

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670743

研究課題名(和文)小児期の放射線、化学療法がもたらすゲノム異常と遺伝的影響に関する検討

研究課題名(英文) Genomic aberrations by chemoradiotherapy in children and its transfer to next generation

研究代表者

檜山 英三 (Hiyama, Eiso)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号：00218744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：1980年以降広島大学にて治療を行った小児がん患者で児を持ちえた26組について、サイトスキャンマイクロアレイを用いて、治療前後のゲノムについて比較解析した。その結果、全例にゲノム上に43～3,123(平均623)箇所に変異、または欠失、挿入の変化を認めた。治療法との関連では、放射線治療を受けた患者にこれらの変異が多い傾向を認め、化学療法ではアンソラサイクリン系薬剤が有意に関連していた。児の解析では、両親との比較から変異が伝播しているのは24組中3例で、3例とも女性の経験者の児であった。以上から、小児がん治療にて得たゲノムの変化の一部は次世代に移行する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To analyze the genomic transmission from the childhood cancer survivors to their future generation, pre- and post-therapeutic genomes in the 26 pairs of the patients and their children were examined using Cytoscan microarray which had more than 2,700,000 SNP (single nucleotide polymorphism) signals. All cases showed mutation, deletion, and insertion in 43-3,123 (mean 623) loci in their genome and the numbers of altered loci is more in the patients who received radiotherapy. These genomic aberrations were significantly correlated with the use of anthracyclin chemotherapy. In the analysis of their childhood genomes in the comparison with each parent genome, transferred aberrations were suspected in 3 of 24 pairs and all 3 cases were derived from female survivors. From these data, some of these aberration in the survivors were transmitted to the next generation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：ゲノム 癌 マイクロアレイ 小児 放射線

### 1. 研究開始当初の背景

小児がんは、肉腫系の腫瘍が大半を占め、化学療法や放射線療法感受性が高く、転移例も含めて 80%近くが治癒する時代となり、成人となった小児がん経験者（サバイバー）が次第に多くなっており、サバイバーからの次世代が生まれて来ている。そうした中で、サバイバーにおいて小児期に受けた治療による晩期合併症が次第にクローズアップされてきており、特に二次がんの発症、さらに次世代への影響が指摘されている。すでに、欧米ではこれらの研究に着手され、胎内死亡や低出生体重児の出生リスクが示されてきている。

平成 23 年 3 月の東日本大震災による福島原発の被曝は、被曝がどの程度ゲノムに影響しさらに遺伝的影響となるのかについての大きな問題提起となっている。

### 2. 研究の目的

そこで、当科に 1980 年から保存されている小児がん患者のうち治癒しその後に見を作った症例を中心に、治療前の血液検体と治療後血液検体とさらに次世代の児の血液由来の DNA を用いて網羅的ゲノム解析や次世代シーケンサーでの解析を行い、放射線や化学療法剤由来のゲノム異常とその遺伝的伝搬の可能性について検討することを目的とした。さらに、これらの成果を、現在の放射線被曝問題を解決する一助とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

1980 年以降広島大学にて治療を行った小児がん患者のうち、同意を得て血液検体（ゲノム）を保存し得た約 700 例のうち、小児がんが治癒し、その後フォローアップされ成人に至り次世代の児を持ちえた 26 組（神経芽腫 9 例、腎芽腫 5 例、肝芽腫 3 例、悪性リンパ腫 4 例、横紋筋肉腫 2 例、悪性胚細胞腫 1 例、その他 2 例）を用いて以下の検討を行った。全例が化学療法を、20 例が放射線療法を受けていた。他家骨髄移植例は今回の検討から除外した。

治療前後のゲノム解析：高密度 270 万コピー数のマーカーが搭載されたサイトスキャンマイクロアレイを用いて、小児がん経験者の治療前と治療後（現在）のゲノムについて比較解析した。

1980 年以降広島大学にて治療を行った小児がん患者のうち、同意を得てゲノム（血液検体）を保存し得た約 1000 例のうち、小児がんが治癒し、その後フォローアップ中に次世代の児を持ちえた 26 組を用いて以下の検討を行う。研究には、成人後に再度同意を得ており、可能であれば同意を得て夫婦の相手のゲノムについても対象とする。

26 例は、神経芽腫 9 例、腎芽腫 5 例、肝芽腫 3 例、悪性リンパ腫 4 例、横紋筋肉腫 2 例、

悪性胚細胞腫 3 例であり、化学療法は全例が放射線療法を 20 例が受けていた。

#### (1) 治療前後のゲノム解析

マイクロアレイ解析：高密度で 270 万コピー数のマーカーが搭載されたマイクロアレイ（Affymetrix® Cytogenetics Copy Number Assay アレイ）を用いて、小児がん経験者の治療前と治療後のゲノムについて解析し、ゲノム解析ソフト（コンソール、Partek 6.5）を用いて、ゲノム上に生じている差異を検討した。

ミニサテライト、マイクロサテライト解析：ゲノム上に存在する反復配列であり、ミニサテライト、マイクロサテライトマーカーを用いて、ゲノム上のこれらの配列への治療の影響を検討するため、治療前と治療後の差異を、48 カ所のサイトについて、蛍光ラベル PCR でフラグメント解析にて検討を行った。

全ゲノム解析：現有する次世代シーケンサー（Miseq® & Hiseq® Illumina）を用いて、二次がんを発症した 6 例を中心に治療前後のエクソンを中心にゲノムの変化を検索し、共通の異常部位を探索した。

#### (2) 次世代のゲノム解析：

経験者のその児、さらに可能であれば経験者の配偶者のゲノムを同様のマイクロアレイのプラットフォームにて解析し、三者で比較検討した。1. で認められた異常を中心に解析し、遺伝的異常について評価した。

ミニサテライト、マイクロサテライト解析では、(1) で変化が認められた反復配列の部位について、三者で比較検討を行った。

#### (3) ゲノムの変化の評価：

患者の治療年齢、治療内容とくに放射線療法（放射線治療の部位、線量、回数など）と化学療法（薬剤、投与量、投与回数）などとゲノム異常の頻度、部位などを検討し、これらへの治療への関与を検討した。

さらに、児への遺伝的継承について検討し、これらの治療とくに放射線療法や化学療法によるゲノム異常の遺伝への可能性を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 治療前後のゲノム解析

表 1 に対象として症例を一覧で示した。各症例の治療前に採取した血液検体と治療後である現在の血液検体から DNA を分離し、マイクロアレイにて SNP シグナルを比較検討した。その結果、差異認められた SNP 数またコピー数の変化は 19~3,983（平均 679）で、これらにうち、同一領域に SNP 変化が存在している症例が 21 症例存在し、欠失、増加となっている領域として 0.2 - 72MB 範囲であった。これらは、同一領域にあり欠失と考えられる結果は、これらの症例が受けたがん治療に由来した体細胞のゲノムに生じた変化と考え

られた。そこで、この 21 例とそれ以外の 5 例（症例 9、13、15、17、21）を比較検討すると、放射線療法を受けた症例が多い傾向にあった。

表 1：症例リスト

Case	Sex	Dis-ease	Treat-ment	origin	Age (Onset/Pre-set)
1	F	NBL	CX/Rd	Adrenal	2/37
2	F	NBL	CX/Rd	Adrenal	1/35
3	M	NBL	CX/Rd	Adrenal	5/38
4	F	NBL	CX/Rd	Retro-peritoneal	3/35
5	M	NBL	CX/Rd	Adrenal	1/29
6	F	NBL	CX/Rd	Adrenal	2/31
7	M	NBL	CX/Rd	Chest	4/33
8	F	NBL	CX/Rd	Pelvis	7/31
9	F	NBL	CX/Rd	Adrenal	0/27
10	M	WT	CX/Rd	Kidney	2/39
11	F	WT	CX/Rd	Kidney	3/33
12	F	WT	CX/Rd	Kidney	4/31
13	F	WT	CX	Kidney	2/28
14	M	WT	CX	Kidney	1/26
15	M	HBL	CX	Liver	4/37
16	F	HBL	CX	Liver	2/31
17	M	HBL	CX	Liver	1/30
18	M	ML	CX/Rd	Chest	7/35
19	F	ML	CX/Rd	Chest	8/34
20	F	ML	CX/Rd	Abdomen	6/31
21	M	ML	CX	Neck	10/33
22	M	RM	CX/Rd	Retro-peritoneal	2/37
23	F	RM	CX/Rd	Back	4/34
24	M	GCT	CX/Rd	Chest	8/36
25	F	GCT	CX/Rd	Abdomen	6/33
26	M	GCT	CX/Rd	Pelvis	10/38

F: female, M: male, NBL: neuroblastoma, WT: Wilms Tumor, HBL: hepatoblastoma, ML: malignant lymphoma, RM: Rhabdomyosarcoma, CGT: germ cell tumor, CX: chemotherapy, Rd: radiation therapy

この欠失部位については一定の傾向がなく、どの染色体上でも見出された。また、同一症例でも複数個所（最大 8 か所）に分かれて検出される症例もあった。

さらに、48 か所のマイクロサテライトの変異について検討した。748 のマイクロサテライトのインフォーマティブアレルにおいて、変異を 12 か所で認めた。これらは、2 例(症例 23、25)に集積していた。

これらの変化が、体内のすべての細胞に同様に生じているかどうかは不明であるが、こうした変異は少なくとも血液幹細胞に生じている変異と考えられる。これらが、胚細胞変異として継代されるかどうかは不明であった。

## (2)次世代のゲノム解析：

経験者のその児、さらに可能であれば経験者の配偶者のゲノムも同時にアレイで検索した。1 で認められた異常を中心に解析したが、1 では血液幹細胞の異常であり、必ずしもこれらが次世代に伝搬すると考えられない、そこで、両親の SNP 以外の変異や欠失・挿入を認める部位を中心に検討した。児のゲノムを同様のプラットフォームにて解析しえた症例は 22 組で、そのうち配偶者のゲノムも同時に解析可能であったのは 16 例であった。両親になく児に出現した変異や異常は、3-764 か所であり、平均 79 か所であった。これらの多くが、児に伝播しているものと考えられ。これらに共通した変異は同定できなかったが、4 例に頻度が高く集積していた(症例 2、8、11、23)。

また、マイクロサテライト解析では、(1)で変化が認められた反復配列の部位について検討を行ったが、児にも特有の変異したマイクロサテライトアレルは 2 例(症例 11 と 23)に認められた。

## (3)ゲノムの変化の評価：

上記で認められた小児がんサバイバーの変異は、血液幹細胞すなわち組織幹細胞に生じたものと考えられる。これらについて、SNP 変異が 500 以下の症例(12 例)とそれ以上の症例(14 例)の二群に分けて、患者の治療法の内容について検討した。治療年齢には特に特徴はなかったが、放射線照射の総量と回数に変異の多い症例が 4 例と 14 例であり、後者に有意に多かった ( $P < 0.05$ )。化学療法においては アンソラサイクリン系薬剤を投与している症例が、5 例と 15 例で変異の多い群に多かった ( $P < 0.05$ )。

マイクロサテライト変異を認めた 2 例は両者とも放射線量と回数が多く、アンソラサイクリン系薬剤の投与も受けていた。放射線照射部位なども検討したが、特に特徴を見出せなかった。

一方、次世代の児に変異が伝播していたことが示された 4 例(症例 2、8、11、23)については、4 例とも女児であり、放射線量と回数が多い放射線療法を受けていた。これらの症例は、胚細胞にも変異を生じて、これが児に伝播していると考えられた。特に、マイクロサテライト変異も同時に伝播している児もあり、こうした変異はゲノム上に多数蓄積してさらに次世代に伝播している可能性が示唆され、今後のフォローアップが重要と考えられた。

以上のデータから、今後、さらに配偶者の検討や、同一家系の複数の児の検討などから、児に自然に生じた変異とこうした治療関連での変異を分別し、また、変異の蓄積量と治療内容の詳細に関連を検討することが必要であると考えられた。

さらに、児への遺伝的継承についての詳細な検討は、これらの治療とくに放射線療法や

化学療法によるゲノム異常の遺伝への可能性を明らかにするとともに、今回の大震災などによる被曝によるゲノム異常とその伝播への可能性への有用な知見になるとかえられ、さらに検討すべき研究と考えられた。

今回の検討では、小児がんの経験者の血液系細胞のゲノムの変化について、化学療法ではアンソラサイクリン系薬剤と放射線療法が関連していた。また、同時に検討しえた児の検討から、小児がん治療にて生じた胚細胞のゲノムの変化の一部が次世代に移行している可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Czauderna P, Hiyama E, et al. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy, *Current Opinion in Pediatrics*, 26, 査読有, 2014, pp19-28, doi: 10.1097/MOP.0000000000000046
2. Honda S, Hiyama E, et al, RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients, *Pediatric Surgery International*, 29, 査読有, 2013, pp1147-1152, doi: 10.1007/s00383-013-3371-z
3. Lopez-Terrada D, Hiyama E, et al, Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium, *Modern Pathology*, 2013, 査読有, 2013, pp1-20, doi: 10.1038/modpathol.2013.8
4. Kojima M, Hiyama E, Ueda Y, Onitake Y, et al, Detection of MYCN amplification using blood plasma: noninvasive therapy evaluation and prediction of prognosis in neuroblastoma, *Pediatric Surgery International*, 29, 査読有, 2013, pp1139-1145, doi: 10.1007/s00383-013-3374-9
5. Hiyama E, Ueda Y, Onitake Y, et al, A cisplatin plus pirarubicin-based JPLT2 chemotherapy for hepatoblastoma: experience and future of the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT), *Pediatric Surgery International*, 29, 査読有, 2013, pp1071-1075, doi: 10.1007/s00383-013-3399-0
6. Hiyama E, Current therapeutic strategies for childhood hepatic malignant tumors, *International Journal of Clinical Oncology*, 18, 査読

有, 2013, pp943-945, doi: 10.1007/s10147-013-0607-9

7. Kanda A, Hiyama E, et al, Characterization of common marmoset (*Callithrix jacchus*) bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 51, 査読有, 2013, pp292-299, doi: 10.5603/FHC.2013.0040

[学会発表](計13件)

1. 林 陽子, 檀山 英三, 他, 不均一な細胞群を有する神経芽腫細胞株における癌幹細胞同定のためのマーカー検索, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3-6日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
2. 小倉 薫, 檀山 英三, 鬼武 美幸, 上田 祐華, 他, Wilms 腫瘍を合併した縦隔奇形腫の1例, 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日-12月1日, ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)
3. 本多 昌平, 檀山 英三, 他, 次世代シーケンサーを用いた肝芽腫のメチル化解析による予後予測マーカー確立の試み, 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日-12月1日, ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)
4. 檀山 英三, 小児がんの国際共同臨床試験の現状と将来, がん臨床研究推進事業研修会 小児がんにおける国際共同臨床研究の運用と進め方, 2013年11月24日, キャンパスイノベーションセンター東京(東京都港区)
5. Honda S, Hiyama E, et al, Epigenetic analyses to establish a molecular-genetic marker for treatment outcome in hepatoblastomas, 第72回日本癌学会学術集会, 2013年10月3日-5日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
6. Hayashi Y, Hiyama E, et al, Identification of Markers of Cancer Stem Cells in Neuroblastoma Cell Line SK-N-SH, 第72回日本癌学会学術集会, 2013年10月3日-5日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
7. Hiyama E, Ueda Y, Onitake Y, Ogura K, et al, FURTHER STUDY: IDENTIFICATION OF NEW CANDIDATE GENES IN PROGRESSION OF HEPATOBLASTOMA USING GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY, 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology, 25-29 Sep 2013, Hong Kong Convention and Exhibition Centre(中国 香港)

8. Meyers R, Hiyama E, et al, CHILDREN'S HEPATIC TUMOR INTERNATIONAL COLLABORATION (CHIC): NEW HEPATOBLASTOMA INTERNATIONAL RISK GROUPS (HB-IRG), 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology, 25-29 Sep 2013, Hong Kong Convention and Exhibition Centre(中国 香港)
9. 檜山 英三, 小児肝腫瘍(1. 概要 2. 症状 3. 診断 4. 治療 5. 再発後), 米国 LIVE STRONG 財団 東日本大震災復興支援のためのがん治療またはがんサポートプログラム, 2013年8月22日, ベルサール九段(東京都千代田区)
10. Hiyama E, Onitake Y, Ueda Y, et al, Survival, surgical respectability, and late effects in the hepatoblastoma patients treated by cisplatin plus pirarubicin(CITA) chemotherapy, ASCO Annual '13 Meeting, 31 May-4 Jun, McComick Place (アメリカ シカゴ)
11. 檜山 英三, 上田 祐華, 鬼武 美幸, 小倉 薫, 他, 血中 DNA を用いた神経芽腫の分子診断: 予後予測と治療効果判定, 第 50 回日本小児外科学会学術集会, 2013年5月30日-6月1日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
12. 本田 昌平, 檜山 英三, 他, 網羅的メチル化解析による肝芽腫の分化度からみた予後予測マーカーを確立する取組み, 第50回日本小児外科学会学術集会, 2013年5月30日-6月1日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
13. Hiyama E, Ueda Y, Onitake Y, Ogura K, et al, Wnt Signaling and telomerase activation in hepatoblastoma, AACR Annual Meeting 2013, 6-10Apr, Walter E. Washington Convention Center (アメリカ ワシントン)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

檜山 英三 (HIYAMA EISO)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号: 00218744

### (2)研究分担者

小倉 薫 (OGURA KAORU)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号: 10346653

鬼武 美幸 (ONITAKE YOSHIYUKI)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号: 10448269

上田 祐華 (UEDA YUKA)

広島大学・病院(医)・医科診療医

研究者番号: 70624641