



Distinct Expression Profiles of Neuroblastoma-Associated mRNAs in Peripheral Blood and Bone Marrow of Non-High-Risk and High-Risk Neuroblastoma Patients

中谷, 尚子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9006号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492515>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Distinct Expression Profiles of Neuroblastoma-Associated mRNAs in Peripheral Blood
and Bone Marrow of Non-High-Risk and High-Risk Neuroblastoma Patients

非高リスクおよび高リスク神経芽腫患者の末梢血および骨髄における

神経芽腫関連 mRNA の異なる発現プロファイル

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科博士課程内科系講座小児科学分野 野津寛大教授)

中谷 尚子

【はじめに】

神経芽腫 (neuroblastoma; NB) は胎児期の神経堤から発生する小児固形腫瘍で、小児がん全体の約 10%、小児がんによる死亡の約 15%を占める。NB は極めて不均一な腫瘍動態を示し、自然退縮する予後良好例から高悪性度の難治例まで存在する。NB は超低リスク (very low risk; VLR)、低リスク (low risk; LR)、中リスク (intermediate risk; IR)、高リスク (high risk; HR) のグループに層別化される。VLR、LR および IR (非 HR) 患者は一般的に予後良好で、全生存率は 90%を超える。一方、HR 患者は、多剤併用化学療法、外科療法、放射線療法、自己末梢血造血幹細胞移植併用大量化学療法などの集学的治療を行っても長期生存を達成できるのは 50% 未満に過ぎない。NB における転移性病変は非 HR および HR 患者の両方で主な死亡原因である。

国際神経芽腫リスクグループ (International Neuroblastoma Risk Group; INRG) によるリスク分類では、月齢、組織学的分類、腫瘍分化度、*MYCN* 増幅、11q 欠失、核 DNA 量などの臨床的、分子生物学的因子とともに、診断時の画像検査をもとに決定される INRG 病期分類を組み合わせて評価される。遠隔転移を有する場合 (病期 M)、*MYCN* 増幅のない 18 か月未満の患者以外は HR に分類される。局所性腫瘍の場合 (病期 L1/L2)、*MYCN* 増幅のある患者以外は非 HR に分類される。

NB の転移性病変の評価として、神経芽腫関連 mRNA (NB-mRNA) が定量 PCR (qPCR) によって測定されてきた。非 HR 患者と HR 患者の末梢血 (peripheral blood; PB) と骨髄 (bone marrow; BM) 検体に対し qPCR により NB-mRNA が評価されてきたが、予後予測因子としては限定的であった。非 HR 患者のサンプルでは、[*PHOX2B* mRNA、*DCX* および *TH* mRNA]、[*DCX*、*PHOX2B* および *TH* mRNA]、[*CHRNA3*、*DDC*、*GAP43*、*PHOX2B* および *TH* mRNA] が NB-mRNA のセットとして使用された。HR 患者のサンプルでは、[*DCX*、*PHOX2B* および *TH* mRNA]、[*B4GALNT1*、*CCND1*、*ISL1* および *PHOX2B* mRNA]、[*CHRNA3*、*DDC*、*GAP43*、*PHOX2B* および *TH* mRNA]、[*CHGA*、*DCX*、*DDC*、*PHOX2B* および *TH* mRNA] が NB-mRNA のセットとして使用されてきた。

我々は HR 患者に対し 7 つの NB-mRNA (*CRMP1*、*DBH*、*DDC*、*GAP43*、*ISL1*、*PHOX2B*、および *TH* mRNA) を測定する droplet digital PCR (ddPCR) ベースのアッセイ (7NB-mRNAs) を開発した。7NB-mRNAs は HR 患者における予後予測因子として有用であったが、非 HR 患者に対する評価はまだ行われていない。本研究では、非 HR 症例 8 例と HR 症例 11 例において、診断時に採取した PB と BM 検体における 7 つの NB-mRNA の発現量を ddPCR で測定し、NB-mRNA の発現プロファイルの違いについて検討を行った。

【対象と方法】

本研究では、2012 年 6 月から 2018 年 10 月までに兵庫県立こども病院および神戸大学医学部附属病院で新たに診断された NB 症例を対象とした。ddPCR での評価が可能な PB および BM の検体が存在しない症例は除外した。対象患者は INRG リスク分類に基づいてリスク分類が行われた。PB、BM、および尿検体は診断時に書面によるインフォームドコンセントを得て採取された。尿中バニリルマンデル酸 (VMA)、尿中ホモバニリン酸 (HVA)、血清ニューロン特異的エノラーゼ (NSE)、血清乳酸脱水素酵素 (LDH)、および血清フェリチンの検査値は患者の診療録から抽出された。本研究は、兵庫県立こども病院倫理委員会 (No. 31-91) および神戸大学大学院医学研究科 (No. 180278) の倫理承認を受けており、神戸大学大学院医学研究科の臨床研究ガイドラインに準拠している。

PB および BM 検体は、Mono-Poly 分離培地 (DS Pharma Biomedical) を使用して分離し、有核細胞を回収した。総 RNA は、TRIzol Plus RNA 精製キット (Life Technologies) を使用して抽出された。cDNA は、Quantitect 逆転写キット (Qiagen) を使用して 1 または 0.5 μ g の総 RNA から合成され、使用するまで -80°C で保存された。

7 つの NB-mRNA (*CRMP1*、*DBH*、*DDC*、*GAP43*、*ISL1*、*PHOX2B*、および *TH* mRNA) と参照遺伝子 mRNA (*HPRT1* mRNA) の発現量を QX200 ddPCR システム (Bio-Rad Laboratories) を使用して定量した。7NB-mRNAs は、各 NB-mRNA の発現量を健常人の 90 パーセンタイル値で除した値の合計と定義した。

【結果】

非 HR 症例 8 例 (VLR 2 例、LR 2 例、IR 4 例)、HR 症例 11 例が対象となった。患者の年齢は、非 HR 症例では 4~68 か月 (中央値 12 か月)、HR 症例では 11~56 か月 (中央値 30 か月) であった。BM 転移は、非 HR 症例の 13% (1/8 例)、HR 症例の 91% (10/11 例) に認めた。MYCN 増幅は非 HR 症例では認めず、HR 症例の 55% (6/11 例) に認めた。48 か月以上の追跡調査を行い、非 HR 症例は全例再発なく生存したが、HR 症例の 73% (8/11 例) は再発により死亡した。

非 HR および HR 症例の PB および BM 検体中の 7 つの NB-mRNA (*CRMP1*、*DBH*、*DDC*、*GAP43*、*ISL1*、*PHOX2B*、および *TH* mRNA) の発現量を ddPCR で測定した。各 NB-mRNA は PB の 3~9 検体および BM の 0~6 検体で検出感度未満であった。PB および BM 検体で最も発現量の高い NB-mRNA は非 HR 症例と HR 症例で異なり、非 HR 症例の PB および BM 検体では *CRMP1* mRNA が最も高発現し、HR 症例の PB および BM 検体では *GAP43* mRNA が最も高発現していた。PB と BM 検体中の各 NB-mRNA の発現量を非 HR 症例と HR 症例で比較すると、PB 検体においては *DDC* mRNA を除き非 HR 症例では HR 症例の約 5~50 倍低かった。BM 検体においてはすべてのマーカーで非 HR 症例が HR 症例の約 10~1000 倍低かった。NB-mRNA の PB 対 BM 比 (PB/BM 比) は、*GAP43* mRNA を除き、非 HR 症例が HR 症例より約 10~100 倍高

かった。7NB-mRNAs の PB/BM 比は、BM 転移のある症例（症例#2、#9～#15、#17～#19）では 1 未満であった。BM 転移のない症例では、一部の非 HR 症例（症例#1、#5、#6、#8）では 1 未満であったが、他の非 HR 症例（症例#3、#4、#7）および HR 症例の 1 例（#16）では 1 を超えていた。

腫瘍マーカーと 7NB-mRNAs の関連についても検討した。腫瘍マーカーのカットオフ値を尿中 VMA: 100 μ g/mg/Cr、尿中 HVA: 100 μ g/mg/Cr、血清 NSE: 100ng/mL、血清 LDH: 500U/L、血清フェリチン: 300ng/mL、7NB-mRNAs のカットオフ値を非 HR 症例および HR 症例の PB、BM 検体それぞれの中央値（非 HR 症例 PB: 5.7、非 HR 症例 BM: 4.3、HR 症例 PB: 65.0、HR 症例 BM: 4194.7）とし、腫瘍マーカーのカットオフ値を上回る症例のうち、7NB-mRNAs もカットオフ値を上回る症例が 50%以上となる場合に腫瘍マーカーと 7NB-mRNAs の関連があると評価した。結果、非 HR 症例では、PB 検体の血清 LDH（1/1 例、100%）および BM 検体の尿中 VMA（3/4 例、75%）、尿中 HVA（3/5 例、60%）、血清 NSE（2/3 例、67%）、血清 LDH（1/1 例、100%）に 7NB-mRNAs との関連がみられた。HR 症例では、PB 検体の尿中 VMA（3/5 例、6%）、血清 NSE（6/11 例、50%）、血清 LDH（6/10 例、60%）および BM 検体の尿中 VMA（3/5 例、60%）、尿中 HVA（5/7 例、71%）、血清 NSE（6/11 例、55%）、血清 LDH（6/10 例、60%）に 7NB-mRNAs との関連がみられた。

【考察】

本研究では、非 HR 症例 8 例と HR 症例 11 例の PB と BM 検体で 7 つの NB-mRNA (*CRMP1*、*DBH*、*DDC*、*GAP43*、*ISL1*、*PHOX2B*、および *TH* mRNA) を ddPCR で測定し、その発現プロファイルを検討した。第一に、PB と BM で最も高発現した NB-mRNA は非 HR 症例と HR 症例で異なり、非 HR 症例の PB と BM 検体では *CRMP1* mRNA、HR 症例の PB と BM 検体では *GAP43* mRNA が最も高発現していた。第二に、PB と BM 検体での NB-mRNA の発現レベルは、非 HR 症例では HR 症例の 5～1000 倍低かった。第三に、7NB-mRNAs の PB/BM 比は、非 HR 症例では HR 症例の 10～100 倍高かった。

非 HR 症例と HR 症例の PB と BM 検体で最も発現の高い NB-mRNA が異なるという第一の結果は、非 HR 患者と HR 患者で NB 細胞の細胞状態が異なる可能性を示唆しており、非 HR 患者と HR 患者では NB-mRNA を評価する際に最適なセットは異なる可能性がある。PB および BM 検体における NB-mRNA の発現量が非 HR 症例では HR 症例の 5～1000 倍低いという第二の結果は、非 HR 症例では HR 症例と比較して PB 中の NB 細胞が少ないことが予想され、病理学的に BM 転移が少ない結果と一致した。7NB-mRNAs の PB/BM 比が非 HR 症例で HR 症例よりも 10～100 倍高かったという第三の結果は、非 HR 症例の NB 細胞は HR 症例と比較して BM に対する親和性が低く、PB に優先的に存在する可能性があることを示唆する。

本研究の最も重要な limitation は、サンプル数が少なく統計分析を実施できないことである。今後、本研究結果を検証するのに十分なイベントを含む、より大規模な研究を計画している。

【結論】

本研究により、非 HR および HR NB 患者の PB および BM 検体では NB mRNA は異なる発現プロファイルを示すことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲第 3416 号	氏 名	中谷 尚子
論 文 題 目 Title of Dissertation	非高リスクおよび高リスク神経芽腫患者の末梢血および骨髄における 神経芽腫関連 mRNA の異なる発現プロファイル Distinct Expression Profiles of Neuroblastoma-Associated mRNAs in Peripheral Blood and Bone Marrow of Non-High-Risk and High-Risk Neuroblastoma Patients		
審 査 委 員 Examiner	主 査 南 博信 Chief Examiner 副 査 橋本 智穂 Vice-examiner 副 査 松岡 広 Vice-examiner		

(要旨は1，000字～2，000字程度)

【背景・目的】

神経芽腫 (NB) は超低リスク (VLR)、低リスク (LR)、中リスク (IR)、高リスク (HR) に層別化され、VLR、LR および IR (非 HR) は全生存割合は 90%を超えるが、HR は集学的治療を行っても長期生存は 50%未満である。国際神経芽腫リスクグループ (International Neuroblastoma Risk Group: INRG) によるリスク分類は、臨床的・分子生物学的因子とともに診断時画像検査による INRG 病期分類を組み合わせで評価する。遠隔転移を有する場合 (病期 M)、*MYCN*増幅のない 18 か月未満の患者以外は HR に分類される。局所性腫瘍の場合 (病期 L1/L2) は *MYCN*増幅のある患者以外は非 HR に分類される。

NB の転移を末梢血 (PB) と骨髄 (BM) 検体において神経芽腫関連 mRNA (NB-mRNA) を定量 PCR (qPCR) で評価しても、予後予測能は限定的であった。

新たに開発した droplet digital PCR (ddPCR) を用いる 7 つの NB-mRNA (*CRMP1*、*DBH*、*DDC*、*GAP43*、*ISL1*、*PHOX2B*、および *TH* mRNA) のアッセイ系 (7NB-mRNAs) は、HR 患者の予後予測に有用であった。本研究では、非 HR 例と HR 例の遺伝子発現プロファイルの違いを明らかにするため、診断時に採取した PB と BM 検体において 7 NB-mRNA を評価した。

【方法】

2012 年 6 月から 2018 年 10 月に兵庫県立こども病院および神戸大学医学部附属病院で診断された NB 症例のうち ddPCR 評価が可能な PB および BM 検体が存在しない症例を除外して対象とした。リスクを INRG リスク分類に基づいて分類し、尿中バニリルマンデル酸 (VMA)、尿中ホモバニリン酸 (HVA)、血清ニューロン特異的エノラーゼ (NSE)、血清乳酸脱水素酵素 (LDH)、および血清フェリチンの検査値を診療録から抽出した。

PB および BM 検体から有核細胞を回収し、総 RNA を TRIzol Plus RNA 精製キット (Life Technologies) で抽出し、cDNA を Quantitect 逆転写キット (Qiagen) で 1 または 0.5μg の総 RNA から合成し、-80℃で保存した。

7 つの NB-mRNA (*CRMP1*、*DBH*、*DDC*、*GAP43*、*ISL1*、*PHOX2B*、および *TH* mRNA) と参照遺伝子 mRNA (*HPRT1* mRNA) の発現量を QX200 ddPCR システム (Bio-Rad Laboratories) で定量し、各 NB-mRNA の発現量を健常人の 90 パーセンタイル値で除した値の合計を 7NB-mRNAs とした。

【結果】

非 HR 例 8 例 (VLR 2 例、LR 2 例、IR 4 例) の年齢中央値は 12 か月 (4~68 か月)、HR 例 11 例の年齢 30 か月 (11~56 か月) であった。非 HR 例の 13% (1/8 例)、HR 例の 91% (10/11 例) に BM 転移を認めた。*MYCN* 増幅は非 HR 例では認めず、HR 例の 55% (6/11 例) に認めた。48 か月以上の追跡で非 HR 症例は全例無再発生存だったが、HR 症例の 73% (8/11 例) は再発により死亡した。

各 NB-mRNA は PB の 3~9 検体および BM の 0~6 検体で検出感度未満であった。最大発現を示した NB-mRNA は、非 HR 例の PB および BM 検体では *CRMP1* mRNA で、HR 例の PB および BM 検体では *GAP43* mRNA であった。PB 検体では *DDC* mRNA 以外の NB-mRNA の発現は非 HR 例で HR 例より約 5~50 倍低く、BM 検体ではすべてのマーカーで非 HR 例が HR 例の約 10~1000 倍低かった。

NB・mRNA の PB/BM 比は、*GAP43* mRNA を除き非 HR 例が HR 例より約 10～100 倍高く、7NB・mRNAs の PB/BM 比は、BM 転移例では 1 未満であったが、非 BM 転移例の 7 例中 3 例および HR 例の 1 例で 1 を超えていた。

腫瘍マーカーのカットオフ値を尿中 VMA (100 μ g/mg/Cr)、尿中 HVA (100 μ g/mg/Cr)、血清 NSE (100ng/mL)、血清 LDH (500U/L)、血清フェリチン (300ng/mL) とし、7NB・mRNAs のカットオフ値を非 HR 例および HR 例の PB、BM 検体それぞれの中央値 (非 HR 例 PB 5.7、非 HR 例 BM 4.3、HR 例 PB 65.0、HR 例 BM 4194.7) として、腫瘍マーカーのカットオフ値を上回る症例のうち、7NB・mRNAs もカットオフ値を上回る症例が 50% 以上の場合に腫瘍マーカーと 7NB・mRNAs の関連ありと評価したところ、非 HR 例では、PB 検体の血清 LDH (1/1 例、100%) および BM 検体の尿中 VMA (3/4 例、75%)、尿中 HVA (3/5 例、60%)、血清 NSE (2/3 例、67%)、血清 LDH (1/1 例、100%) が 7NB・mRNAs と関連した。HR 例では、PB 検体の尿中 VMA (3/5 例、6%)、血清 NSE (6/11 例、50%)、血清 LDH (6/10 例、60%) および BM 検体の尿中 VMA (3/5 例、60%)、尿中 HVA (5/7 例、71%)、血清 NSE (6/11 例、55%)、血清 LDH (6/10 例、60%) が 7NB・mRNAs と関連した。

【考察】

本研究で、PB と BM で最も発現が高かった NB・mRNA は非 HR 例と HR 例で異なっており、PB と BM 検体での NB・mRNA の発現レベルは、非 HR 例では HR 例の 5～1000 倍低かく、7NB・mRNAs の PB/BM 比は非 HR 例では HR 例の 10～100 倍高いことが判明した。

非 HR 例と HR 例の PB と BM 検体で最も発現の高い NB・mRNA が異なったことは、非 HR 例と HR 例で NB 細胞のプロファイルが異なることを示唆し、非 HR 例と HR 例では NB・mRNA を評価する際に最適なセットが異なる可能性がある。PB および BM 検体における NB・mRNA の発現量が非 HR 例では HR 例の 5～1000 倍低かったことは、非 HR 例では HR 例と比較して PB 中の NB 細胞が少なかったことが考えられた。7NB・mRNAs の PB/BM 比が非 HR 例で HR 例よりも 10～100 倍高かったことは、非 HR 例の NB 細胞は HR 例と比較して BM に対する親和性が低く、PB に優先的に存在する可能性を示唆する。

本研究はサンプル数が少なく統計分析を実施できないことが大きな limitation である。

【結論】

本研究は神経芽腫のリスクにより PB および BM の腫瘍関連 mRNA 発現プロファイルが異なることを示唆する研究で、さらなる研究の基礎となりうる研究であると思われる。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位をえる資格があると認める。