

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670764

研究課題名(和文) 若年期の放射線、化学療法によるゲノム障害、二次がんリスクと遺伝的影響に関する検討

研究課題名(英文) Analysis of genomic aberrations, risk of secondary cancer development and, hereditary effects by irradiation and chemotherapy in children

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) 2,800,000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経験者のうち、次世代の児を持ちえた27組を対象にゲノム上の変化の検討を行った。ゲノム上の変化(異常)が15例に見出され、放射線の全身照射と大量化学療法が有意に関連していた。さらに、児への遺伝的継承について検討したが、3例に伝播した可能性が示唆されたが共通する特徴は見出せなかった。また、二次がんを生じた6例中5例はゲノム異常を認めたが、発癌と直接明らかに関連するものは見出せなかった。以上から、小児がんに罹患し放射線療法や化学療法を受けた経験者においては、治療によると考えられるゲノム異常が見出され、その一部が次世代に受け継がれていた。

研究成果の概要(英文)：Genomic aberration was analyzed in 27 childhood cancer survivors who underwent treatments in Hiroshima University Hospital after 1980 and could have their own children. Among them, 15 cases had genomic aberrations which were significantly correlated to whole body irradiation and high-dose chemotherapy in their history. The analysis of these aberrations in their children suggested the possibility that hereditary transmission occurred in 3 cases but the common characteristics were not identified in these 3 cases. And in 5 of 6 cases who had secondary malignancies had genomic aberrations. These results revealed that genomic aberration due to cancer treatments were identified in the childhood cancer survivors and some of them were transmitted in their children.

研究分野：医歯薬学

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、診断と治療法の進歩によってその治癒率が向上し今や治癒率が全体で70-80%が治癒する時代となった。故に、小児がんが治癒して若年期に至ったサバイバーは20歳代では1,000人に一人を越え、全体で500人に一人という時代を今や迎えようとしている。そうした中で、サバイバーが小児期や若年期に受けた治療による晩期合併症がクローズアップされ、特に、治療関連の二次がんの発症リスクの増加も指摘されている。欧米では既に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も示されている。しかし、放射線療法や化学療法後のゲノム異常について詳細に検討した報告はない。そこで、1980年ころから当科及び関連施設で治療した小児がん患者では、そのほとんどの症例で治療前の血液と腫瘍が保存されていることから、本研究では、これらの患者の中から治癒した症例で、その患者とさらに次世代が出生している場合はその児を同意の上対象とし、治療（放射線療法、化学療法など）による患者自身のゲノムへの影響と晩期合併症の関連を検証し、さらに次世代のゲノムも同時に検討することでゲノムへの影響とともにほとんどされていなかった化学療法や放射線療法の遺伝的影響の解明も可能と考え本研究を企画した。

2. 研究の目的

小児や若年期のがんは、成人がんと異なり肉腫系の腫瘍がほとんどで、これらは化学療法や放射線療法感受性が高く、転移例も含めて70%以上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）が次第に増え、サバイバーから次世代が生まれて来つつある。被曝のゲノムへの影響とさらに次世代への影響が問題となっている現在、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て若年となり、その後に見を作ったサバイバー症例を中心に、治療前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と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影響を中心に検索することを目的とした。これらの成果は、現在の放射線被曝問題を解決する一助となると考え本研究を遂行した。

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った96例で、とくにその中で次世代の児を持ちえた27組を中心に以下の検討を行う。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した。

27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3例、悪性胚細胞腫1例、その他2例であり、化学療法を全例が、放射線療法を20例が受けている。

また、二次がんを発症した6例についても同意を得て、詳細な検討を計画した。

1) 治療前後のゲノム解析

最高密度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 6.6）を用いて、ゲノム上に生じている差異を検討した。現有する次世代シーケンサーを用いて、二次がんを発症した6例を中心に治療前後の全ゲノムの変化を検索し、共通の異常部位の有無の検索を計画した。

2) 次世代のゲノム解析

経験者とその児、さらに可能であれば経験者の妻（または夫）のゲノムを同様のサイトスキャンのプラットフォームにて解析する。1. で認められた異常の部位を中心に解析し、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、1で変化が認められた反復配列の部位の変異について、次世代への遺伝学的継承についての検討を追加した。

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的伝播への可能性を検討した。

4. 研究成果

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、小児がんが治癒し成人に至った96例の中で次世代の児を持ちえた27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3例、悪性胚細胞腫1例、その他2例）を対象に以下の検討を行った。また、二次がんを発症した6例についても同意を得て、詳細な検討を試みた。

1) 治療前後のゲノム解析

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のゲノムについて解析し、ゲノム解析ソフトを用いて、ゲノム上に生じている差異を検討したところ、検討しえた23例中15例で1-13か所の異常が見出された。この部位は、通常のSNPとして報告されていない部分であり、正常ゲノムにないものを異常とした。また、現有する

次世代シーケンサーを用いて、二次がんを発症した6例に治療前後の全ゲノムの変化を検索したところ、19番の染色体に共通の異常部位が認められた。

2) 次世代のゲノム解析

サバイバーとその児を解析する目的で、23例をサバイバーとその配偶者と児を一組として検討したところ、3例が児に異常が伝播していた。

また、ミニサテライト、マイクロサテライト解析で、反復配列の部位の変異について、次世代への遺伝学的継承については特に異常アレルへの変化はなかった。

3) ゲノムの変化の評価

ゲノム上の変化(異常)が見出された15例でその患者の治療年齢、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、部位などを検討したところ、放射線の全身照射と大量化学療法が有意に関連していた。さらに、児への遺伝的継承について検討したが、伝播した異常形式やその部位などについて、この3例に限ると共通する特徴は見出せなかった。また、二次がんを生じた6例中5例はゲノム異常を認めたと、発癌と直接明らかに関連するものは見出せなかった。

以上から、小児がん罹患し放射線療法や化学療法を受けた患児が治癒して生存したサバイバーにおいては、治療によると考えられるゲノム異常が見出された。その中の一部の異常が、サバイバーの次世代に受け継がれている可能性が示唆された。

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8件)

1. Czauderna P, Haberle B, Hiyama E, The Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma, *Lancet*, 2015, in press.
2. 檜山英三, 上田祐華, 栗原 将, 肝芽腫の分子生物学, *外科*, 47, 査読有, 2015, pp181-188.
3. Hiyama E, Pediatric Hepatoblastoma: diagnosis and treatment, *Translational Pediatrics*, 3, 査読有, 2014, pp293-299, 10.3978/j.issn.2224-4336.2014.09.01.

4. Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E, Yamamoto T, FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions, *Genes to Cells*, 19, 査読有, 2014, pp419-431, 10.1111/gtc.12142.

5. Kurihara S, Hiyama E, Onitake Y, Yamaoka E, Hiyama K, Clinical features of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma, *Journal of Pediatric Surgery*, 49, 査読有, 2014, pp1835-1838, 10.1016/j.jpedsurg.2014.09.029.

6. 檜山英三, 神経芽細胞腫マスキリーニングの最近の動向 パネルディスカッション「神経芽腫マスキリーニングを考える」, *日本マス・スクリーニング学会誌*, 24 査読有, 2014, pp221-226.

7. Lopez-Terrada D, Alaggio R, de Davila MT, Czauderna P, Hiyama E, Katzenstein H, Leuschner I, Malogolowkin M, Meyers R, Ranganathan S, Tanaka Y, Tomlinson G, Fabre M, Zimmermann A, Finegold MJ; Children's Oncology Group Liver Tumor Committee, Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium, *Modern Pathology*, 27, 査読有, 2014, pp472-491, 10.1038/modpathol.2013.80.

8. Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, Haberle B, Malogolowkin MH, Meyers RL, Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy, *Current Opinion in Pediatrics*, 26, 査読有, 2014, pp19-28, 10.1097/MOP.000000000000046.

[学会発表](計15件)

1. 栗原 将, 鬼武美幸, 三木瑞香, 中村和洋, 小林正夫, 檜山英三, 転移を有した肝芽腫6例の外科的検討, 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014年11月28日, 岡山市.
2. Hiyama E, Molecular diagnosis of lung cancer, *APSR2014*, 13 Nov 2014, Bali, Indonesia.
3. Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Yano M, Oue T, Iehara T, Hoshino K, Koh K, Tanaka Y, Kurihara S, Outcome and morbidity of primary resection of hepatoblastoma in JPLT-1 and 2

protocols, SIOP2014, 22 Oct 2014, Tronto, Canada.

4. 檜山英三, 檜山桂子, 林 陽子, 森原なぎさ, 平野尚子, 福場郁子, 山岡絵美, 栗原 将, 小児固形腫瘍における循環遊離 DNA と循環がん細胞のがん診断への応用, 第 73 回日本癌学会学術集会, 2014 年 9 月 27 日, 横浜市.

5. 本多昌平, 湊 雅嗣, 鈴木 拓, 春田雅之, 金子安比古, 檜山英三, 武富紹信, DNA メチル化解析による肝芽腫の新規予後予測マーカーの確立, 第 73 回日本癌学会学術集会, 2014 年 9 月 25 日, 横浜市.

6. 檜山英三, NB マス開始前後の変化レトロスペクティブ解析結果, 第 41 回日本マススクリーニング学会, 2014 年 8 月 22 日, 広島市.

7. 檜山英三, 栗原 将, 鬼武美幸, 但馬 剛, 西村 裕, 佐倉伸夫, 門脈大循環シャントによるガラクトース血症の治療, 第 41 回日本マススクリーニング学会, 2014 年 8 月 22 日, 広島市.

8. 米田光宏, 田尻達郎, 伊勢一哉, 大植孝治, 小野 滋, 佐藤智行, 杉藤公信, 菱木知郎, 平井みさ子, 文野誠久, 本多昌平, 風間道郎, 杉山正彦, 中田光政, 仲谷健吾, 脇坂宗親, 近藤知史, 上原秀一郎, 鬼武美幸, 木下義晶, 米倉竹夫, 檜山英三, 家原知子, 神経芽腫マス・スクリーニング休止後の臨床像の変化 - 小児の外科的悪性腫瘍登録データの解析より -, 第 41 回日本マススクリーニング学会, 2014 年 8 月 22 日, 広島市.

9. Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Ueda Y, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kobayashi M, Surgical managements for refractory neuroblastoma in young children, BAPS61st Annual Congress, 22 Jul 2014, Edinburgh, Scotland.

10. Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Yamaoka E, Fukuba I, Hiyama K, Clinical feature of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma, PAPS2014, 25 May 2014, Calgary, Canada.

11. Kurihara S, Hiyama E, Onitake Y, Miki M, Nakamura K, Kawaguchi H, Kobayashi M, Central venous catheter-related complications in children with malignancy, PAPS2014, 25 May 2014, Calgary, Canada.

12. Hiyama E, Telomere Biology in Neuroblastoma: Focusing on ATRX/DAXX Genes and Alternative-Strengthening of Telomere(ALT), ANR Congress 2014, 13 May 2014, Cologne, Germany.

13. 檜山英三. JPLT (肝芽腫), 第 51 回日本小児外科学会学術集会, 2014 年 5 月 9 日, 大阪市.

14. Hiyama E, Detection of Cancer Stem Cells in Childhood Cancers, BIT ' S 4th Annual World Congress of Molegular & Cel, 27 Apr 2014, Dailen, China.

15. 栗原 将, 鬼武美幸, 小倉 薫, 檜山英三, 肝芽腫の縦隔再発に対して ICG 蛍光法を使用した経験, 第 55 回日本中国四国小児がん研究会, 2014 年 4 月 26 日, 広島県福山市.

〔図書〕(計 1 件)

上條岳彦, 檜山英三, 日本臨牀社, 肝芽腫の診断と治療. 「最新肝癌学」, 2015, pp805-811.

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

鬼武 美幸 (ONITAKE YOSHIYUKI)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号: 10448269

栗原 将 (KURIHARA SHO)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号: 40724894