

総括研究報告書

課題番号：26-20

課題名：小児がんの登録・中央診断の推進を基盤とする病態解明と先駆的診断法開発

清河信敬（国立成育医療研究センター研究所
小児血液・腫瘍研究部 部長）

（研究成果の要約） 先行研究を通じて開発・構築してきたシステムを運用し、国内におけるすべての小児がん患児を対象とする症例登録・中央診断を実施した。小児固形腫瘍では症例登録、中央診断（病理、遺伝子、放射線）への検体送付が、国内発症の約8割以上をカバーする状況になっている。今後さらに、症例登録と中央診断を継続し情報を収集、解析することで、国内における小児腫瘍の発症の実態が、分子特性のレベルで解明されることが期待される。また、併行して、分子病態解析を進めており、同定した新規遺伝子異常に関して新たな検査法として診断への応用を進めている。また、新たなMRD検出法や、治療層別化に有用な検査法についても開発を進めている。

1. 研究目的

小児がんは成育医療の対象疾患として重要であり、小児期の死亡原因の上位を占めるが、正確な診断に基づいて適切な治療を行えば多くの症例で治癒が望める状況が確立されつつあり、今後さらに治療の適正化を図り、患児のQOLの一層の向上を目指すことが望まれている。しかし、小児がんには多様な疾患が含まれるために診断は必ずしも容易ではない。また、発症例の把握についてもがん種ごとの詳細な情報は未だ収集されていない。そのため、全国的な症例登録と中央診断による治療の支援体制の整備が望まれている。この研究班では、先行研究を通じて、国内における全ての患児を対象とした小児固形がんの登録と病理・分子中央診断、血液系腫瘍の細胞マーカー・融合遺伝子中央診断、分子MRD法による微小残存病変の中央診断、等の実施体制を構築してきた。

本研究では、これまでに確立してきた登録・診断のネットワーク体制を運用して小児がんの中央診断を推進し、わが国のすべての小児がん患児に対し、国際的に最高水準の、標準化、均てん化された診断を提供して、国内の小児がん治療研

究の質の向上に寄与する事により、小児がん診療への貢献を目指す。同時に、余剰検体の研究利用を目的としたバイオリソース構築を進める。その成果として集積された、臨床情報と連結した診断・分子情報を解析する事によって、わが国の小児がん発症の実態を明らかにする。さらに、これを基盤とした病態解明研究、正確で簡便な診断法や難治例を早期に鑑別して治療層別化を可能にする先進的な検査法の開発を行ない、その成果を迅速に中央診断に反映する事で、小児がんの治療成績向上や、小児がん患児のQOL向上への貢献を目指す。

2. 研究組織

清河信敬
義岡孝子
瀧本哲也
宮寄治
松本公一
大木健太郎

大喜多肇
堀壽成
福島敬
出口隆生

国立成育医療研究センター
慶応義塾大学
愛知医科大学
筑波大学
三重大学

3. 研究成果

[出口、福島、堀、眞田、大木、清河] 先行研究で確立した小児造血器腫瘍診断ネットワーク体制で連携し、2017年(1-12月)には合計897例の新規血液腫瘍症例(疑い例を含み大阪大学における1-3月分は未集計)の中央細胞マーカー診断を行なった。その内訳は、急性リンパ芽球性白血病(ALL)488例(=B-cell precursor およびPre-B ALL 401例、T-ALL 82例)、AML、顆粒球肉腫およびMDS 192例、Biclonal leukemia あるいは True mixed-lineage leukemia 7例、分類不能白血病1例、リンパ腫(=細胞マーカーのみで診断確定された症例)68例(B-NHL 41例、B-LBL 4例、T-LBL 18例、ALCL 4例を含む)、CML 17例、JMML 5例、NK白血病1例、等が診断された。今年度は、特にB-NHLの件数が著しく増加した。一方、2017年度(4月~2018年3月)のALLキメラ遺伝子のスクリーニング件数は498件であり、*TEL-AML1* 70例、*E2A-PBX1* 38例、*minor BCR-ABL* 18例、*major BCR-ABL* 6例、*MLL-AF4* 7例、*MLL-AF9* 0例、*MLL-ENL* 0例、および*SIL-TAL* 15例が含まれていた。白血病、特にALLについては、国内発症症例のほぼすべてに近い症例をこのシステムで中央診断がカバーしており、適切な治療選択に貢献していると考えられる。また、リンパ腫は、サンプリングの関係上、細胞マーカー検査を行い難い場合があるものの、国内における中央診断が、次第に定着してきていることが伺える。

中央診断と、余剰試料の遺伝子解析の結果から同定された新規*ZNF384*関連融合遺伝子に関し、定量PCRによる検出系を確立し、FISH法による検出についても検討を進めた。

PCR-MRD検出では、ALL120例(初発95例/再発20例/不明5例)、BCP45例/T71例/不明4例、小児83例/成人31例/不明6例)、リンパ腫再発2例、骨髄腫1例の計123例を解析した。全体の再構成検出率は77.1%、うちBCP-ALL93.8%、T-ALL75.8%であり、再構成検出率は昨年よりやや改善がみられたものの、問題点の改善という視点では未だ成果に乏しいと考えられ、BCP-ALLと比してT-ALLでその傾向が顕著であった。また、解析完了

50例の定量感度の内訳はE-5 36例、E-4.5 2例、E-4 10例、E-3.5 1例で、 \leq E-4 48例、 \geq E-3 0例であり、高感度な定量精度を維持することができた。これら一連のMRD定量技術については、前述のEuroMRD quality control roundにおいても同等の結果を得ており、ヨーロッパ各国の研究施設と比べても遜色ない水準にあることを確認できた。

これに対して、次世代シーケンサーを用いたキャプチャー・シーケンスによるスクリーニング系の検討を行ったところ、既知の再構成はほぼ捕捉され、かつ新規の再構成も検出をされた。現行法では、5-10%の小児ALL症例において、MRD評価に適した再構成が検出されないが、今回の解析によりMRD評価不能であったB-ALLの一部の症例において、MRD評価に使用可能な再構成が同定された。従来法において再構成のスクリーニング対象に含まれないIGK, IGL, TRAについても使用可能なIGK(V-J)やTRA+TRDの再構成が検出される場合があり従来のマーカーによる評価が困難な症例において検索することは一定の意義があると考えられた。

一方、FCM-MRDについても引き続き解析を進め、その有用性について評価を行っている。今年度は、再発ALLに対するALL-R08、BCP-ALLに対するB12、T-ALLに対するT-11等の臨床試験で測定されたFCM-MRDの結果をTCR/IgH-PCR法で測定されたPCR-MRDとの相関を行い、良好な相関が得られることを確認した。

[義岡、大喜多] 平成29年度は小児血液腫瘍(主にリンパ腫)215例、小児固形腫瘍768例(神経芽腫129例、横紋筋肉腫54例、ウィルムス腫瘍などの小児腎腫瘍65例、肝芽腫などの小児肝腫瘍44例、小児脳腫249例、ユーイング肉腫14例、胚細胞腫瘍53例、その他の稀な小児腫瘍160例)の遺伝子解析を含めた中央病理診断を行った。

パラフィン切片を用いたFISH法は特定遺伝子の転座:c-myc(37枚)、BCL2(26枚)、BCL6(27枚)、IRF4(9枚)、MLL(6枚)、ALK(1枚)、FOXO1(7枚)、PAX3/FOXO1(1枚)、PAX7/FOXO1(1枚)、EWSR1(6枚)、SS18(3枚)、ETV6(2枚)、TFE3(1枚)、PDGFb(1枚)、BRAF(5枚)、CIC(2枚)、BCOR(2枚)、NUT(1枚)、NR4A3(1枚)や特定遺伝子の増幅:c-myc(42枚)、N-myc(9枚)、総数196枚の解析を行った。

小児固形腫瘍観察研究における稀少腫瘍に対する分子診断を実施した。30 症例に対して、延べ 71 項目の解析を行った。内訳としては、稀少な軟部腫瘍及び腎腫瘍を解析し、SS18-SSX 4 例、BCOR-CCNB3 2 例、NAB2-STAT6 1 例、BCOR-ITD 4 例、ETV6-NTRK3 2 例例検出した。融合遺伝子が検出されなかった腫瘍は 14 例、検体不良 1 例であった。これらの腫瘍の解析後の凍結検体、余剰 RNA、cDNA を保存した。また、今年度は、MiTF 転座関連腎癌で報告されている稀な融合遺伝子である RBM10-TFE3、PARP14-TFE3、DVL2-TFE3、KHSRP-TFE3、LUC7L3-TFE3 を解析する体制を整えた。融合遺伝子解析対象外の神経芽腫、脳腫瘍、肝腫瘍等を含めた約 200 件の凍結検体を新たに保存した。

[瀧本] 前年度に引き続き、日本小児血液・がん学会（以下、学会）の委託を受け、小児がん症例登録の実務を行った。疾患登録管理室では 2008 年から日本小児血液・がん学会の登録実務を委託されている。2016 年の新規学会登録例数は、造血器腫瘍 1015 例、固形腫瘍 962 例であった。そのうち固形腫瘍の内訳は、神経芽腫群腫瘍 137 例、網膜芽細胞腫 52 例、腎腫瘍 58 例、肝腫瘍 65 例、骨腫瘍 65 例、軟部腫瘍 90 例、胚細胞腫瘍（脳腫瘍を除く）147 例、脳脊髄腫瘍 288 例、その他 60 例で、例年と大きな違いはみられなかった。この結果については、第 60 回日本小児血液・がん学会学術集会（於松山）において公表された。

日本小児がん研究グループ（JCCG）の固形腫瘍分科会として実施している症例の、登録、各種中央診断、フォローアップおよびデータ管理業務を、当センターが本研究の中で行っている。2011 年 1 月 1 日から 2018 年 3 月 31 日までの累積登録症例数は一次登録 3580 例、二次登録 2412 例で、最近では月間 67.2 例の新規一次登録が得られており、学会登録例の 80% 以上に該当する。各疾患の内訳は下表のとおりである。なお二次登録のうち、470 例が臨床試験への登録であった。

[宮寄] 中央画像診断の正式な開始以来、合計 178 回の中央画像診断を行った。このうち肝芽腫が最も多く、116 回であった。当初は参加の可能性も低いと思われたユーイング肉腫も 7 件、また読影の依頼に迅速性を求められる脳腫瘍（上衣腫）摘出判定中央診断も 9 回も滞ることなく

行うことができた。肝芽腫は個々の施設の PRETEXT 分類と中央読影での分類とを比較をすると図 2 のごとく約半数が一致したのみであり、中央診断の必要性が改めて確認された。

[松本] JNBSG による全国スタディである「高リスク神経芽腫に対する ICE 療法を含む寛解導入療法と BU+LPAM による大量化学療法を用いた遅延局所療法 第 II 相臨床試験」を松本が主任研究者として遂行し、2018 年 3 月までに日本全国から 64 例の登録を得た。臨床成績の解析と共に、array CGH などの先進的な診断法を行い、治療介入の可能性につき検討中である。

DIPG を含む悪性小児脳腫瘍を対象にした治験 DSP-7888 に当センターから 5 人の患者が参加し、新規治療を行った。治験は現在患者登録が終了し、生存データを収集中である。

小児がん中央診断について、臨床面からの有用性を評価し、継続の必要性や改善点について検討を行っており、最終年度に将来的方向性について提言する。

成育医療研究センターで診療を受けた神経芽腫、脳腫瘍など小児固形腫瘍患児の余剰検体を成育バイオバンクに寄託して小児がんの公的なバイオリソース構築の端緒とする。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究では、多数の小児がん臨床検体を用いた中央診断や分子解析を実施しているため、検査および研究内容についての患者あるいは代諾者への説明を行なって同意取得し、個人情報保護に細心の注意を払い、検体を提供することによる不利益・危険性を排除するための最大限の努力を行なった。患者から提供されるすべての検体ならびに臨床情報については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」を遵守した。全ての研究は、成育および関係施設で、外部委員を含めた倫理審査委員会において、その科学性ならびに倫理性についての審査を受け、同委員会の承認ならびに実施機関の長の許可を得て実施した。成育においては、受付番号 142 「東京小児がん研究会（TCCSG）における白血病細胞マーカー中央診断システムおよび検体保存システムの確立」、他、本件にかかわる申請として約 30 件について