

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861483

研究課題名(和文) デジタルPCR法を応用した非侵襲的小児がん診断法の開発

研究課題名(英文) Development of non-invasive diagnostic tools for childhood cancers using digital PCR

研究代表者

栗原 将 (KURIHARA, SHO)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号：40724894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫23例で、MYCN 増幅は血漿や骨髄DNAでデジタルPCR 法による検出は可能で、原発巣摘出後転移巣のある6例を除き検出されなかった。ALK 変異のある神経芽腫2例、カテニン変異のある肝芽腫3例は診断時に検出されたが、術後5日以降は検出されなかった。小円形細胞腫瘍の12種のキメラ遺伝子のライブラリーを作成し、ユーイング肉腫1例、横紋筋肉腫2例は、診断時に検出したが、術後は検出されなかった。血漿中エクソソームを濃縮し、次世代シーケンサーとデジタルPCRを用いてmicroRNA 発現量を4例で検討した。上記から、小児がん患者の血液を用いたデジタルPCR 診断法は有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：MYCN amplification was detected by digital PCR using of plasma DNA and bone marrow DNA samples derived from 23 neuroblastoma cases before treatment but became undetectable after surgery except for 6 cases with metastasis. ALK mutations in 2 neuroblastoma cases and CTNNB1 mutations in 3 hepatoblastoma cases were detected in plasma DNA at diagnosis but became undetectable more than 5 days after surgery. The library for 12 kinds of chimeric DNAs in small round cell tumors was designed. By the next generation sequencing using this library, chimeric genes were detected in 1 Ewing family tumor and 2 rhabdomyosarcomas but became undetectable after surgery. Plasma exosomes were concentrated and then microRNA was detected in these exosome samples in 4 cases. These data suggested that digital PCR methods using blood sample is useful for diagnosis of childhood cancers.

研究分野：小児外科学

キーワード：癌 遺伝子 小児

### 1. 研究開始当初の背景

小児腫瘍は、多くは小細胞円形細胞からなり、必ずしも病理診断は容易ではなく、キメラ遺伝子の検出などが診断に有用である。さらに、神経芽腫の *MYCN* 遺伝子増幅や胞巣型横紋筋肉腫の *PAX3-FLI1* などのキメラ遺伝子検出は治療法選択に必須である。そのために、病理診断に加えて分子診断が確定診断や悪性度判定に不可欠であり、通常は全身麻酔下に腫瘍生検が行われる。しかし、腫瘍の部位によっては生検が必ずしも容易でないこと、たとえできたとしても腫瘍の heterogeneity から生検組織が全体を代表しているとは限らない。近年、腫瘍由来の DNA が血中に遊離していることが知られるようになり、この血清遊離 DNA を用いた非侵襲的な検査法が可能となればその重要性は大きい。まずは、RT-PCR 法による *MYCN* 増幅診断が示され、申請者らもその有用性について報告した。最近、デジタル PCR 法が登場し、より高感度で特異性の高い解析が可能となった。

### 2. 研究の目的

血清あるいは血漿微量検体を用いて、すでに保存されている多検体を用いたデジタル PCR 解析法を確立し、*MYCN* 増幅のみならず、肝芽腫の カテニン異常、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫等のキメラ遺伝子検出について応用し、デジタル PCR 法を用いた非侵襲的な小児固形悪性腫瘍の診断及び治療効果判定法確立の基礎データとすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

1990 年から同意を得て保存しえた神経芽腫、肝芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫の外科的切除腫瘍および術前と術後の血清(血漿)、骨髄、腹水、胸水が保存されている症例 97 例を対象に以下の検討を行う。

1. *MYCN* 遺伝子増幅：神経芽腫症例の腫瘍由来 DNA と血清(血漿)由来 DNA を用いて、デジタル PCR 法にて *MYCN* 増幅を検討し、その検出感度、精度を検証し、リアルタイム PCR の結果と比較する。さらに骨髄転移の評価、術後の治療効果、化学療法の有効性、さらに再発例における再発予測の指標と有効性を検証する。

2. 遺伝子異常検索：ALK 変異が見出された神経芽腫について、血清由来 DNA を用いて検出可能性について検討する。さらに、カテニンのエクソン 3 の変異、欠失のある肝芽腫症例の血清 DNA を用いて、デジタル

PCR でその検出率を検討し、腫瘍細胞から得られた欠失、変異のデータと照合する。これらが検出された症例の術後検体の検討から、術後の治療効果、化学療法の有効性、さらに再発例における再発予測の指標としての有効性を検証する。

3. キメラ遺伝子検索：横紋筋肉腫、ユーイング肉腫症例で、腫瘍からキメラ遺伝子が検出されている症例において、腫瘍でみられたキメラ遺伝子の部位から、特異的な PCR プライマーとプローブを設計し、血清、胸水などの体液由来 DNA でデジタル PCR を用いて検索し、検出可能な条件を検討し、検出限界、精度を検証するとともに、治療中の治療効果、化学療法の有効性、さらに再発例における再発予測の有効性を検証する。

4. microRNA 検索：体液特に血液から得られた microRNA を用いて、腫瘍特異性が示唆されている microRNA について、体液特に血液中のエクソソームを濃縮し、デジタル PCR を用いて microRNA 発現量を検出し、術前診断と術後経過について検討を加える。

上記の結果から、血液特に血清由来 DNA を用いたデジタル PCR 法による神経芽腫の *MYCN* 増幅診断法、ALK 変異の検出法、肝芽腫における カテニン変異の検出法、胞巣型横紋筋肉腫、ユーイング肉腫などのキメラ遺伝子の検出法としてのデジタル PCR の有用性を見出し、非侵襲的に高感度な血清診断法を提示する。さらに、小児がんの特異的とされる microRNA のデジタル PCR 法、デジタル PCR を利用した骨髄や体液中の MRD 判定法、治療効果判定法、再発の早期診断法も提言し、小児がんの治療成績向上に寄与する。

### 4. 研究成果

術後経過中に保存された血漿検体、骨髄を用いたデジタル PCR にて、遺伝子増幅や変異、キメラ遺伝子の検索について検討し、治療効果判定あるいは再発マーカーとしての有用性を検討した。

血漿中の遊離 DNA 量は、がん腫に関わらず、進行例で高値となった(図 1)。

1. *MYCN* 遺伝子増幅：神経芽腫症例の腫瘍由来 DNA と血清(血漿)由来 DNA を用いて、デジタル PCR 法にて *MYCN* 増幅を検討したところ、増幅例全例で血清由来 DNA で

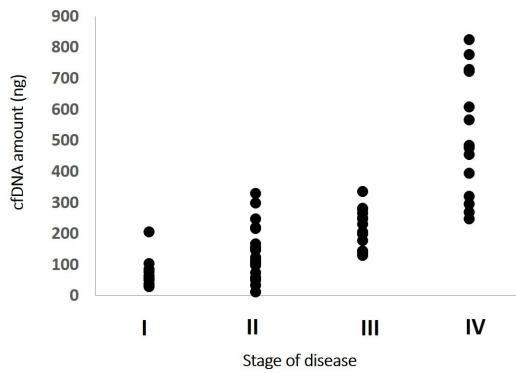


図 1 : 病期別の血漿中遊離 DNA 量

MYCN増幅が見出され、コピー数も関連した(図2)。MYCN増幅神経芽腫23症例の術後の血漿と骨髄検体中の遊離DNAを用いて、デジタルPCR法によるMYCN増幅検出を行うと、原発巣が摘出後14日には転移巣が残存している6例を除き増幅が検出されなかった。

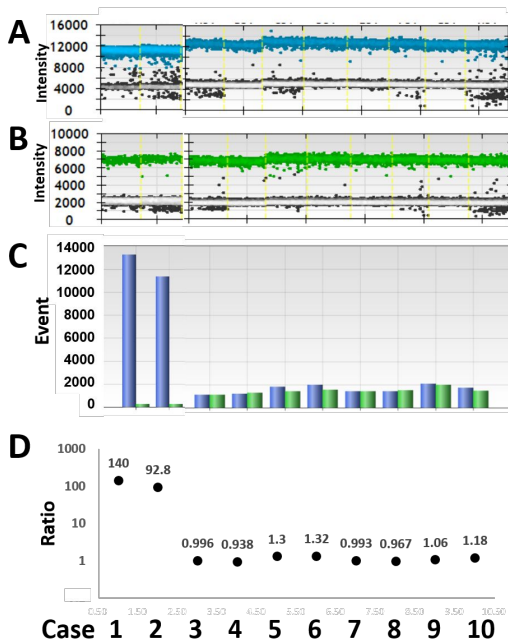


図 2 : 神経芽腫症例10例の血漿由来cfDNAを用いたデジタルPCRによるMYCN増幅検索。

A: MYCN陽性ドロプレット、B: 対象のNAGK遺伝子陽性ドロプレット、C: ドロプレットの比、D: MYCNコピー数

2. 遺伝子異常検索: ALK 変異のある神経芽腫2例、カテニン変異のある肝芽腫3例のエクソーム解析を行い: ALK変異のある神経芽腫、カテニンのエクソン3の変異、欠失のある肝芽腫症例について、血清由来DNAを用いて次世代シーケンサーにて検出した。

表 1 : 小児がん 44 例の血液遊離 DNA 解析

Case	Histology	NGS of cfDNA
1*	neuroblastoma	ALK F1174L
2*	neuroblastoma	ALK F1174V
3*	neuroblastoma	
4*	neuroblastoma	TP53R337H
5	neuroblastoma	
6	neuroblastoma	
7	neuroblastoma	
8	neuroblastoma	
9	neuroblastoma	
10	neuroblastoma	
11*	nephroblastoma	WT1 exon1 del.
12	nephroblastoma	
13	nephroblastoma	
14	RTK	SMRKCB1 del.
15	RTK	SMRKCB1 del.
16*	hepatoblastoma	CTNNB1 G34E
17*	hepatoblastoma	CTNNB1 R32 Y
18*	hepatoblastoma	CTNNB1 deletion
19*	hepatoblastoma	APC A 3894delT
20	hepatoblastoma	
21	hepatoblastoma	
22	rhabdomyosarcoma	
23	rhabdomyosarcoma	
24	rhabdomyosarcoma	
25	rhabdomyosarcoma	
26	rhabdomyosarcoma	
27	yolk sac tumor	
28	yolk sac tumor	
29	germ cell tumor	
30	germ cell tumor	
31	germ cell tumor	
32	Ewing sarcoma	
33	Ewing sarcoma	
34	Ewing sarcoma	
35*	osteosarcoma	TP53 C722T
36	osteosarcoma	
37	osteosarcoma	
38	osteosarcoma	
39	fibrosarcoma	CDNK2AT del
40	fibrosarcoma	
41*	GIST	KIT Q575H
42*	pancreatoblastoma	SMRKCB1 del
43	neurofibrosarcoma	RET C634Y
44	unknown sarcoma	

Del: deletion, RTK: rhabdoid tumor of kidney,

デジタル PCR でその変異検出率を検討している。術後の血漿 DNA を用いた検出は変異ごと

に個別にプローブ設計が必要であったが、診断時に検出された変異が術後5日以降は検出されなくなった。

3. 小円形細胞腫瘍のキメラ遺伝子検索：腫瘍及び血液由来DNAを用いてキメラ遺伝子の部位から、特異的なPCRプライマーとプローブを設計し、血清、胸水などの体液由来DNAを次世代シーケンサーにて検証し、さらに次世代シーケンサーにて、12種のキメラ遺伝子のライブラリーを作成し、ユーイング肉腫1例、横紋筋肉腫2例の術後検体用いて検証したところ、診断時に検出されたキメラ遺伝子はいずれも検出されなかった。

4. microRNA 検索：腫瘍特異性が示唆されている microRNA について、血液中のエクソソームを濃縮し、これらから、次世代シーケンサーおよびデジタル PCR を用いて microRNA 発現量を4例で検討を行ったところ、前者では診断時からの検出はできず、後者のみで検出され、術後は検出不能となった。

上記の結果から、小児がんとくに MYCN 増幅神経芽腫、ALK 変異神経芽腫、カテニン異常肝芽腫、胞巣型横紋筋肉腫、ユーイング肉腫などの血清 DNA 診断、さらに特異的 microRNA を用いた小児がんのデジタル PCR 法による非侵襲的診断法は有用と考えられ、さらに、治療中や治療後の骨髄や体液中の MRD 判定法、治療効果判定法、再発の早期診断法への有効性が示唆された。

#### 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4件)

1. Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Yano M, Oue T, Iehara T, Hoshino K, Koh K, Tanaka Y, Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Mortality and morbidity in primarily resected hepatoblastomas in Japan: Experience of the JPLT (Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor) trials, *Journal of Pediatric Surgery*, 50, 査読有, 2015, pp2098-2101, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2015.08.035.
2. Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Sueda T, Ohta E, Morihara N, Hirano S, Irisuna F,

Hiyama E, Circulating free DNA as non-invasive diagnostic biomarker for childhood solid tumors, *Journal of Pediatric Surgery*, 50, 査読有, 2015, pp2094-2097, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2015.08.033.

3. 檜山英三, 上田祐華, 栗原 将, 肝芽腫の分子生物学, *小児外科*, 47, 査読有, 2015, pp181-188, DOI: <http://www.fujisan.co.jp/product/1281683463/b/1230692/>

4. 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, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2014.09.029

〔学会発表〕(計14件)

1. 栗原 将, 檜山 英三, 上田 祐華, 門脈体循環シャントにて経過観察している3症例, 第31回日本小児外科学会秋季シンポジウム, 2015年10月31日, 熊本県民交流館パレア・鶴屋ホール(熊本県・熊本市)

2. Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Ueda Y, Morihara N, Fukuba I, Komatsu R, Integrated exome analysis in childhood hepatoblastoma: Biological approach for molecular targeting, SIOP 2015, 8-11 Oct 2015, Cape Town (South Africa)

3. Hiyama E, Hishiki T, Ida K, Watanabe K, Oue T, Yano M, Hoshino K, Iehara T, Koh K, Tanaka Y, Kurihara S, Ueda Y, Prediction of prognosis by preoperative chemotherapy response in hepatoblastoma patients treated by JPLT-2 protocol, SIOP 2015, 8-11 Oct 2015, Cape Town (South Africa)

4. 栗原 将, AFP高値を認めた肝限局性過形成の1症例, 第54回日本小児外科学会中国四国地方会, 2015年9月26日, 国際観光旅館 国際観光旅館 道後温泉 道後温泉 ふなや(愛媛県・松山市)

5. 栗原 将, 檜山 英三, 鬼武 美幸, 門脈-右房シャントを呈した静脈管欠損症の1例, 第52回日本小児外科学会学術集会, 2015年5月28-30日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

6. Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Yano M, Oue T, Iehara T, Hoshino K, Koh K, Tanaka Y, Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Mortality and morbidity in primarily resected hepatoblastomas in Japan:

experience of JPLT (Japanese study group for pediatric liver tumor) trials, 48th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, 17-21 May 2015, Jeju (South Korea)

7. Kurihara S, Ueda Y, Onitake Y, Sueda T, Ohta E, Morihara N, Hirano S, Irisuna F, Hiyama E, Circulating free DNA as non-invasive diagnostic biomarker for childhood solid tumors, 48th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, 17-21 May 2015, Jeju (South Korea)

8. 栗原 將, 鬼武美幸, 三木瑞香, 中村和洋, 小林正夫, 檜山英三, 肺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 28-30 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

9. 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, 22-25 Oct 2014, Toronto(Canada)

10. 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 將, 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 25-27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

11. 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, 22-25 Jun 2014, Edinburgh (Scotland)

12. Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Yamaoka E, Fukuba I, Hiyama K, Clinical feature of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma, PAPS2014, 25-29 May 2014, Calgary (Canada)

13. Kurihara S, Hiyama E, Onitake Y, Miki M, Nakamura K, Kawaguchi H, Kobayashi M, Central venous catheter-related complications in children with malignancy, PAPS2014, 25-29 May 2014, Calgary (Canada)

14. 栗原 將, 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, 広島県民文化ホールふくやま (広島県・福山市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

栗原 將 (KURIHARA SHO)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号 : 4 0 7 2 4 8 9 4