

総 括 研 究 報 告 書

課題番号：28-13

課題名：小児腎腫瘍の鑑別診断法の確立および術前診断法の検討

主任研究者名（所属施設） 国立成育医療研究センター

上野 瞳 （所属・職名）小児血液・腫瘍研究部・上級研究員

（研究成果の要約）本研究は、小児腎腫瘍の包括的鑑別診断法の確立と術前診断方法の開発を目的とする。平成29年度は、小児腎腫瘍の腫瘍病型分類に有用なDNAメチル化解析の検討と術前診断のための血中遊離DNAを用いたBCOR-ITD検出法の検討を行った。腎明細胞肉腫、腎ラブドイド腫瘍、間葉芽腎腫に特異的なメチル化領域を発見した。また、血中遊離DNAを用いたBCOR-ITDの検出法を確立し、臨床検体を用いてその有用性を確認した。

1. 研究目的

本研究は、小児腎腫瘍の包括的鑑別診断法の確立と術前診断方法の開発を目的とする。

腎腫瘍の診断においては、病理組織学的診断の補助診断となり得る、感度および特異性の高い鑑別診断法が開発が求められている。腎腫瘍は病型によって治療薬、再発の確立が異なり、早期診断が可能な検査法が確立されれば、長期的な予後を見据えた治療方針の決定を行なうことができる。しかしながら、画像診断では病型の特定が難しく、術前の針生検は、腫瘍細胞の漏出の危険があるため、日常的検査として行えない。本研究では、新たに同定した遺伝子変異の検出を応用した診断法や、DNAメチル化測定による小児腎腫瘍の包括的鑑別診断法を確立と、血漿/血清や尿、腹水、胸水を用いた癌細胞由来の遊離DNAの解析による診断方法の確立によって、術前診断が可能な検査法の確立を目指す。

2. 研究組織

上野 瞳

国立成育医療研究センター

3. 研究成果

本年は、小児腎腫瘍の包括的鑑別診断法の確立のため、網羅的DNAメチル化解析の結果に基づき病型ごとに特徴的なメチル化修飾領域の検討、および、腎明細胞肉腫の予測診断法の確立のため、血中に遊離するDNA (cell free DNA: cfDNA) を抽出し、そこに含まれる腫瘍由来DNA (tumor-derived DNA: ctDNA) から、BCOR-ITDを検出法の検討を行った。

1) DNAメチル化による小児腎腫瘍の鑑別診断法の検討

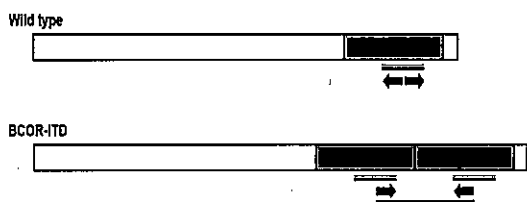
平成28年度に引き続き、Infinium450Kの解析データから、病型特異的メチル化サイトを抽出し、バイサルファイトシーケンスで確認の後、pyrosequencingを実施した。その結果、前年度のCombined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法によるメチル化解析と組み合わせて、腎明細胞肉腫(CCSK)、腎ラブドイド腫瘍(RTK)および間葉芽腎腫(CMN)は、他の腫瘍と区別できることが明らかとなった。

2) 血中遊離DNA (cfDNA)を用いた術前予測診断法の検討

a. cfDNAにおけるBCOR-ITD特異的検出のための増幅法を検討した。BCOR-ITDには、共通して重複する13アミノ酸配列がある。そこで、その共通領域にprimerを

設定し *BCOR*-ITD のみを検出する方法を確立した (図 1)。

生殖細胞系列の遺伝子変異の検出」 (平成 27 年 10 月 29 日付承認)



b. 腎腫瘍患者 3 例の術前の血漿を入手し cfDNA を抽出した。*BCOR*-ITD PCR の結果、2 例に陽性の増幅を認め、シーケンス解析の結果、*BCOR*-ITD 配列が確認され CCSK であることが疑われた。1 例は陰性であった。術後の病理組織学的診断において、*BCOR*-ITD 陽性症例はいずれも CCSK であり、陰性症例は腎芽腫であった。また、凍結組織から *BCOR*-ITD の増幅およびシーケンス解析を行ったところ、いずれも cfDNA において検出された配列と一致し、cfDNA における *BCOR*-ITD 検出が有用であることが確認出来た。

4. 研究内容の倫理面への配慮

ヒト試料を使用する研究については、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守し、必要な倫理的承認の手続きを得て、個人情報保護法にもとづいて研究を実施した。研究利用に同意の得られた小児腫瘍臨床検体あるいは連結不可能匿名化された検体を使用して研究を実施した。

(受付番号 219)

研究課題名：日本ウイルス腫瘍スタディグループにおける中央病理診断及び分子遺伝学的研究

平成 18 年 1 月 28 日付承認

(受付番号 354)

研究課題名：連結不可能匿名化試料を用いた小児固形腫瘍の特性解析研究

平成 22 年 6 月 8 日付承認

(受付番号 1035)

研究課題名：「小児血液・腫瘍疾患の発症と治療経過に関する体細胞系列および