

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	弘前大学医学部附属病院小児科 氏名 工藤 耕
<p>(論文題目)</p> <p>BRAF V600E-positive cells as molecular markers of bone marrow disease in pediatric Langerhans cell histiocytosis</p> <p>(小児ランゲルハンス細胞組織球症における骨髄病変としての BRAF V600E 陽性細胞の意義)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>ランゲルハンス細胞組織球症 (LCH) は、MAPK 経路の遺伝子変異を有する単核食細胞系細胞に生じる血液悪性腫瘍である。BRAFFV600E 変異は、約 60% の症例で認められ、初期治療反応性不良および再発と相関があることが報告されている。また、造血器、肝臓および脾臓に腫瘍浸潤を認めるリスク臓器 (RO) 陽性例は、再発リスクが高いとされる。この造血器浸潤を規定する血球減少は、LCH の骨髄浸潤により生じるとされ、CD1a 陽性免疫組織化学染色で診断される。しかしながら、LCH における骨髄病変 (BMD) の分子レベルでの BRAF 変異の頻度、定量性および臨床的意義は十分に解明されていない。本研究では、LCH における BMD の臨床的意義を明らかにするため、高感度な遺伝子変異解析方法を用いて、LCH における腫瘍病変および骨髄血のペア検体で体細胞変異を解析した。</p> <p>1996 年から 2021 年の期間、国内 13 施設で病理診断された LCH 腫瘍 65 検体と、ペアとなる骨髄血 41 検体を後方視的に解析した。PCR 反応増幅不良 6 検体を除いた LCH 腫瘍の計 59 検体において、LCH の体細胞変異好発部位である BRAF エクソン 12 と 15、MAP2K1 エクソン 2 と 3 の領域を次世代シーケンサー (NGS) を用いたターゲットシーケンス法により解析した。その結果、54 例 (92%) で、さまざまなアレル頻度 (範囲: 2.3–35%, 中央値 10%) で体細胞変異が検出された。BRAFF V600E 変異は全体の 33 例 (56%) で同定され、BRAFF エクソン 12 インフレーム欠失は 10 例 (17%) で検出された。また、新規変異として BRAFF V600delinsDL を同定し、活性化変異であることを確認した。</p> <p>次に、ペアとなった骨髄血 41 検体について、腫瘍での遺伝子解析で同定された体細胞変異に特異的なプライマーを設計し、変異アレル特異的ドロップレットデジタル PCR (ddPCR) 法を用いた定量的解析を行った。測定可能な BMD は変異アレル頻度が 0.01% 以上と定義した。解析可能であった 38 例について BMD の臨床的意義について検討した。</p> <p>解析の結果、治療開始前の BMD 陽性例は 38 例中 21 例 (55%) であった。BRAFF V600E 陽性 LCH に限定すると、25 例中 21 例 (84%) で検出されたが、BRAFFV600E 以外の変異タイプでは BMD は検出されなかった。</p> <p>BMD の臨床的意義に関し、BMD と LCH における 4 つの臨床病型との関係を調べたところ、多臓器型リスク臓器陽性群、多臓器型リスク臓器陰性群、多発骨型、単一臓器型における BMD 陽性率はそれぞれ 100%、54%、25%、0% であった。多臓器型リスク</p>	

臓器陽性群、多臓器型リスク臓器陰性群、多発骨型、における変異アレル頻度の中央値は、それぞれ 1.0%（範囲：0.20–7.0%）、0.030%（範囲：0–2.2%）、0%（範囲：0–0.51%）で、BMD が LCH の臨床病型を規定する可能性が示唆された（Kruskal-Wallis 検定, $P<0.001$ ）。また、BMD と年齢、増悪および再発についても検討した。BMD 陽性例は陰性例より年齢中央値が低かった（0.9 歳 対 5.4 歳, Mann-Whitney 検定, $P=0.012$ ）。さらに、診断時の BMD 陽性 21 例の増悪および再発の累積発生率は、BMD 陰性 17 例に比較し高かった（79% 対 36%, ログランク検定, $P=0.006$ ）。このことから、BMD 陽性は再発リスク因子であることが示唆された。

変異陽性細胞の起源を特定するために、骨髓血と末梢血単核球の 13 症例のペア検体 31 検体で変異アレル頻度を測定し比較した。BRAF V600E の変異アレル頻度中央値は、骨髓血で 0.65%（範囲：0.016–6.7%）、末梢血単核球で 0.16%（範囲：0–4.0%）で、前者で変異量が高かった（ペア t 検定, $P<0.001$ ）。これらの結果から、BRAF V600E 陽性 LCH における腫瘍起源は、末梢血ではなく骨髓血であることが示唆された。さらに、治療中の複数の時点で検体が得られた 12 例において、BMD を測定した。難治性の経過を示す症例において、治療中も高い BRAFV600E 変異アレル頻度を示したことから、化学療法後も持続し陽性を示す BMD は、BRAF V600E 陽性 LCH において、微小残存病変として治療標的となる可能性があることが示唆された。

最期に、BRAFV600E 陽性 25 例において、現在の骨髓浸潤の診断基準である血球減少および CD1a の陽性率を BMD の陽性率と比較した。BMD の陽性率 84% に対し、血球減少は 32%、CD1a 免疫染色陽性は 11% で認められ、BMD が最も鋭敏に骨髓病変を検出可能であることが示唆された。

結論として、BRAF V600E 陽性の小児 LCH では、BMD が高頻度に認められ、骨髓血における遺伝子変異陽性細胞を反映する BMD は、これまで高リスク群とされる、リスク臓器陽性多臓器型 LCH および低年齢群と、相関を認めた。さらに BMD は、治療中の増悪および再発と有意に相関を示し、臨床的に重要な予後因子であることが示され、血球減少や CD1a 陽性に代替え可能な新規予後因子であることが示唆された。今後、前向き大規模臨床試験での検証が期待される。