

氏名	早瀬 朋美
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 799 号
学位授与年月日	令和 3 年 2 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 五味 玲 (委員) 教授 小宮根 真弓 講師 上田 真寿

論文内容の要旨

1 研究目的

ランゲルハンス細胞組織球症 (LCH) では、LCH 細胞に mitogen-activated protein kinase 経路の遺伝子に相互排他的な体細胞変異が 80%以上の症例で認められる。BRAFV600E 変異が 50-60%、次いで MAP2K1 遺伝子変異が約 20%を占めること、BRAFV600E 変異はリスク臓器浸潤、再発、治療抵抗性など予後不良に関連することが欧米から報告されている。MAP2K1 やその他の遺伝子変異と臨床的特徴との関連は報告されていない。

本邦では、少数例での BRAFV600E 変異解析の報告しかない。本邦の小児および成人 LCH 患者の体細胞変異の頻度、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に研究を行った。

2 考察

①症例及び試料

本邦 LCH59 例 (小児 50 例、成人 9 例) から臨床情報、腫瘍検体及び末梢血検体を得て、以下の解析を行った。

②BRAF V600E 変異解析

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) を用いて 59 例の BRAFV600E 変異について解析を行った。

③ターゲットシーケンス解析

17 例の BRAF V600E 変異陰性症例について V600E 以外の BRAF 変異及び MAP2K1(exon2、exon3) 変異について、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) を用いターゲットシーケンスを行った。

データ解析は Genomon2(<http://genomon.readthedocs.io/ja/latest/index.html>) を用いた。また既知の変異は Integrative Genomic Viewer を用い、確認した。

④統計解析

小児 LCH 患者の臨床的特徴と遺伝子変異との関連を Mann-Whitney の U 検定および Fisher

の検定で評価した。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 BRAFV600E 変異の有無による累積イベント発生率の差を log-rank 検定を行い評価した。P<0.05 を有意とした。

3 研究成果

診断時年齢は、小児群で中央値 2.9 歳 (範囲 0.3-17.0)、成人群で中央値 40.8 歳 (範囲 19.0-67.1) だった。病型は、小児群で単一臓器[SS]型 25 例、多臓器-リスク臓器浸潤なし[MS-RO(-)]型 17 例、多臓器リスク臓器浸潤あり[MS-RO(+)]型 8 例、成人群で SS 型 5 例、MS-RO(-)型 3 例、MS-RO(+型 1 例だった。ほとんどの症例が全身化学療法を受けていた。

リアルタイム PCR 法により BRAFV600E 変異を 27 例(46%)に認めた。ターゲットシーケンスを行った 17 例の中で、V600E 以外の BRAF 変異を 5 例(8.5%)に、MAP2K1(exon2、exon3) 変異を 9 例(15.3%)に認めた。リアルタイム PCR 法で BRAF V600E 変異が陰性であったがターゲットシーケンスができなかった 15 例を除く 44 例のうち 41 例(93%)で、BRAF または MAP2K1 遺伝子に変異を認めた。

18 歳未満の小児 40 例での検討では 24 例で認めた BRAFV600E 変異とリスク臓器浸潤、再発、治療抵抗性に関連を認めず、この変異の有無で累積イベント発生率に差はなかった。一方 6 例で認めた MAP2K1 exon 2 in-frame 欠失はリスク臓器浸潤と関連していた。

4 考察

本研究結果から本邦における LCH 患者において 90%以上の頻度で BRAF と MAP2K1 変異を有していると推測され、欧米からの報告にほぼ一致した。一方、小児例の検討で 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。この差異は、遺伝学的背景の違いや、治療の基本骨格の違いによる影響の可能性が考えられる。MAP2K1 exon 2 in-frame 欠失は、これまで病型などの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た。しかし、症例数が十分とは言えないため、遺伝子変異と臨床的特徴との関連を更に確認する必要がある。

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、難治性の BRAF V600E 変異陽性 LCH 症例に対し BRAF 阻害薬が奏功したという報告があり、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 症例において 90%以上の頻度で BRAF と MAP2K1 変異を有していると推測された。一方、小児例の検討で 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。

MAP2K1 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、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。

論文審査の結果の要旨

早瀬朋美氏の学位論文「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」は、稀少疾患であるランゲルハンス細胞組織球症 (Langerhans Cell Histiocytosis 以下 LCH) の日本人症例 59 例における体細胞遺伝子変異について、次世代シーケンサーなどを用いて詳細な検討を加え、新たな知見を報告したものである。LCH は血液由来の細胞が、体内の様々な臓器で炎症細胞浸潤を伴う組織破壊をおこす、炎症と腫瘍の両方の特徴を併せ持つ不思議な疾患であり、LCH 細胞の腫瘍性の側面としては発がん遺伝子変異が認められるとされてきた。海外のデータから特に注目されるのが mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の遺伝子変異であり、本研究はこれに着目し、国内 10 施設から提供された腫瘍検体で検討したものである。その結果、MAPK 経路の蛋白の 1 つ RAF の isoform である BRAF に関しては、BRAF 遺伝子の代表的な遺伝子変異である V600E 変異を 46% で確認した。さらに V600E 変異陰性例でもターゲットシーケンスを用いた結果、17 例中 5 例に V600E 以外の BRAF 変異を発見し、また MAPK 経路で RAF の下流にある MEK1 をコードする MAP2K1 遺伝子変異も 9 例に発見した。この遺伝子変異は相補排他的なのだが、これらを検索を施行できた症例のうち、実に 93% にどちらかの遺伝子変異があったことになる。また、性別、診断年齢、病型、初期治療抵抗性、再発、中枢神経関連などの臨床像と BRAF 遺伝子変異との関係は、本研究では見いだせなかったが、MAP2K1 遺伝子変異と LCH のリスク臓器浸潤との関係が示唆された。

この研究の学問的な意義は、日本人での LCH の遺伝子変異について、これまでの報告とはまったく異なるターゲットシーケンスを用いた高感度の検出法で検索し、BRAF 遺伝子と MAP2K1 遺伝子変異が高頻度にみられることを見いだした点である。欧米では BRAFV600E 変異の研究が複数あり、臨床像との関連も報告されているが、本研究では異なる結果であった。これは日本と欧米の治療法の違いによるものか、人種差かは不明だが、新たな知見である。また MAP2K1 遺伝子変異はこれまで欧米でも報告は少なく、本研究で新規の変異も発見されており、さらに症例数は少ないものの臨床像との関連も示唆された点は、たいへん重要である。これらの遺伝子変異の確率が高いことがわかり、この疾患の初期段階からの分子標的薬の導入についての可能性が示されたことも、臨床的にも重要な知見であると言えよう。

当初、学位論文は主英語論文の日本語訳を中心としたものであったため、試問でのプレゼンテーションをもとに、研究の背景や遺伝子の構造の解説等、一般の研究者にとっても理解しやすい

ような内容に改訂を指示した。その結果、非常にわかりやすい、研究の価値・重要性の十分理解できる内容となり、立派な学位論文として完成したと考える。

以上より、本学位論文は、本学の学位論文としてふさわしい論文であると判定し「合格」とする。

試問の結果の要旨

試問では、本研究の背景としてランゲルハンス細胞組織球症（Langerhans Cell Histiocytosis、以下 LCH）という疾患の特徴、現在の本邦及び海外での治療法や治療成績、遺伝子異常に関するこれまでの知見などを詳細に説明し、その後本研究の方法、結果について解説した。本研究の研究方法がこれまでと異なって感度が高く、BRAF 遺伝子変異についても V600E 以外にも変異が認められたことや MAP2K1 でも変異を認めたこと、さらに臨床像との比較について、図表を用いて発表した。内容的には当初の学位論文が主論文の和訳に近かったが、これを膨らませるかたちでの発表であった。

審査員からは、まず LCH の遺伝子的な背景についての詳細な説明を求められた。これについての言及が少なく、やや理解が難しい点があったためである。これに対しては、BRAF 遺伝子の構造、MAPK 経路における BRAF 遺伝子や MAP2K1 遺伝子の役割の変異の意味についてを回答できた。それらの内容は、学位論文の改訂に生かされた。

海外のデータと本研究の結果との違いをどう解釈するか、についての質問では、本邦の LCH の疫学的なデータを説明し、人種的な差以外にもそもそもの治療法や治療成績が異なることが臨床像との関係の違いに現れていることなど、わかりやすく回答できた。

研究方法としては、参加施設一覧とそれがどの程度日本全体のデータを反映しているか、という質問があり、当施設がこの疾患の国内での中心的な役割を担っていることが強調された。さらにリアルタイム PCR の結果とターゲットシーケンスの結果との意味づけ、凍結検体とホルマリン固定検体での評価の精度などの質問もあったが、具体的な方法の詳細とその違いや結果の解釈をきちんと回答できた。

さらに、本研究の問題点や今後の課題、さらに今後の発展や臨床への寄与についての質問があった。症例数の問題、研究の裾野を拡大している方向性、BRAF 阻害薬・MEK 阻害薬の現状と今後の期待などを、十分理解・把握し表明できた。

以上から、試問に関しても、合格と判断する。