

(別紙1)

## 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

上野 瞳 (所属施設) 国立成育医療研究センター  
(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30年度は、前年度までに確立したDNAメチル化解析による鑑別診断方法と血中遊離DNAを用いたBCOR-ITD検出の術前診断方法について臨床検体による確認を行った。さらに、間葉芽腎腫における新たな遺伝子異常の検出法について検討した。

### 1. 研究目的

本研究の目的

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の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。そのため、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の確立と、腫瘍細胞由来の血中遊離DNAの解析による術前診断法についての検討を行う。

### 2. 研究組織

研究者	所属施設
主任研究者 上野 瞳	国立成育医療研究センター
研究協力者 清河 信敬	国立成育医療研究センター
大喜多 肇	国立成育医療研究センター 慶応義塾大学
中里 恵子	国立成育医療研究センター
大隅 朋生	国立成育医療研究センター
加藤 元博	国立成育医療研究センター

義岡 孝子 国立成育医療研究センター

### 3. 研究成果

本年は、主にこれまでに確立した小児腎腫瘍のDNAメチル化解析による鑑別診断方法と血中遊離DNA (cell free DNA: cfDNA)による腎腫瘍の術前診断について、臨床検体を用いて確認を行った。また、cfDNAによる検出方法の改良を行った。さらに、間葉芽腎腫における新規遺伝子異常の検出方法を検討した。

1) DNAメチル化による小児腎腫瘍の鑑別診断法の検討

昨年度までに、COBRA法 (Combined Bisulfite Restriction Analysis)による2遺伝子領域およびpyrosequencingによる2遺伝子領域のDNAメチル化解析により小児腎腫瘍 (腎芽腫: Wilms, 腎明細胞肉腫: CCSK, 腎ラブドイド腫瘍: RTK, 間葉芽腎腫: CMN)の鑑別診断が可能であること検討してきた (表1)。

表1. 小児腎腫瘍のDNAメチル化解析

	Wilms	CCSK	RTK	CMN	
				cellular	classic
THBS1 COBRA	-	+	-	-	
ACP2 COBRA	-	-	+	-	
RASSF1A pyroseq.	>5%	>20%	>20%	<5%	
REC8 pyroseq.	<40%	>20%	>40%	25~80%	

そこで今年度は、新たな腎腫瘍検体を解析し、この方法について確認を行った。試料は、平成29年度にcfDNAの術前検査を行い、腫瘍凍結検体からDNA抽出が可能であった、

2例のDNAを使用した。表1のDNAメチル化解析の結果、症例1はCCSK、症例2は、Wilmsと判定された(表2)。

表2. DNAメチル化解析による小児腎腫瘍の鑑別診断

	症例1	症例2
<i>THBS1</i> COBRA	+	-
<i>ACP2</i> COBRA	-	-
<i>RASSF1A</i> pyroseq.	80.8%	76.6%
<i>REC8</i> pyroseq.	26.4%	10.9%
<b>結果</b>	<b>CCSK</b>	<b>Wilms</b>
cfDNA <i>BCOR</i> -ITD	+	-
<b>病理診断結果</b>	<b>一致</b>	<b>一致</b>

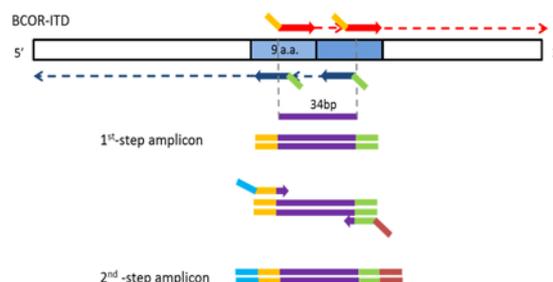
この結果は、cfDNAによる術前診断および、術後の病理診断の結果と一致した。よって、DNAメチル化解析も小児腎腫瘍における鑑別診断として有用であることが立証できたと考える。

## 2) 血中遊離DNA (cfDNA)を用いた術前予測診断法の検討

a. 初期の画像診断で、腎腫瘍の疑いがあった患者1例の血漿からcfDNAを抽出し、昨年度までに確立した*BCOR*-ITD特異的PCRを行ったところ、陰性であった。後の詳細な検査により、本症例は腎腫瘍ではないことが判明した。さらに既知の遺伝子異常が検出され、*BCOR*-ITD変異は陰性の症例であることが明らかとなった。

b. CCSKにおける*BCOR*-ITD変異の共通配列は、ほとんどが13アミノ酸に相当する領域であるため、*BCOR*-ITD特異的PCRは、その領域を増幅するように設計している。しかし、他の*BCOR*-ITD陽性腫瘍が発見されつつあり、少数であるが、共通配列が9アミノ酸領域の症例が発見されている。そのため、今後CCSK患者においても偽陰性が生じる可能性がある。また、検査の汎用性を考慮し、*BCOR*-ITD特異的PCRの改良を行った。一般的な遺伝子異常の検出は、PCR・電気泳動と遺伝子配列決定(シーケンス解析)により行うため、特異的なprimerの設計と増幅産物の長さが重要となる。Primerは、一般的に20塩基ほどの長さで標的配列の末端に2か所設計するが、*BCOR*-ITD変異の検出において標的配列となる共通配列は、9アミノ酸領域(すなわち27塩基)と短いため、primerの長さが短くなり特異性が下が

る可能性がある。またこの長さでは、ダイレクトシーケンス解析に用いる増幅産物としては非常に短く、サブクローニングが必要になる。そこで、*BCOR*-ITD特異的primerに付加配列をつけて増幅を行い、さらにその付加配列に結合する2つ目のprimerを用いた増幅を行う、2段階のPCR(2step-PCR)に改良した。(下図)



Primerに付加配列をつけることで、特異性を上げることができ、さらに増幅産物を長くすることが出来る利点がある。

この*BCOR*-ITD specific 2step-PCRについて、腫瘍由来DNAを用い、その特異性と感度を確認ところ、改良前の方法と同等の検出が可能であった。

## 3) 間葉芽腎腫 (classic型)における遺伝子異常の検出

間葉芽腎腫(CMN)は、その組織型によりcellular型、classic型、混合型と分けられている。これまで、cellular型は*ETV6-NTRK3*融合遺伝子を有することが知られているが、classic型や混合型については遺伝子異常が明らかではなかった。2018年Wegertらによって、CMNのclassic型、混合型の多くに*EGFR*-ITD変異があることが報告された。そのため、本研究では*BCOR*-ITD変異と同様に重複配列特異的な検出方法を確立した。さらに、研究部に保存され利用可能なCMN9例(cellular型6例、classic型3例)のRNAを用いて、*EGFR*-ITDの検出を行った。その結果、CMN classic型の3例全てにおいて*EGFR*-ITD変異が陽性であった。Cellular型の6例は、*ETV6-NTRK3*融合遺伝子が陽性であることを確認している。この*EGFR*-ITDの検出は、中央診断の遺伝子検査項目に追加した。

## 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。