

I . 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

「眼部希少がんの発生・多様性獲得機構の「鍵となる」分子・分子経路の特定と、
二次がん発生のサーベイランス体制の確立」に関する研究

業務主任者 鈴木茂伸 国立がん研究センター中央病院眼腫瘍科科長

研究要旨 希少がんであるため多数例を収集し基盤データを作成する体制を構築し、前向き検体収集、DNA抽出を行った。保存検体を用いた解析を行うため、質の高いDNA抽出を行う技術を確認した。ゲノム解析の最適化研究を行い、次年度の解析に向けたゲノム解析体制を構築した。眼部の形成にSOX10遺伝子発現が重要な意義を持つことを解明し、眼内腫瘍の診断に有用であることを確認した。二次がんの疫学情報を収集し、DNA抽出を行った。本年度集積したDNA及びゲノム解析体制を用い、次年度以降に本格的ゲノム解析を行い、眼部希少がんの鍵となる分子の特定を目指す。

分子経路解明と基盤データ作成

眼内腫瘍に関する研究

鈴木茂伸

国立がん研究センター中央病院眼腫瘍科科長

眼周囲発生固形腫瘍に関する研究

吉田世一・松本文彦

国立がん研究センター中央病院頭頸部腫瘍科科長・医長

眼付属器腫瘍に関する研究

辻 英貴

がん研究会有明病院眼科部長

病理学解析に関わる技術開発に関する研究

森 泰昌

国立がん研究センター中央病院病理臨床検査科医員

遺伝子解析に関わる技術開発に関する研究

吉田輝彦・坂本裕美

国立がん研究センター研究所遺伝医学研究分野長・ユニット長

新規診断マーカーの探索に関する研究

芝田晋介

慶應義塾大学医学部生理学教室専任講師

二次がんの診療体制構築に関する研究

鈴木茂伸

国立がん研究センター中央病院眼腫瘍科科長

A．研究目的

希少がんであるため基盤となる研究がなされていない眼腫瘍において、発病の「鍵となる」分子・分子経路を解析し基盤データを作成することで早期発見のための検査の適正化を図り、新しい治療法を開発することにより治癒率の著明な改善を実現することを目的とする。また分子経路を解明することにより晩期再発と二次がんを明確に鑑別することで、二次がん発生のサーベイランスと個別化されたフォローアップ体制を確立することを目的とする。

B．研究方法

分子経路解明と基盤データ作成

a．プロジェクトの総合推進

各施設での倫理審査、各分担者により後ろ向き臨床情報データベース作成ならびに試料収集を行う。前向き検体の試料収集については、眼内腫瘍、眼周囲発生固形腫瘍、眼付属器腫瘍試料について各々の機関で収集を進める。

b．病理学解析に関わる技術開発

病理組織学的評価ならびにTissue Micro Array作成を行う。長期保管FFPE試料、微細生検検体を用いての免疫組織化学染色による蛋白発現解析方法、電子顕微鏡による腫瘍内微細構造解析、in-situ hybridizationによるRNA解析ならびに前向き新鮮試料を用いたフローサイトメータ解析による腫瘍細胞表面発現蛋白解析方法については、適正な解析プロトコル作成のための技術開発を進める。

c．遺伝子解析に関わる技術開発

長期保管FFPE試料から高精度ゲノム・エピゲノム解析法の確立に関わる技術開発を行う。平成26年度は当該FFPEブロックからのDNA抽出とその量・品質の検証を行い、解析データの品質評価や解析の優先順位付けを行う。特に希少症例に多く含まれる古いサンプルや微細なサンプルから高精度な解析を行うことを可能とするDNAの抽出方法につ

いての技術開発を進める。

新規診断マーカーの探索、新規診断マーカーの研究開発

マウスの眼部発生時における分子発現解析から、腫瘍形質による分類のための新規診断マーカー候補探索を行う。

二次がんの診療体制構築・二次がんの調査及び診療体制構築

二次がんについては、過去30年の追跡調査により再発・二次がんの有無、治療の内容、どのようにフォローアップされているかについての臨床疫学的調査を進める。

(倫理面への配慮)

ヒト試料を研究に使用する際には、ヘルシンキ宣言を重視し、事項の指針に沿って研究を行う。また「遵守すべき研究に関する指針等」に記載した指針に沿って研究を遂行する。

研究計画は事前に各施設のそれぞれの倫理委員会の審査を受け、研究によって提供者に危険や不利益が生じないこと、個人情報厳重に管理されていること、提供者に同意を得る方法に倫理的な問題がないことを確認し、承認を得た後に行う。

新規試料については、「検査試料、生検組織、摘出標本等の研究利用に関するお願い」に基づく包括同意を表明していない患者から得られた試料を使用しない。個々の患者の包括同意の有無は病院情報システムに掲載されており、連結可能匿名化業務に従事する研究所連携研究支援プロジェクトと病理情報管理に当たる研究協力者が情報システムを厳に参照することにより、包括同意が得られていることを二重に確認する。一旦表明された同意が撤回されたかどうかも定期的に確認し、撤回された検体があれば解析の途上であっても直ちに破棄する。

動物実験に関しては、国立がん研究センターならびに慶応義塾大学医学部動物実験指針を遵守し、各期間での承認を得た後、実験は行われる。

C. 研究結果

分子経路解明と基盤データ作成

a. プロジェクトの総合推進

眼内腫瘍については毛様体腫瘍切除による治療を行い、2/3例で眼球温存を達成した。検体から質の良いDNAを抽出でき、次年度以降の解析に活用する準備を行った。

眼付属器腫瘍については、脂肪肉腫の解析を行い、診断の鍵となるMDM2染色の有用性を確認した。

眼周囲発生固形腫瘍については、頭頸部扁平上皮癌細胞を用いcetuximab(抗EGFR抗体)による重粒子線治療の増感効果を確認した。

b. 病理学解析に関わる技術開発

網膜芽細胞腫検体からTissue Micro Arrayを作成し、正常網膜と腫瘍部位の比較検討から、正常網膜には発現せず腫瘍特異的に発現する転写因子を同定した。

SOX10を用いた免疫染色の結果、脈絡膜悪性黒色腫は全例陽性、毛様体上皮腫瘍は全例陰性を示した。

c. 遺伝子解析に関わる技術開発

保存検体からのDNA抽出において、Qiagenを用いた従来の方法に比べcovarisを用いることで約20倍の増幅効果が認められた。

全エクソーム塩基配列解析(WES)データに基づくコピー数異常の検出について、先行研究のデータを用いて最新鋭の解析ツールであるSequenzaの最適化について検討を行い、安定したデータの得られることが示唆された。

新規診断マーカーの探索に関する研究

手術検体などの解析結果からSOX10遺伝子の発現亢進がキーであることが示唆され、SOX10を中心とした神経堤細胞に関連する分子経路の関与が示唆された。Sox10の蛍光レポーターマウスを導入し、眼発生においてoptic cupのほぼすべての細胞に初期から強発現していることが判明した。

二次がんの診療体制構築

過去40年の症例調査により33例に38の二次がんが生じていた。骨肉腫以外に横紋筋肉腫が多く、免疫染色にて確定診断されていた。一部の二次がん検体からDNA抽出に成功した。

D. 考察

眼部腫瘍は希少であるがゆえに少数の治療施設に集積されてきた経緯があり、本研究体制により多数例の検体収集が可能であった。過去の保存検体を活用することで対象を増やすことが可能であるが、種々の解析に耐えうるDNA抽出、解析技術が必須であり、本年度の成果としてcovarisを用いた抽出技術とWESデータを用いた解析の最適化研究結果は次年度以降のゲノム解析に向けた重要な成果と考える。

病理学的検討、マウスの眼発生の研究からSOX10が眼部の形成において鍵となる可能性が示唆された。実際に悪性黒色腫と鑑別の困難な毛様体上皮を容易に鑑別することが示唆され、診断基準としての有用性が示唆された。今後症例を集積し診断基準の確立を目指す。

眼内、眼付属器、眼周囲発生固形腫瘍それぞれにおいて、臨床的課題に基づき研究解析を行い、新たな臨床疑問、仮説が明確化された。これらについて今後検証を行う必要がある。

二次がんの疫学データは収集され、既報とは異なる疾患内訳であった。保存検体からのDNA抽出を進め、ゲノム解析を行うことで診断の確度を上げるとともに鍵となる遺伝子の発見、診療体制確立を目指す。

E. 結論

多数例の腫瘍検体の収集体制、保存検体から質の高いDNA抽出を行う技術を確立した。ゲノム解析の最適化研究を行い、次年度の解析に向けた体制を確立した。眼部の形成にSOX10遺伝子発現が重要な意義を持つことを解明し、診断に応用した。二次がんの疫学情報を収集し、DNA抽出を行った。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G．研究発表

1. 論文発表
別紙 様式第19のとおり
2. 学会発表
別紙 様式第19のとおり

H．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

