小児脳腫瘍コンソーシアムによる過去の臨床試験では、CSI を減量しても特に高リスク症例の治療成績が諸外国と比して著しく良かったが、本解析の結果からは Group3/4 のサブタイプによっては妥当な結果とも言えた。tSNE 解析と乖離のある分子分類結果はわずかで再現性の高い結果が得られることも確認できたため、メチル化アレイを用いた分子分類により、予後バイオマーカーが過去に示されていない高リスク症例も含め髄芽腫に対して更なる適切な層別化を実施できる可能性があり、今後前方視的臨床試験などでの検証が期待される。なお、本結果は Acta Neuropathologica Communications 誌に論文報告を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Fukuoka K, Kurihara J, Shofuda T, Kagawa N, Yamasaki K, Ando R, Ishida J, Kanamori M, Kawamura A, Park YS, Kiyotani C, Akai T, Keino D, Miyairi Y, Sasaki A, Hirato J, Inoue T, Nakazawa A, Koh K, Nishikawa R, Date I, Nagane M, Ichimura K, Kanemura Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Subtyping of Group 3/4 medulloblastoma as a potential prognostic biomarker among patients treated with reduced dose of craniospinal irradiation: a Japanese Pediatric Molecular Neuro-Oncology Group study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	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） 10.1186/s40478-023-01652-4	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 -

〔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 福岡 講平、栗原 淳、正札 智子、佐々木 惇、西川 亮、伊達 勲、永根 基雄、康 勝好、市村幸一、金村米博
2. 発表標題 低線量全脳脊髄照射での治療歴のある髄芽腫における予後分子マーカーの探索
3. 学会等名 第64回日本小児血液がん学会
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
---------	---------