

表 題 本邦ランゲルハンス細胞組織球症患者における体細胞遺伝子  
変異解析

論文の区分 論文博士

著 者 名 早瀬 朋美

所 属 自治医科大学 小児科学

2020年 9月25日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療学系 生殖・発達医学 専攻 成育医学 専攻科  
職名・氏名 学内教授・森本 哲

# 目次

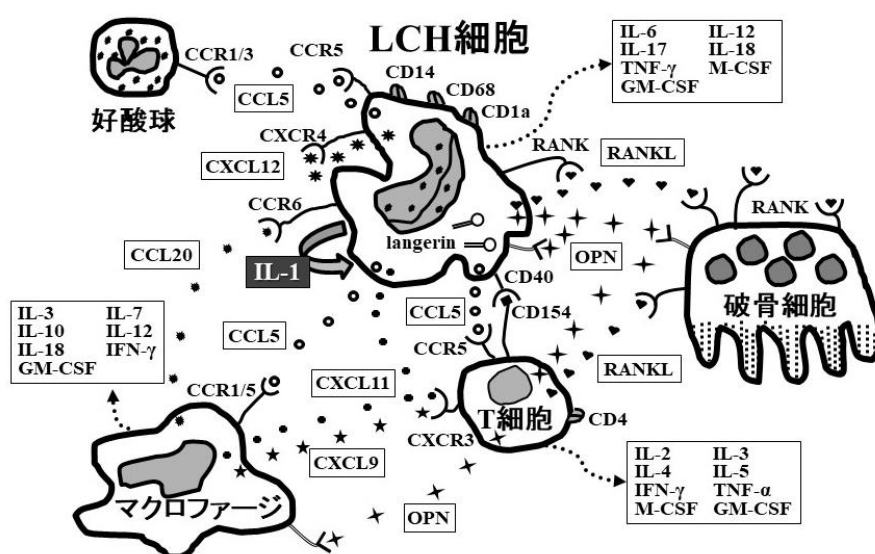
1. はじめに .....	1
2. 方法 .....	10
2.1. 対象と検体	
2.2. <i>BRAF</i> V600E 変異解析	
2.3. ターゲットシーケンス解析	
2.4. 統計解析	
3. 結果 .....	15
3.1. 患者背景	
3.2. <i>BRAF</i> V600E 変異解析結果	
3.3. <i>BRAF</i> V600E 変異陰性症例における体細胞遺伝子変異	
3.4. 本邦 LCH における <i>BRAF</i> および <i>MAP2K1</i> 変異の頻度	
3.5. 小児 LCH における遺伝子変異と臨床的特徴との関連	
4. 考察 .....	22
5. 結論 .....	25
6. 参考文献 .....	26

## 1. はじめに

ランゲルハンス細胞組織球症（LCH）は CD1a、CD207 陽性の未熟樹状細胞の形質を持つモノクローナルな LCH 細胞が骨、皮膚、中枢神経系などに集簇し、種々の炎症細胞浸潤を伴い組織破壊を起こす疾患である。炎症と腫瘍の両者の性格を併せ持つため「炎症性骨髄性腫瘍」という概念が提唱されている<sup>1)</sup>。

LCH における炎症性疾患の性格として LCH 病変部位には LCH 細胞のほかに T 細胞、マクロファージ、好酸球、破骨細胞様多核巨細胞などが浸潤しており、これらの細胞は相互刺激し種々のサイトカインやケモカインが分泌されている（図 1）。また LCH における腫瘍性疾患の性格として LCH 細胞はモノクローナルであり、細胞外シグナル制御キナーゼのリン酸化が亢進しており、多くの症例で発がん性遺伝子変異が認められる<sup>2)</sup>。

図 1 LCH 病変における細胞間相互作用と炎症性サイトカイン/ケモカイン  
(文献 2 から引用、改変)



我が国における小児 LCH の発症頻度は年間数十例と推計される<sup>3)</sup>。LCH は乳幼児期に好発するが、あらゆる年齢層で発症する。病変が単一臓器 (single-system) のみの SS 型と多臓器 (multi-system) に及ぶ MS 型に大別される。SS 型はさらに単独病変 (single-site) のみの SS-s 型と多発病変 (multi-site) の SS-m 型に、MS 型はリスク臓器 (肝、脾、造血器) 浸潤の有無で MS-RO(-)型と MS-RO(+)型に分類される。SS 型の 80%以上は骨病変だが、皮膚やリンパ節の単独型も見られる。成人では肺単独型もあるが小児では極めてまれである。MS 型の臓器浸潤は多岐にわたり皮膚と骨病変が多いが肝、脾、肺、造血器、胸腺、リンパ節、消化管、甲状腺、中枢神経など様々な臓器に病変を認める<sup>3)</sup>。

LCH の初発症状は皮疹や耳漏など乳幼児によくみられる非特異的な症状で発症することが多く、SS 型では腫瘤触知、骨痛、発熱、MS 型では皮疹、腫瘤触知、発熱、リンパ節腫脹、肝脾腫が多い<sup>3)</sup>。

疾患に特異的なマーカーはなく、炎症反応の上昇、白血球増多、血小板増多、慢性炎症による小球性貧血などが見られ、確定診断には病変部位の生検による病理学的な検索が必須である<sup>3)</sup>。病理診断ではパラフィン切片を用いた HE 染色並びに免疫染色標本を用いて行うことが原則であり、組織診断は WHO2008 年版で①卵円形の細胞で、核のクロマチンは繊細で、核形状がくびれている、溝がある、折り重なっている等の変形を示すランゲルハンス型組織球が証明できること②免疫染色により、上記の組織球で CD1a、あるいは Langerin(CD207)が陽性になること③上記①に示すランゲルハンス型組織球が証明できるが CD1a や CD207 の染色性が悪い場合は S100 染色陽性所見を診断根拠として採用する④電子顕微鏡観察では、Birbeck 顆粒が陽性になることが知られているため陽性所見が得られた場合は診断根拠としてよい、と定められている<sup>4)</sup>。

臨床経過は、治療せずとも自然消退することがある SS-s 型から、化学療法抵抗

性で急激に進行し致死的となることがある MS-RO(+)型まで、病型により大きく異なる<sup>2)</sup> (表 1)。シタラビンベースの日本 LCH 研究グループ (JLSG) の臨床研究 JLSG-96/02<sup>5-7)</sup>によって本邦 LCH の予後は目覚ましく改善したが、未だに再発は多く、再発例では特に中枢神経関連の非可逆的続発症が問題となる。発症後数年経て起こる中枢神経関連の非可逆的続発症には中枢性尿崩症 (CDI) や中枢神経変性症 (ND-CNS) などがあり、これらは中枢神経リスク病変 (眼窩、側頭骨、頭蓋底、顔面骨の骨病変) を伴う例で頻度が高く、再発例に比し少ないが初発例でも出現することがある。中枢性尿崩症は生涯にわたる抗利尿ホルモンの補充療法を必要とし、中枢神経変性症は LCH 診断後数年を経て脳 MRI 信号変化 ( T2 強調/FLAIR 画像での小脳の左右対称性の高信号病変) を示し、その後進行性、非可逆的に企図振戦、小脳失調、運動協調障害、集中力低下、知能低下などの精神神経症状が出現し最終的に重度の脳性麻痺となりそれぞれ患者の QOL を著しく損なう<sup>8)</sup>。

表 1 LCH の病型とその治療 (文献 2 より引用、改変)

病型	病変臓器	治療
<b>単一臓器 (single-system) 型</b>		
単独病変(SS-s)型	骨 1 か所のみ、 皮膚のみ、 リンパ節のみ等	中枢神経リスク部位* <sup>1</sup> でなければ無治療観察、または局所ステロイド。 中枢神経リスク部位なら 6-12 か月ビンカアルカロイド+ステロイドを含む化学療法
多発病変(SS-m)型	多発の骨病変	6-12 か月ビンカアルカロイド+ステロイドを含む化学療法
<b>多臓器 (multi-system) 型</b>		
リスク臓器* <sup>2</sup> 病変なし(MS-RO(-)型)	骨と皮膚など	12 か月の VCR/Ara-C/PSL を含む多剤併用化学療法。
リスク臓器* <sup>2</sup> 病変あり(MS-RO(+))型)	皮膚やリンパ節と肝臓、脾臓、骨髄など	治療不応の MS-RO(+))型は 2CdA/AraC の救援療法 and/or 造血幹細胞移植

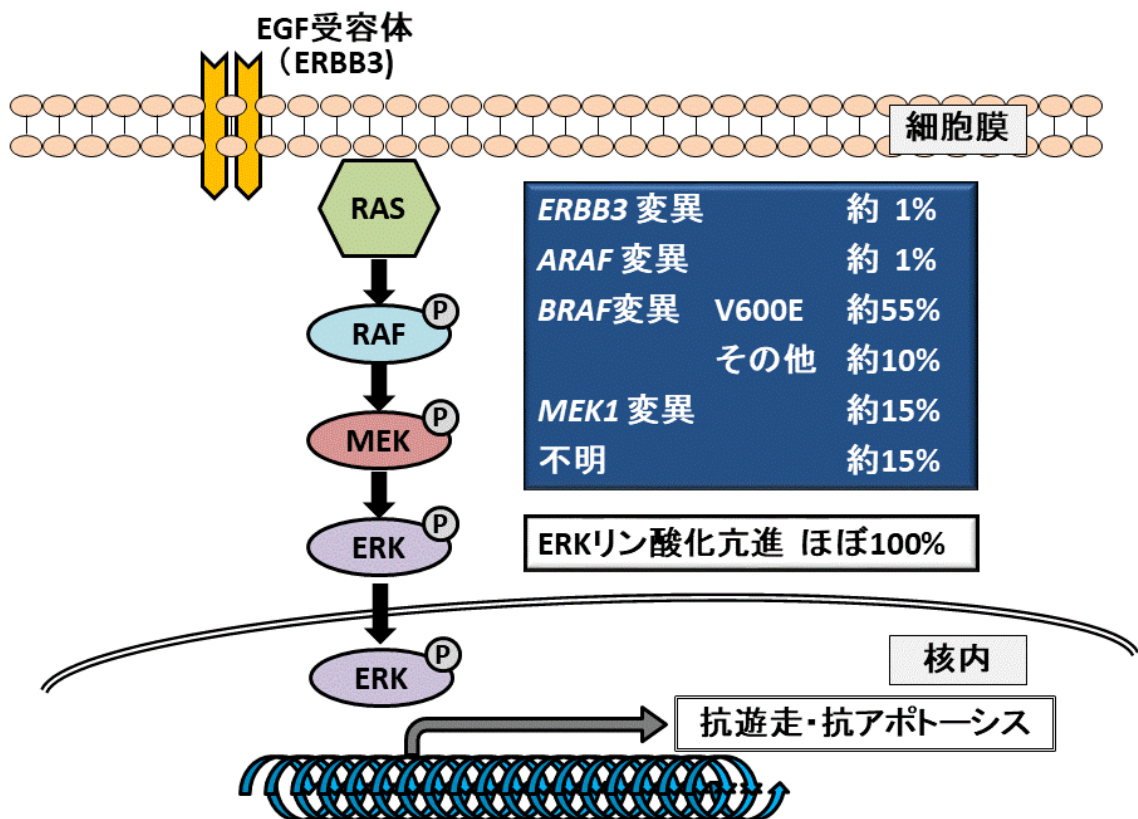
\*<sup>1</sup> 中枢神経リスク部位：眼窩、側頭骨、頭蓋底、顔面骨の骨病変

\*<sup>2</sup> リスク臓器：肝臓、脾臓、骨髄

LCH の発がん性体細胞変異として 2010 年に LCH 細胞に *BRAF* V600E 変異が同定された<sup>9)</sup>。それ以降、約 85%の症例に、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の遺伝子に相互排他的な活性型変異を認めることが報告されてきた<sup>10)</sup>。MAPK 経路は細胞増殖、成長、分化、生存を制御し、複雑な細胞間ネットワークを統合しその構成成分から RAS/RAF/MEK/ERK 経路とも呼ばれる。

図2 LCH細胞におけるMAPK経路の遺伝子変異（文献2から引用、改変）

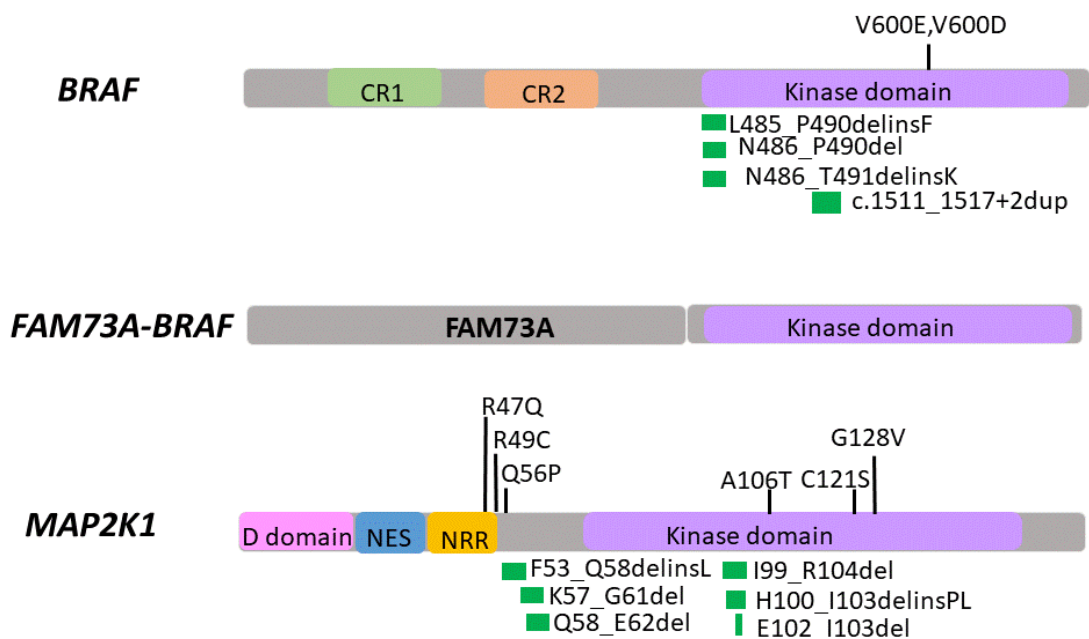
*BRAF*V600E変異が約55%、それ以外の*BRAF*変異を約10%に、*MEK1*をコードする*MAP2K1*遺伝子変異は約15%で認められる。頻度は少ないがEGF受容体をコードする*ERBB3*やRAF蛋白をコードする*ARAF*にも変異を認めることがある。ERKのリン酸化はほぼ100%の症例で亢進している。



LCHにおけるMAPK経路の遺伝子変異では、RAF蛋白のうち*BRAF*をコードする*BRAF*遺伝子のV600E変異が50-60%と最多であり<sup>11-13)</sup>、次いで*MEK1*をコードする*MAP2K1*遺伝子変異が20-30%を占める<sup>13-15)</sup>。また頻度は低いがV600E以外の*BRAF*変異や、EGF受容体をコードする*ERBB3*やRAF蛋白をコードする*ARAF*といったその他の変異も報告されている<sup>14,16-18)</sup> (図2)。

BRAF は ARAF、BRAF、CRAF と 3 つあるセリン/スレオニンキナーゼである RAF 蛋白の isoform の一つであり、1988 年に発見された<sup>19)</sup>。766 個のアミノ酸から成り Ras-GTP 結合ドメインとシステインリッチドメインを含む Conserved region (CR) 1 ドメイン、セリン/スレオニンリッチドメインの CR2 ドメイン、キナーゼドメインを持つ (図 3)<sup>20)21)</sup>。

図 3 LCH で報告された *BRAF* 及び *MAP2K1* 遺伝子変異



CR1, conserved region1; CR2, conserved region2 :D, docking; NES, nuclear export signal; NRR, negative regulatory region

がんにおいて検出される *RAF* 遺伝子異常はほとんどが *BRAF* の遺伝子異常である。*BRAF* 変異のほとんどはキナーゼドメインに発生し、特に *BRAF* 遺伝子変異の 80~90%を活性化ループの *BRAF* V600E 変異が占める。*BRAF*V600E 変異は疎水性のバリンが負の電荷を持つグルタミンに変化することで活性化ループを不活性化状態の DFG-out と呼ばれる構造から活性化状態の DFG-in という構造



に変化させることで直接的にキナーゼの恒常的活性化を引き起こし、さらに RAF 蛋白の二量体形成を安定化させ内在性キナーゼを活性化する<sup>20)</sup>。そのキナーゼ活性は野生型の 500 倍以上と非常に高く、腫瘍の増殖に大きくかかわる<sup>22)</sup>。*BRAF* 変異は悪性黒色腫、甲状腺がん、大腸がん、非小細胞肺がんなど LCH 以外の悪性腫瘍においても高頻度に認められる<sup>21,23)</sup>。本邦では *BRAF* 変異を標的とした分子標的薬として 2014 年以降ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブが悪性黒色腫や非小細胞肺がん、大腸がん承認されている。MEK は RAF の基質として 1992 年に複数のグループにより発見された<sup>22)</sup>。MEK1 は 393 個のアミノ酸から成り、3 つの機能を持つ N 末端、キナーゼドメイン、C 末端を持つ<sup>24)</sup>。通常 *BRAF* により活性化され、下流の ERK1 や ERK2 をリン酸化する<sup>15)</sup>。

*MAP2K1* 変異は *BRAF* 変異に比し低頻度であるが、悪性黒色腫、大腸がん、非小細胞肺がん、有毛細胞白血病などで認められ<sup>15)25)</sup>、ほとんどが制御領域 (NRR) またはキナーゼドメインの N 末端で発生する<sup>25)</sup>。本邦ではトラメチニブがダブラフェニブとの併用で悪性黒色腫及び非小細胞肺がん、ビニメチニブがエンコラフェニブとの併用で悪性黒色腫にそれぞれ承認されている(表 2)。

表 2 本邦で承認されている BRAF 阻害薬と MEK 阻害薬

一般名	商品名	用法	適応疾患
BRAF 阻害薬			
ベムラフェニブ	ゼルボラフ	単剤	<i>BRAF</i> 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫
ダブラフェニブ	タフィンラー	悪性黒色腫：単剤、ただし術後補助療法の場合トラメチニブと併用 非小細胞肺癌：トラメチニブと併用	<i>BRAF</i> 遺伝子変異を有する悪性黒色腫 <i>BRAF</i> 遺伝子変異を有する切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌
エンコラフェニブ	ビラフトビ	悪性黒色腫：ビニメチニブと併用 大腸がん：ビニメチニブ、セツキシマブ（抗 EGFR 抗体薬）と併用	<i>BRAF</i> 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫 がん化学療法後に増悪した <i>BRAF</i> 遺伝子変異を有する治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がん
MEK 阻害薬			
トラメチニブ	メキニスト	ダブラフェニブと併用	<i>BRAF</i> 遺伝子変異を有する悪性黒色腫 <i>BRAF</i> 遺伝子変異を有する切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌
ビニメチニブ	メクトビ	エンコラフェニブと併用	<i>BRAF</i> 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫

小児 LCH における *BRAFV600E* 変異と臨床像との関連は欧米から再発や初期治療不応性、若年での診断や重症病態（進行期、リスク臓器や皮膚浸潤、高い疾患活動スコア、中枢神経続発症）、再発などと関連することが報告されている<sup>11-13,26</sup>。(表 3) 難治性の LCH に対して BRAF 阻害薬を導入する試みはすでに海外から複数報告されており、従来のステロイド+ビンカアルカイドによる初期治療やクラドリビン療法に不応の LCH に対してもベムラフェニブの単剤療法は速やかに効果を示していた<sup>27-30</sup>。

また中枢神経変性症を伴う症例では 90%以上にこの変異を認めることが報告されており<sup>31,32</sup>、中枢神経変性症において脳内血管周囲の白質に浸潤している単球系細胞が *BRAFV600E* 変異陽性であることが示され、*BRAFV600E* 阻害薬で

あるベムラフェニブによって脳 MRI 所見や神経症状が改善する ND-CNS 例があることが報告された<sup>32)</sup>。

一方 *MAP2KI* 変異と臨床的特徴の関連についての報告は限られている<sup>14)</sup>。

表 3 *BRAFV600E* 変異と臨床像との関連

報告者、年	国	<i>BRAFV600E</i> 変異と関連する臨床的特徴
Berres, 2014 <sup>11)</sup>	アメリカ	初期治療不応性 再発
Héritier, 2016 <sup>12)</sup>	フランス	若年での診断 重症病態（進行期、リスク臓器や皮膚浸潤、 高い疾患活動スコア、中枢神経続発症） 再発
Nann, 2019 <sup>13)</sup> Ozer, 2019 <sup>26)</sup>	ドイツ トルコ	低い診断時年齢 皮膚浸潤 再発

本邦では、小児 LCH における遺伝子変異についての報告は現在までに 2 つのみである。*BRAF V600E* 変異の頻度は、低感度の解析法の報告で 16 例中 4 例 (25%)<sup>33)</sup>、高感度の解析法の報告で 32 例中 19 例 (59%)<sup>34)</sup>とされている。(表 4)一方、成人 LCH においては、血漿中遊離 DNA における *BRAF V600E* 変異解析の 8 例の報告<sup>35)</sup>があるのみである。*MAP2KI* 変異についての報告はされていない。また、遺伝子変異と臨床的特徴との関連についての検討もなされていない。

表 4 本邦 LCH における *BRAF* V600E 解析の報告

報告者、年	Tatsuno, 2016	Sasaki, 2017
検体数	32	19
解析方法	一次 PCR 産物を制限酵素消化、二次 PCR 産物をダイレクトシーケンス	ダイレクトシーケンス
検出下限	2.5%	記載なし
<b><i>BRAF</i>V600E 変異頻度</b>	17/32(53%)	4/19(21%)

本研究では本邦 LCH において体細胞遺伝子変異の頻度を明らかにし、その遺伝子変異と臨床的特徴との関連を明らかにすることを目的とした。まず 59 例の本邦 LCH 患者の生検組織を用いて *BRAF*V600E 変異について高感度アレル特異的リアルタイム PCR 法により解析し、*BRAF* V600E 変異陰性であった例のうち新鮮凍結組織が得られた 17 例について次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンス解析により *MAP2K1* および *BRAF* 遺伝子の変異解析を行った。次世代シーケンサーを用いた解析＝次世代シーケンス解析は従来の遺伝子解析手法である Sanger 法やアレイベースの手法に比べ高速で大量のゲノム情報を解析可能で、低頻度の遺伝子変異も高い感度で検出でき、同じ量の DNA でより多くのデータを得ることができる解析手法である。また 50 例の小児患者について遺伝子変異と臨床的特徴の関連について統計学的に検討した。

## 2. 方法

### 2.1. 対象と検体

1993年から2019年に本邦の研究参加施設（表5）において診断されたLCHのうち、遺伝子解析研究の同意が得られた59例を対象症例とし、生検検体および臨床情報を取得した。

表5 研究参加施設一覧

地域	施設
関東	神奈川県立こども医療センター 群馬大学医学部附属病院 自治医科大学附属病院 成育医療研究センター
中部	静岡県立こども病院 聖隷浜松病院
近畿	宇治徳洲会病院 北野病院 京都府立医科大学附属病院 和歌山赤十字病院
九州・沖縄	豊見城中央病院

臨床情報は診断年齢、性別、病型、治療、初期治療反応性、再発、中枢性尿崩症および神経変性症の中枢神経合併症について取得した。病型はSS型、MS-RO(-)型、MS-RO(+)型に分類した。リスク臓器は骨髄、肝、脾と定義した。

診断時の新鮮凍結（Fresh Frozen, FF）検体は34例で取得、残り25例からはホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE）検体を取得した。ゲノムDNAの抽出はFF検体にはQIAamp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, USA)を、FFPE検体はQIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Valencia, USA)を用い

た。抽出したゲノム DNA は Qubit dsDNA BR assay kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) を用いて定量した。

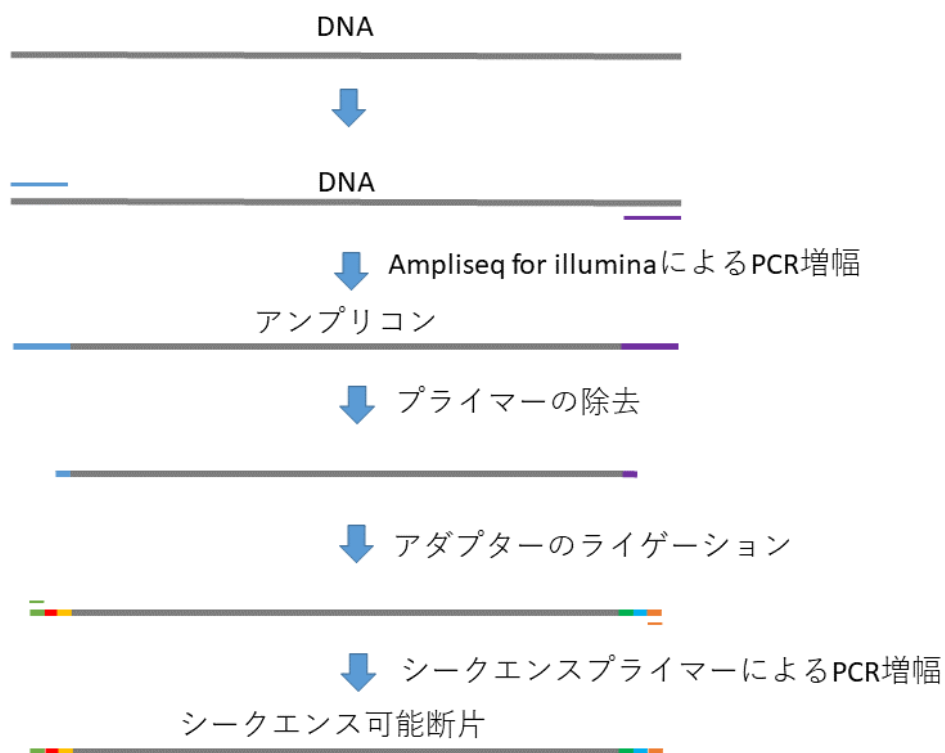
## 2.2. *BRAF* V600E 変異解析

59 例の *BRAF* V600E 変異についてアレル特異的リアルタイム PCR キット (*BRAF* Mutation Analysis Kit for Real-Time PCR, Entrogen, Woodland hills, USA) を使用し解析した。キットの検出感度は変異アレル 1%とされている<sup>36)</sup>。解析はプロトコールに従い 20ng のゲノム DNA を用いた。変異解析は陽性コントロール、陰性コントロールを同時に行い偽陽性、偽陰性の有無の確認を行った。

## 2.3. ターゲットシーケンス解析

*BRAF* V600E 変異陰性 32 例中、FF 検体が取得できた 17 例について、*BRAF* および *MAP2K1* (exon2,3)のターゲットシーケンスを行い、V600E 以外の *BRAF* 変異および *MAP2K1* 変異について解析した。17 例中 9 例は LCH 病変検体と末梢血正常検体とのペア検体で解析し、残り 8 例については LCH 病変検体のみで解析を行った。解析ではゲノム DNA 20 ng を独自にオーダーメイドしたアンプリコンシーケンスライブラリー Ampliseq for Illumina, On-Demand, Custom and Community Panels (Illumina, San Diego, CA)を用いてライブラリー調整し(図 4)、イルミナ Miseq シーケンサーでシーケンスした。

図 4 Ampliseq for Illumina を用いたライブラリー調整



データ解析は東京大学ヒトゲノムセンターのパイプライン Genomon2 (<https://genomon.readthedocs.io/ja/latest/index.html>)を用いた。変異検出のため LCH 病変と正常検体（末梢血）のペア検体が取得可能であった 9 例では LCH 病変検体と正常検体で参照アレルと変異アレルの割合を Fisher の正確検定により検定し<sup>37)</sup>、LCH 病変検体のみ取得可能であった 8 例では 15 例の正常検体によるコントロールパネルを正常コントロールとして用いた Empirical Bayesian mutation Call (EBcall)を用いた<sup>38)</sup>。検出された変異は ANNOVAR (v2018Apr16)<sup>39)</sup>を用いてアノテーションを行った。

体細胞変異かどうかの評価は既報の方法<sup>40,41)</sup>を一部修正した方法で行った(図5)。すなわち、検出された変異のうち、以下の変異はフィルターし除外した：(1) synonymous 変異、(2) エクソン変異またはスプライシングサイト変異以外の変異、(3) 1000 ゲノムプロジェクトおよび NCBI SNP database で既知の変異、(4) SIFT score $\geq 0.05$  または Polyphen2 score $\leq 0.446$  の変異。次に残った変異について、以下の変異をフィルターし選出した：(1) 変異アレル頻度 (Variant allele frequency, VAF) が LCH 病変検体で $\geq 1\%$ の変異、(2) VAF が LCH 病変検体>正常検体の変異、(3) LCH 病変での read depth $\geq 500$  の変異、(4) LCH 病変での変異リード $\geq 5$  の変異、(5) 正常検体の VAF $<0.25\%$ の変異、(6) Fisher の正確検定または EBcall で  $p\leq 0.0001$  の変異。さらに Integrative Genomic Viewer (IGV2.4)を用いて LCH で既知の変異部位を全て目視で確認した。

## 2.4. 統計解析

変異の有無と臨床的特徴との関連については、成人群は症例数が少ないため、小児群についてのみ解析を行った。量的変数については Mann-Whitney の U 検定を、質的変数については Fisher の正確検定を用いた。また治療不応および再発、死亡をイベントとし、Kaplan-Meier 法により推定した *BRAF*V600E 変異の有無による累積イベント発生率の差を log-rank 検定で評価した。 $p<0.05$  を有意とした。



図5 データ解析における変異検出の流れ



EBCall, Empirical Bayesian mutation Call; VAF, Variant allele frequency; IGV, Integrative Genome Viewer

### 3. 結果

#### 3.1. 患者背景

対象患者背景と臨床情報、および *BRAFV600E* 変異解析結果を表 6 に示した。59 例のうち、50 例が小児（18 歳未満で診断）、9 例が成人であった。診断時年齢は小児群で中央値 2.9 歳（範囲 0.3-17.0 歳）、成人群で中央値 40.8 歳（範囲 19.0-67.1 歳）であった。病型は、小児群では SS 型 25 例(50%)、MS-RO(-)型 17 例(34%)、MS-RO(+型 8 例(16%)、成人群では SS 型 5 例(56%)、MS-RO(-)型 3 例(33%)、MS-RO(+型 1 例(11%)であった。

ほとんどの症例が全身化学療法で治療をされていた。小児 SS 型 25 例のうち 19 例（76%）が、日本 LCH 研究グループ（JLSG）の臨床試験プロトコール<sup>5-7)</sup>（n=10）またはその他（n=9）のレジメンで全身化学療法を受けていた。小児 MS 型 25 例全例が、JLSG の臨床試験プロトコール<sup>5-7)</sup>（n=21）またはその他（n=4）のレジメンで全身化学療法を受けていた。成人群では SS 型患者 5 例中 3 例、MS 型 4 例中 3 例が全身化学療法を受けていた。

観察期間中央値は小児群 7.9 年（範囲 0.1-25.4 年）、成人群 3.6 年（範囲 2.0-9.2 年）であった。中枢神経関連合併症を、小児群では 50 例中 6 例（中枢性尿崩症 5 例、神経変性症 1 例）、成人群では 9 例中 5 例（中枢性尿崩症 5 例）に認めた。死亡例はなかった。

表 6 対象患者背景、*BRAF* V600E 変異解析結果

背景	< 18 歳 (n = 50)	> 18 歳 (n = 9)
診断時年齢中央値 (範囲), 歳	2.9 (0.3–17.0)	40.8 (19.0–67.1)
性別, N (%)		
男性	31 (62)	3 (33)
女性	19 (38)	6 (67)
病型, N (%)		
SS	25 (50)	5 (56)
MS-RO(-)	17 (34)	3 (33)
MS-RO(+)	8 (16)	1 (11)
皮膚病変, N (%)		
有り	9 (18)	2 (22)
無し	41 (82)	7 (78)
初期治療, N		
SS		
JLSG プロトコール	10	1
その他の全身化学療法	9	2
全身化学療法なし	6	2
MS		
JLSG プロトコール	21	0
その他の全身化学療法	4	3
全身化学療法なし	0	1
中枢神経合併症, N		
中枢性尿崩症	5	5
神経変性症	1	0
全て	6	5
<i>BRAF</i> V600E, N (%)		
陽性	24 (48)	3 (33)
陰性	26 (52)	6 (67)
死亡	0	0
追跡期間, 中央値 (範囲)	7.9 (0.1–25.4)	3.6 (2.0–9.2)

SS, 単一臓器型; MS-RO(-), 多臓器型リスク臓器病変なし; MS-RO(+), 多臓器型リスク臓器病変あり; JLSG, 日本 LCH 研究グループ

### 3.2. *BRAF* V600E 変異解析結果

*BRAF* V600E 変異は全体で 59 例中 27 例 (46%)、小児群で 50 例中 24 例 (48%)、成人群で 9 例中 3 例 (33%) に認めた。*BRAF* V600E 変異陽性率は FF 検体と FFPE 検体で有意な差を認めなかった (13/34 (38%) vs. 14/25 (56%),  $p=0.197$ )。

### 3.3. *BRAF* V600E 変異陰性症例における体細胞遺伝子変異

ターゲットシーケンスを用いた *BRAF* V600E 変異陰性例の体細胞変異解析結果を表 7 に示した。*BRAF* V600E 変異陰性例 32 例のうち新鮮凍結検体が取得できた 17 例について解析した。17 例中 14 例で *BRAF* V600E 変異以外の変異が同定された。そのうち 3 例は *BRAF* exon12 の in-frame 欠失 (p.486\_491del)、2 例は *BRAF* exon12 の N 末端部スプライシング変異 (c.1511\_1517+2dup) であった (症例 1-5)。 *MAP2K1* exon2 の in-frame 欠失 (p.56\_60del, p56\_61del, p57\_62del, p58\_62del) が 7 例と最も高頻度に見られた (症例 6-12)。また *MAP2K1* exon3 の変異が 2 例で見られ、1 例は 2 か所の点変異 (p.E102V, p.I103N)、もう 1 例は in-frame 欠失であった (症例 13, 14)。残り 3 例は *BRAF* および *MAP2K1* に変異は検出できなかった。

### 3.4. 本邦 LCH における *BRAF* および *MAP2K1* 変異の頻度

本邦 LCH における体細胞変異は *BRAF* V600E 変異が、27/59 (46%) と最も高頻度であった。また、*BRAF* V600E 変異陰性例 17 例のうち、5 例で V600E 以外の *BRAF* 変異が、9 例で *MAP2K1* 変異がそれぞれ見つかった (図 6、表 7)。リアルタイム PCR 法による *BRAF* V600E 変異解析、ターゲットシーケンスによる *BRAF* および *MAP2K1* 変異解析の両者を行った症例の 41/44 (93%) で、*BRAF* または *MAP2K1* 遺伝子に変異が同定された。

表7 BRAF V600E 変異陰性例における BRAF 変異と MAP2K1 変異

症例	年齢 (歳)	病型	変異	変異種類	VAF (%)	変異部位の 総リード数
1	9.6	MS-RO(-)	<i>BRAF</i> p.486_491del	<i>BRAF</i> Ex12 indel	7.0	15888
2	12.6	MS-RO(-)	<i>BRAF</i> p.486_491del	<i>BRAF</i> Ex12 indel	20.0	10317
3	17.0	MS-RO(-)	<i>BRAF</i> p.486_491del	<i>BRAF</i> Ex12 indel	10.1	19736
4	1.0	SS	<i>BRAF</i> c.1511_1517+2dup	<i>BRAF</i> Ex12 SpM	4.2	29400
5	14.1	SS	<i>BRAF</i> c.1511_1517+2dup	<i>BRAF</i> Ex12 SpM	2.4	19507
6	0.4	MS- RO(+)	<i>MAP2K1</i> p.57_62del	<i>MAP2K1</i> Ex2 indel	7.9	3151
7	1.1	MS- RO(+)	<i>MAP2K1</i> p.56_61del	<i>MAP2K1</i> Ex2 indel	11.6	6076
8	1.4	MS- RO(+)	<i>MAP2K1</i> p.56_60del	<i>MAP2K1</i> Ex2 indel	6.7	2010
9	2.1	MS- RO(+)	<i>MAP2K1</i> p.56_61del	<i>MAP2K1</i> Ex2 indel	14.2	3001
10	3.2	MS-RO(-)	<i>MAP2K1</i> p.56_61del	<i>MAP2K1</i> Ex2 indel	16.5	2554
11	6.4	SS	<i>MAP2K1</i> p.58_62del	<i>MAP2K1</i> Ex2 indel	1.4	3830
12	44	SS	<i>MAP2K1</i> p.56_61del	<i>MAP2K1</i> Ex2 indel	1.6	3702
13	12.9	SS	<i>MAP2K1</i> p.E102V <i>MAP2K1</i> p.I103N	<i>MAP2K1</i> Ex3 MM	8.4 8.3	4176 4174
14	3.4	SS	<i>MAP2K1</i> p.105_107del	<i>MAP2K1</i> Ex3 indel	15.4	3962
15	1.5	MS- RO(+)	NM	-	-	-
16	2.2	SS	NM	-	-	-
17	12.8	SS	NM	-	-	-

SS, 単一臓器型; MS-RO(-), 多臓器型リスク臓器病変なし; MS-RO(+), 多臓器型リスク臓器病変あり; NM, 変異無し; Ex, エクソン; indel, in-frame 欠失; MM, ミスセンス変異; SpM, スプライシング変異; VAF, 変異アレル頻度

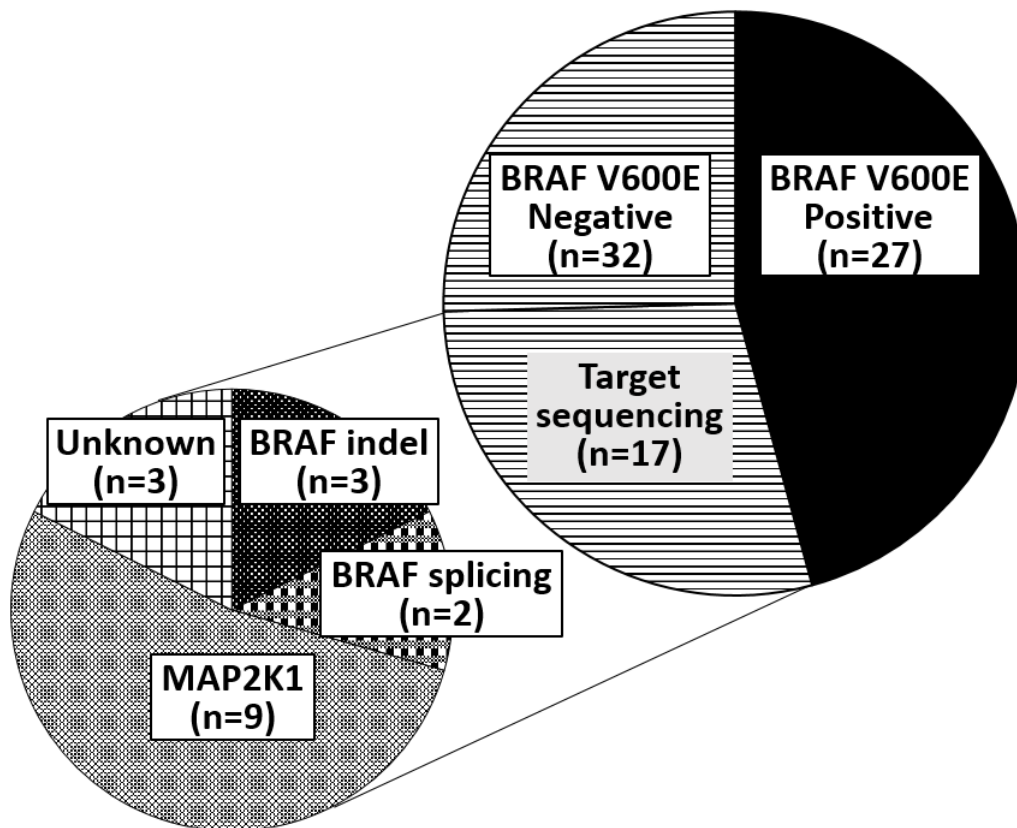


図 6 本邦 LCH における *BRAF* 変異と *MAP2K1* 変異の割合

本邦 LCH において *BRAF*V600E 変異は 46% に認められた。*BRAF* V600E 変異陰性例のうち 53% に *MAP2K1* 変異があり、29% に V600E 変異以外の *BRAF* 変異を認めた。  
*BRAF* indel, *BRAF* exon 12 の in-frame 欠失; *BRAF* splicing, *BRAF* exon12 の N 末端部スプライシング変異

### 3.5 小児 LCH における遺伝子変異と臨床的特徴との関連

小児 LCH 50 例において、*BRAF* V600E 変異は、皮膚病変を伴う症例に多い傾向があったが有意差はなく、性別、診断年齢、病型、初期治療抵抗性、再発、中枢神経関連合併症のいずれとも関連を認めなかった (表 8)。Kaplan-Meier 法による累積イベント発生率は *BRAF* V600E 変異の有無で差は認めなかった (図 7)。

表 8 本邦 LCH における *BRAF*V600E 変異と臨床的特徴との関連

臨床的特徴	全体 (n = 50)	<i>BRAF</i> V600E		p 値
		陽性 (n = 24)	陰性 (n = 26)	
性別				
男	31	16	15	0.571
女	19	8	11	
診断時年齢, 中央値 (範囲)		2.5 y (0.3–14.0)	4.2 y (0.4–17.0)	0.103
< 2 歳	15	8	7	0.760
> 2 歳	35	16	19	
病型				
SS	25	12	13	0.865
MS-RO(-)	17	9	8	
MS-RO(+)	8	3	5	
皮膚病変				
あり	9	7	2	0.069
なし	41	17	24	
初期治療不応				
あり	3	2	1	0.599
なし	41	19	22	
(全身化学療法なし)	6	3	3	
再発				
全員				
あり	16	8	8	1.000
なし	34	16	18	
全身化学療法あり				
Yes	13	7	6	0.744
No	31	14	17	
全身化学療法なし				
Yes	3	1	2	1.000
No	3	2	1	
中枢神経合併症 *1				
あり	6	3	3	1.000
なし	44	21	3	
追跡期間, 中央値 (範囲)	7.9y (0.1–25.4)	7.5 y(0.1–17.8)	8.2y (0.1–25.4)	0.629

\*1 中枢性尿崩症または神経変性症

SS, 単一臓器型; MS-RO(-), 多臓器型リスク臓器病変なし; MS-RO(+), 多臓器型リスク臓器病変あり; JLSG, 日本 LCH 研究グループ

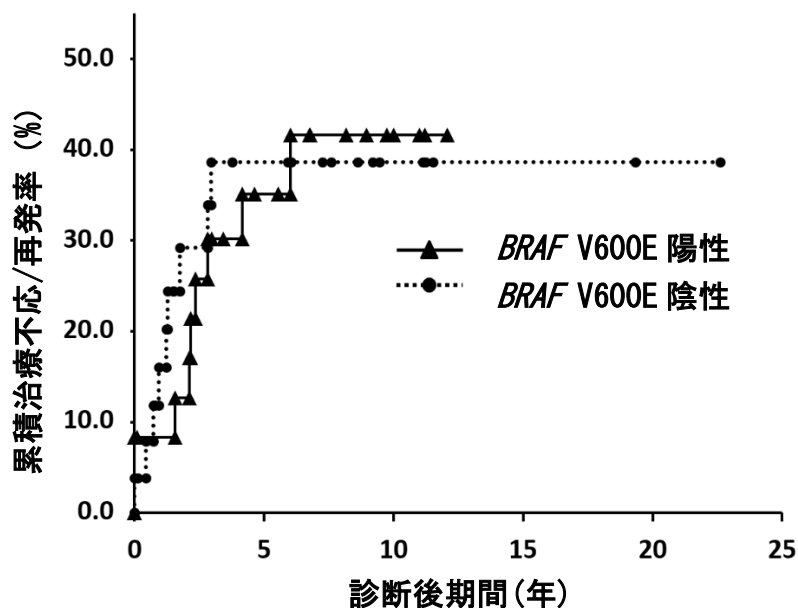


図 7 本邦小児 LCH における *BRAF* V600E 変異の有無別に見た累積イベント (治療不応および再発)

累積イベント (治療不応および再発) は *BRAF* V600E 変異陽性群(n=24)と *BRAF* V600E 変異陰性群(n=26)で差を認めなかった。[35.2% (95% CI,15.4-54.9) vs. 38.6% (95%CI, 18.6-58.6),  $p=0.870$ ] log-rank 検定による。

一方 *MAP2K1* exon2 in-frame 欠失変異を認めた小児 LCH の 6 例中 4 例は MS-RO(+)型であり、少数例の解析であるが、*MAP2K1* exon2 in-frame 欠失例はリスク臓器浸潤が有意に多かった ( $p=0.013$ ) (表 9)。また、性別、診断時年齢、治療抵抗性、再発、中枢神経続発症は *MAP2K1* 変異との関連を認めなかった。

表 9 本邦小児 LCH における遺伝子変異とリスク臓器浸潤の関連(n=40<sup>\*1</sup>)

	<i>BRAF</i> V600E (n=24)	<i>MAP2K1</i> Ex2 indel (n=6)	その他 <sup>*2</sup> (n=10)	<i>p</i> 値
MS-RO(+)	3	4	1	0.013
MS-RO(-) or SS	21	2	9	

\*1 リアルタイム PCR 法で *BRAF* V600E 変異陽性、および、*BRAF* V600E 変異陰性でターゲットシーケンス解析を行った症例 \*2 *BRAF*V600E 変異陰性かつ *MAP2K1*indel 陰性 MS-RO(-), 多臓器型リスク臓器病変なし; MS-RO(+), 多臓器型リスク臓器病変あり; SS, 単一臓器型; Ex2 indel, エクソン 2 in-frame 欠失



#### 4. 考察

本研究では、本邦 LCH 症例 59 例にリアルタイム PCR 法による *BRAF* V600 変異解析、ターゲットシーケンスによる *BRAF* および *MAP2K1* 変異解析を行った。*BRAF* V600E 変異を 27 例で認め、解析が可能であった *BRAF* V600E 変異陰性症例 17 例のうち 14 例に V600E 変異以外の *BRAF* 変異または *MAP2K1* 変異を認めた。リアルタイム PCR による *BRAF* V600E 変異解析およびターゲットシーケンスによる *BRAF* と *MAP2K1* (exon 2, 3) の変異解析の両者が可能であった、44 例中 41 例 (93%) に体細胞変異を認めたことになり、本邦における LCH の約 90% は *BRAF* または *MAP2K1* 遺伝子に変異を有していると推測された。本研究で明らかとなった本邦 LCH における *BRAF* V600E 変異の頻度 (27/59, 46%) は、欧米諸国での大規模な研究による頻度 (小児で 54.6% (n=315)<sup>12)</sup>、62.9% (n=97)<sup>11)</sup>、成人で 47.0% (n=132)<sup>42)</sup> と矛盾しなかった。

*BRAF* V600E 変異と臨床的特徴との関連について米国からは小児 LCH において再発や初期治療不応性と関連すると報告されており<sup>11)</sup>、フランスからは若年での診断や重症病態 (進行期、リスク臓器や皮膚浸潤、高い疾患活動スコア、中枢神経続発症)、再発との関連が報告されている<sup>12)</sup>。またドイツ<sup>13)</sup>やトルコ<sup>26)</sup>からも、低い診断時年齢や皮膚浸潤、再発との関連が報告されている。本研究では小児 LCH コホートにおいて *BRAF* V600E 変異陽性例における皮膚浸潤の頻度は比較的高頻度であったものの有意ではなく、欧米からの報告とは異なり *BRAF* V600E 変異と重症病態や不良な予後との関連は見られなかった<sup>11-13,26)</sup>。その理由として、欧米人とアジア人での遺伝学的背景の違いや用いている治療レジメンの違い<sup>5-7,43)</sup>による影響が考えられる。特に治療については本邦の LCH 治療レジメンは欧米での基本治療であるステロイドとビンカルカロイド<sup>44)</sup>とともにシタラビンが基本薬剤として使用され<sup>45)</sup>、治療が強化されており (図 8) 良好な治療成績が報告されている<sup>5,6)</sup>。シタラビンによる治療強化が *BRAF* V600E 変異の予後不良因子を打ち消した可能性がある。しかし、本研究では症例数が十分ではないため、本邦 LCH における *BRAF* V600E 変異の意義については大規模な研究による検討が必要である。

図 8 本邦と欧米での LCH 治療の違い

●本邦での寛解導入療法 JLSG-02<sup>45)</sup>

Week	1	2	3	4	5	6
Cytarabine 100mg/m <sup>2</sup>	●●●●●		●●●●●		●●●●●	
Vincristine 1.5mg/m <sup>2</sup>	↓		↓		↓	
Prednisolone	40mg/m <sup>2</sup> /day				20mg/m <sup>2</sup> /day	
						10mg/m <sup>2</sup> /day

●欧米での寛解導入療法 LCH-III<sup>44)</sup>

Week	1	2	3	4	5	6
Vinblastine 6mg/m <sup>2</sup>	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Prednisolone	40mg/m <sup>2</sup> /day				20mg/m <sup>2</sup> /day	
						10mg/m <sup>2</sup> /day

本研究では *BRAF* V600E 変異以外に、3 例に *BRAF* exon12 の in-frame 欠失 (p.486\_491del)、2 例に *BRAF* exon12 の N 末端部スプライシング変異 (c.1511\_1517+2dup) を認めた。両変異ともキナーゼドメインに位置する既知の変異であるが、報告はそれぞれ 2 例<sup>17)</sup>、6 例と<sup>16)</sup>少数例のみであった。既報では exon12 の N 末端部スプライシング変異を認めた 2 例はそれぞれ骨病変のみの SS-s 型と SS-m 型で、いずれも無治療経過観察ののち SS-m 型のみ再発していた<sup>17)</sup>。また exon12 の in-frame 欠失については MS-RO(-)型が 4 例、SS-s 型が 2 例で<sup>16)</sup>リスク臓器浸潤は認めていない。ごく少数例での検討であるためこれらの変異の臨床的意義については現時点では明らかではなく、更なる症例の蓄積が必要

である。

*MAP2K1* 変異は 9 例で認めた。7 例は exon2 の in-frame 欠失 (p.56\_60del, p56\_61del, p57\_62del, p58\_62del) で、いずれも COSMIC データベース<sup>46)</sup>に未掲載であった。しかし 5 例は既知変異で、2 例が新規変異 (p.56\_60del, p57\_62del) であった。2 つの新規変異は、発現制御領域にあり、同領域の類似した in-frame 欠失変異は既に LCH において報告されていた<sup>13-15,47)</sup>。残る 2 例は *MAP2K1* exon3 の変異で、1 例では 2 か所の点変異 (p.E102V, p.I103N) を同時に有し、もう 1 例では in-frame 欠失 (p.105\_107del) であった。p.I103N は有毛細胞白血病で報告されている変異<sup>46)</sup>であったが、残る 2 つの変異 (p.E102V および p.105\_107del) は新規変異であった。しかし、これらの変異は触媒ドメイン(キナーゼドメイン)に存在し、この領域の変異は既に LCH で報告されている<sup>13-15,45-49)</sup>。また *MAP2K1* 変異と臨床的特徴の関連については、本研究の小児群での検討で *MAP2K1* exon2 in-frame 欠失がリスク臓器浸潤と関連していたが、症例数が十分ではないため、更なる検討が必要である。

前述したように本邦では既に BRAF 阻害薬、および MEK 阻害薬が悪性黒色腫などの悪性腫瘍に対して承認されている。欧米からは、*BRAF* V600E 変異陽性の難治性の LCH 症例に対し BRAF 阻害薬が奏功したという報告もあり<sup>27-30)</sup>、LCH を含む小児がん患者に対する BRAF 阻害薬や MEK 阻害薬の臨床試験も複数進行中である<sup>50)</sup>。本邦における LCH の約 90%は *BRAF* または *MAP2K1* 遺伝子に変異を有していると推測される本研究結果は、BRAF 阻害薬や MEK 阻害薬が本邦 LCH 患者においてもほとんどの症例において有用であることを示唆するものであり、今後本邦においても、LCH の難治例のみならず初発例に対しても分子標的薬を用いたより良い治療を実現する足掛かりとなると考えられた。

## 5. 結論

本邦 LCH の体細胞変異解析は今まで少数例でしか行われていなかった。本研究では 59 例の本邦 LCH を解析し 90%以上の頻度で *BRAF* または *MAP2K1* 遺伝子の変異を有していると推測された。一方、小児の検討では *BRAF* V600E 変異はリスク臓器浸潤、再発、治療抵抗性などに関連を認めず、欧米からの既報とは異なった結果となった。

また *MAP2K1* exon2 in-frame 欠失は現在までに病型など臨床的特徴との関連は報告されていないが、本研究ではリスク臓器浸潤と関連している可能性が示唆された。

本研究結果から *BRAF* 阻害薬や *MEK* 阻害薬が本邦 LCH 患者においてもほとんどの症例で有用であることを示唆され、今後本邦においても、LCH の難治例のみならず初発例に対しても分子標的薬を用いる足掛かりになると考えられた。

今後、更に症例数を増やして、本邦の LCH における *BRAF* および *MAP2K1* 遺伝子変異と臨床的特徴との関連を解析することにより、治療の層別化や分子標的薬を含めた最適な治療選択が可能となり、更なる予後や QOL の改善につながる可能性がある。本研究結果が、今後のより良い LCH の治療法開発に発展していくことを期待したい。

## 6. 参考文献

1. Berres ML, Allen CE, Merad M. Pathological consequence of misguided dendritic cell differentiation in histiocytic diseases. *Adv Immunol* 2013; 120:127-161
2. Morimoto A, Oh Y, Shioda Y, Kudo K, Imamura T. Recent advances in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Int* 2014; 56:451-61.
3. 石井栄一. 10. 組織球症. 特定非営利活動法人 日本小児血液・がん学会. 小児血液・腫瘍学. 東京: 診断と治療社. 2015. 507-513.
4. WHO classification of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues, fourth edition. ed. by Swerdlow, S, Campo, E, Harris, N.L, Jaffe, E.S, Pileri, S.A, Stein, H, Thiele, J, Vardiman, J.W. IARC, 2008.
5. Morimoto A, Ikushima S, Kinugawa N, Ishii E, Kohdera U, Sako M, Fujimoto J, Bessho F, Horibe K, Tsunematsu Y, Imashuku S. Improved outcome in the treatment of pediatric multifocal Langerhans cell histiocytosis: Results from the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 protocol study. *Cancer* 2006; 107: 613-619
6. Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Kudo K, Kawaguchi H, Sakashita K, Yasui M, Koga Y, Kobayashi R, Ishii E, Fujimoto J, Horibe K, Bessho F, Tsunematsu Y, Imashuku S. Intensified and prolonged therapy comprising cytarabine, vincristine and prednisolone improves outcome in patients with multisystem Langerhans cell histiocytosis: results of the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-02 Protocol Study. *Int J Hematol* 2016; 104: 99-109
7. Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Kudo K, Kitoh T, Kawaguchi H, Goto H, Kosaka Y, Tsunematsu Y, Imashuku S. Intensification of induction therapy and prolongation of maintenance therapy did not improve the outcome of pediatric Langerhans cell histiocytosis with single-system multifocal bone lesions: results of the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-02 Protocol Study. *Int J Hematol*. 2018; 108:192-8.
8. 森本哲. 4. ランゲルハンス細胞組織球症 (LCH). 小児科. 2019; 60:1037-1044.

9. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, Kuo FC, Ligon AH, Stevenson KE, Kehoe SM, Garraway LA, Hahn WC, Meyerson M, Fleming MD, Rollins BJ. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2010; 116:1919–23.
10. Allen CE, Merad M, McClain KL. Langerhans-cell histiocytosis. *N Engl J Med*. 2018; 379:856–68.
11. Berrres ML, Lim KP, Peters T, Price J, Takizawa H, Salmon H, Idoyaga J, Ruza A, Lupo PJ, Hicks MJ, Shih A, Simko SJ, Abhyankar H, Chakraborty R, Leboueuf M, Beltrão M, Lira SA, Heym KM, Clausen BE, Bigley V, Collins M, Manz MG, McClain K, Merad M, Allen CE. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J Exp Med*. 2014; 211:669–83.
12. Héritier S, Emile JF, Barkaoui MA, Thomas C, Fraitag S, Boudjemaa S, Renaud F, Moreau A, Peuchmaur M, Chassagne-Clément C, Dijoud F, Rigau V, Moshous D, Lambilliotte A, Mazingue F, Kebaili K, Miron J, Jeziorski E, Plat G, Aladjidi N, Ferster A, Pacquement H, Galambrun C, Brugières L, Leverger G, Mansuy L, Paillard C, Deville A, Armari-Alla C, Lutun A, Gillibert-Yvert M, Stephan J, Cohen-Aubart F, Haroche J, Pellier I, Millot F, Lescoeur F, Gandemer V, Bodemer C, Lacave R, Hélias-Rodzewicz Z, Taly V, Geissmann F, Donadieu J. BRAF mutation correlates with high-risk langerhans cell histiocytosis and increased resistance to first-line therapy. *J Clin Oncol*. 2016; 34:3023–30.
13. Nann D, Schneckenburger P, Steinhilber J, Metzler G, Beschorner R, Schwarze CP, Lang P, Handgretinger R, Fend F, Ebinger M, Bonzheim I. Pediatric Langerhans cell histiocytosis: the impact of mutational profile on clinical progression and late sequelae. *Ann Hematol*. 2019; 98:1617–26.
14. Chakraborty R, Hampton OA, Shen X, Simko SJ, Shih A, Abhyankar H, Lim KP, Covington KR, Trevino L, Dewal N, Muzny DM, Doddapaneni H, Hu J, Wang L, Lupo PJ, Hicks MJ, Bonilla DL, Dwyer KC, Berres ML, Poulikakos PI, Merad M, McClain KL, Wheeler DA, Allen CE, Parsons DW. Mutually exclusive recurrent somatic mutations in MAP2K1 and BRAF support a central role for ERK activation in LCH pathogenesis. *Blood*. 2014; 124:3007–155.
15. Brown NA, Furtado LV, Betz BL, Kiel MJ, Weigelin HC, Lim MS, Elenitoba-Johnson

- KS. High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E-negative Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2014; 124:1655–8.
16. Chakraborty R, Burke TM, Hampton OA, Zinn DJ, Lim KP, Abhyankar H, Scull B, Kumar V, kakkar N, Wheeler DA, Roy A, Poulikakos PI, Merad M, McClain KL, Parsons DW, Allen CE. Alternative genetic mechanisms of BRAF activation in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2016; 128:2533–7.
17. Héritier S, Hélias-Rodzewicz Z, Chakraborty R, Sengal AG, Bellanné-Chantelot C, Thomas C, Moreau A, Fraitag S, Allen CE, Donadieu J, Emile JF. New somatic BRAF splicing mutation in Langerhans cell histiocytosis. *Mol Cancer*. 2017; 16:115.
18. Nelson DS, Quispel W, Badalian-Very G, van halteran AG, van den Bos C, Bovée JV, Tian SY, Van Hummelen P, Ducar M, MacConail LE, Egeler RM, Rollins BJ. Somatic activating ARAF Mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 2014; 123: 3152-3155
19. Ikawa S, Fukui M, Ueyama Y, Tamaoki N, Yamamoto T, Toshiyoshi K. B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 2651-2654
20. Zhao K, Zhou X, Ding M. Molecular insight into mutation-induced conformational change in metastatic bowel cancer BRAF kinase domain and its implications for selective inhibitor design. *J Mol Graph Modell*. 2018; 79: 59-64
21. Roskoski R Jr. Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol Res*. 2018; 135:239-258
22. 林秀幸. KRAS/BRAF/MAPK 依存性悪性腫瘍の特徴と治療戦略. *医学の歩み* 2019;269:193-197.
23. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy. *Cells*. 2020,9,198; doi:10.3390
24. Roskoski R Jr. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: Structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 417: 5-10
25. Lian T, Li C, Wang H. Trametinib in the treatment of multiple malignancies harboring MEK1 mutations. *Cancer Treat Rev*. 2019; 81:101907
26. Ozer E, Sevinc A, Ince D, Yuzuguldu R, Olgun N. BRAF V600E mutation: a significant biomarker for prediction of disease relapse in pediatric langerhans cell

- histiocytosis. *Pediatr Dev Pathol*. 2019; 22:449–55.
27. Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile JF, Arnaud L, Maksud P, Charlotte F, Cluzel P, Drier A, Hervier B, Benameur N, Besnard S, Donadieu J, Amoura Z. Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2013; 121:1495–500.
28. Diamond EL, Subbiah V, Lockhart AC, Blay JY, Puzanov I, Chau I, Raje NS, Wolf J, Eringeri JP, Torrisi J, Lacouture M, Elez E, Martínez-Valle F, Durham B, Arcila ME, Ulaner G, Abdel-Wahab O, Pitcher B, Makrutzki M, Riehl T, Baselga J, Hyman dM. Vemurafenib for BRAF V600-Mutant Erdheim-Chester Disease and Langerhans Cell Histiocytosis: analysis of data from the histology-independent, Phase 2. Open-label VE-BASKET Study. *JAMA Oncol*. 2018; 4:384–8.
29. Donadieu J, Larabi IA, Tardieu M, Visser J, Hutter C, Sieni E, Kabbara N, Barkaoui M, Miron J, Chalard F, Milne P, Haroche J, Cohen F, Hélias-Rodzewicz Z, Simon N, Jehanne M, Kolenova A, Pagnier A, Aladjidi N, Schneider P, Plat G, Lutun A, Sonntagbauer A, Lehrnbecher T, Ferster A, Efremova V, Ahlmann M, Blanc L, Nicholson J, Lambilliotte A, Boudiaf H, Lissat A, Svojgr K, Bernard F, Elitzur S, Golan M, Evseev D, Maschan M, Idbah A, Slater O, Minkov M, Taly V, Collin M, Alvarez JC, Emile JF, Héritier S. Vemurafenib for refractory multisystem langerhans cell histiocytosis in children: an international observational study. *J Clin Oncol*. 2019; 37:2857–65.
30. Diamond EL, Durham BH, Ulaner GA, Drill E, Buthorn J, Ki M, Bitner L, Cho H, Young RJ, Francis JH, Rampal R, Lacouture M, Brody LA, Ozkaya N, Dogan A, Rosen N, Iasonos A, Abdel-Wahab O, Hyman DM. Efficacy of MEK inhibition in patients with histiocytic neoplasms. *Nature*. 2019; 567:521–4.
31. Héritier S, Barkaoui MA, Miron J, Thomas C, Moshous D, Lambilliotte A, Mazingue F, Kevaili K, Jeziorski E, Plat G, Aladjidi N, Pacquement H, Galambrun C, Brugières L, Leverger G, Mansuy L, Paillard C, Deville A, Pagnier A, Lutun a, Gillibert-Yvert M, Stephan JL, Cohen-Aubart F, Haroche J, Pellier I, Millot F, Gandemer V, Martin-Duverneuil N, Taly V, Hélias-Rodzewicz, Emile JF, Hoang-Xuan Khe, Idbah A, Donadieu J. Incidence and risk factors for clinical neuro-degenerative Langerhans cell histiocytosis: a longitudinal cohort study. *Br J Haematol*. 2018; 183:608–17.



32. McClain KL, Picarsic J, Chakraborty R, Zinn D, Lin H, Abhyankar H, Scull B, Shih A, Lim KP, Eckstein O, Lubega J, Peters TL, Olea W, Burke T, Ahmed N, Hicks MJ, Tran B, Jones J, Dauser R, Jeng M, Maiocchi R, Schiff D, Goldman S, Heym KM, Wilson H, Carcamo B, Kumar A, Rodriguez-Galindo C, Whipple NS, Malone M, Woltjer R, Quinn JF, Orchard P, Kruer MC, Jaffe R, Manz MG, Lira SA, Parsons DW, Merad M, Man TK, Allen CE. CNS Langerhans cell histiocytosis: common hematopoietic origin for LCH-associated neurodegeneration and mass lesions. *Cancer*. 2018; 124:2607–20.
33. Sasaki Y, Guo Y, Arakawa F, Miyoshi H, Yoshida N, Koga Y, Nakashima K, Kurita D, Niino D, Seto M, Ohshima K. Analysis of the BRAFV600E mutation in 19 cases of Langerhans cell histiocytosis in Japan. *Hematol Oncol*. 2017; 35:329–34.
34. Tatsuno M, Shioda Y, Iwafuchi H, Yamazaki S, Iijima K, Takahashi C, Ono H, Uchida K, Okamura O, Matsubayashi M, Okuyama T, Matsumoto K, Yoshioka T, Nakazawa A. BRAFV600 mutations in Langerhans cell histiocytosis with a simple and unique assay. *Diagn Pathol*. 2016; 11:39.
35. Kobayashi M, Tojo A. The BRAF-V600E mutation in circulating cell-free DNA is a promising biomarker of high-risk adult Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2014; 124:2610–1.
36. Abd Elmageed ZY, Sholl AB, Tsumagari K, Al-Qurayshi Z, Basolo F, Moroz K, Boulares AH, Friedlander P, Miccoli P, Kandil E. Immunohistochemistry as an accurate tool for evaluating BRAF-V600E mutation in 130 samples of papillary thyroid cancer. *Surgery*. 2017; 161:1122–8.
37. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ichiyama K, Mori H, Nolte f, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HO, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011; 478:64–9.
38. Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. et al. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2013;41: e89.

39. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38: e164.
40. Ki Kim S, Ueda Y, Hatano E, Kakiuchi N, Takeda H, Goto T, Shimizu T, Yoshida K, Ikura Y, Shiraichi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Uemoto S, Chiba T, Ogawa S, Marusawa H. TERT promoter mutations and chromosome 8p loss are characteristic of nonalcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2016; 139:2512–8.
41. Seki M, Kimura S, Isobe T, Yoshida K, Ueno H, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Lin L, Kon A, Suzuki H, Shiozawa Y, Kataoka K, Fujii Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Shimamura T, Masuda K, Kawamoto H, Ohki K, Kato M, Arakawa Y, Koh K, Hanada R, Moritake H, Akiyama M, Kobayashi R, Deguchi T, Hashii Y, Imamura T, Sato A, Kiyokawa N, Oka A, Hayashi Y, Takagi M, Manabe A, Ohara A, Horibe K, Sanada M, Iwama A, Mano H, Miyano S, Ogawa S, Takita J. Recurrent SPI1 (PU.1) fusions in high-risk pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2017; 49:1274–81.
42. Selway JL, Harikumar PE, Chu A, Langlands K. Genetic homogeneity of adult Langerhans cell histiocytosis lesions: Insights from BRAFV600E mutations in adult populations. *Oncol Lett.* 2017; 14:4449–54.
43. Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Ohga S, Shioda Y, Okimoto Y, Kudo Kazuko, Ishii E. Nationwide survey of single-system single site Langerhans cell histiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer.* 2010; 54:98–102.
44. Gardner H, Minkov M, Grois N, Pötschger U, Thiem E, Aricò M, Astigarraga I, Braier J, Donadieu J, Henter JJ, Janka-Schaub G, McClain KL, Weitzman S, Windebank K, Ladisch S; Histiocyte Society. Therapy prolongation improves outcome in multisystem Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2013; 121:5006-5014
45. Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Kudo K, Kitoh T, Kawaguchi H, Goto H, Kosaka Y, Tsunematsu Y, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Intensification of induction therapy and prolongation of maintenance therapy did not improve the outcome of pediatric Langerhans cell histiocytosis with single-system multifocal bone lesions: results of the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-02 Protocol Study. *Int J Hematol.* 2018;108(2):192-198.
46. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd r, Leung K, Menzies A, Teague JW, Campbell PJ, Stratton MR, Futreal PA. COSMIC: mining

- complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(suppl 1): D945–D950950.
47. Nelson DS, van Halteren A, Quispel WT, van den Bos C, Bovée JV, Patel B, Badalian-Very G, van Hummelen P, Ducar M, Lin L, MacConaill LE, Egeler RM, Rollins BJ. MAP2K1 and MAP3K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015; 54:361–8.
48. Papapanagiotou M, Griewank KG, Hillen U, Schimming TT, Moeller LC, Führer D, Zimmer L, Roesch A, Sucker A, Schadendorf D, Livingstone E, Schilling B. Trametinib-induced remission of an MEK1-mutated Langerhans cell histiocytosis. *JCO Clin Cancer Inform.* 2017; 1:1–5.
49. Azorsa DO, Lee DW, Wai DH, Bista R, Patel AR, Aleem E, Henry MM, Arceci RJ. Clinical resistance associated with a novel MAP2K1 mutation in a patient with Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2018; 65: e27237.
50. Héritier S, Emile JF, Hélias-Rodzewicz Z, Donadieu J. Progress towards molecular-based management of childhood Langerhans cell histiocytosis. *Arch Pediatr* 2019