

平成22年 5月14日現在

研究種目：	基盤研究 (A)
研究期間：	2007 ~ 2009
課題番号：	19209054
研究課題名 (和文)	神経芽腫臨床試験を基盤とした基礎医学的研究および トランスレーショナルリサーチ
研究課題名 (英文)	molecular analyses and translational research of neuroblastoma based upon a clinical trial of the nation-wide group study
研究代表者	
	金子 道夫 (KANEKO MICHIO)
	筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
	研究者番号： 60152807

研究成果の概要 (和文)：

日本神経芽腫スタディグループによる高リスク群対象の第II相臨床試験に、61症例が登録され、現在、プロトコル治療終了後の臨床経過を追跡中である。余剰検体を用いた付随研究等のトランスレーショナルリサーチを行い、全ゲノム的スクリーニング、遺伝子発現スクリーニング、*ALK*をはじめとする特定の遺伝子の変異・増幅分析を実施した。これら本研究の実績は、将来への学術的遺産である。

研究成果の概要 (英文)：

There registered 61 cases with high risk neuroblastoma, on a clinical trial protocol of Japan Neuroblastoma Study Group (JNBSG). The cohort is now under clinical observation after a protocol therapy. Each biopsy sample at initial diagnosis was analysed by array-CGH, gene expression array, and amplification/mutation of a gene for example *ALK*. Much scientific information will be revealed after collecting the clinical out come of the cohort.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2008年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2009年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
年度			
年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：小児腫瘍学，神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は希少疾患の1つでもあるが、小児固形悪性腫瘍の中では最も多い。癌遺伝子であるMYCNの増幅を伴うものに代表されるように悪性度が高い場合は集学的治療に抵抗し進行が非常に早い。一方で、診断時に遠隔転移を伴っていても腫瘍細胞自体が分化成熟傾向を持ち、悪性腫瘍としての性質を失ってゆく1群をステージ4sと呼び、乳児期に多くみられる。以上のように、臨床腫瘍学的性質は非常に多様であり、学術的課題が非常に多いことが明らかである。

本疾患の研究を進めるにあたり、大きな制約条件となっていたのが、希少疾患ということである。神経芽腫に対する種々の研究を推進するために幅広く協力体制を構築する必要性があり、2006年5月に、本研究計画の研究代表者である金子道夫が初代会長となり日本神経芽腫スタディグループJNBSGを発足させた。全国的多施設共同臨床研究とリンクさせてtranslational researchを含めた基礎医学的研究を推進することが可能になった。

2. 研究の目的

基礎医学研究と臨床研究、および両者をつなぐトランスレーショナルリサーチを同時多発的に行い、神経芽腫のバイオロジーおよび免疫反応を含む宿主側反応の解明を通して、新規治療戦略・新規薬剤を開発し、治療の有効性と安全性との向上を果たす。

3. 研究の方法

(1) 全国的臨床試験の実施

①「進行神経芽腫に対し原発巣切除術を含む局所療法を大量化学療法後に遅延させて行う治療計画(遅延局所療法 delayed local treatment)の早期第II相臨床試験」(研究分担者: 麦島秀雄)、

②「高リスク神経芽腫に対する標準治療確立に関する臨床試験」(研究分担者: 熊谷昌明)

を実施する。これら前向き臨床試験登録症例の中央診断検体を使用した付随研究、さらに余剰検体を使用して行う研究を推進する。

(2) 臨床研究の基盤を利用した基礎医学的研究・トランスレーショナルリサーチ

臨床研究に附随した予後因子評価システムの検討

数年来検討中の国際的神経芽腫リスク分類を見据えて、わが国の統一した中央バイオロジー診断システムを構築する。2006年に発足した日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)の登録例の腫瘍組織を用いて、DNA ploidyとMYCNコピー数(FISH法と定量的real-time PCR法)を検索するとともに、染色体11番長腕(11q23)の欠失、および染色体1番短腕(1p36)の欠失をFISH法にて行う系を構築する。

①神経芽腫のゲノム異常

2430 BAC クローンを搭載したアレイ CGH を用いた研究により中川原らが確認した予後と関連する神経芽腫の3種のゲノム異常グループ(silent, partial chromosomal gains/losses, whole chromosomal gains)のみを抽出した層別化用簡易ミニゲノムチップを作製し、前向き観察研究を行う。

②神経芽腫の遺伝子発現様式

世界に先駆けて、わが国では神経芽腫予後予測用実用化ミニチップを開発し、遺伝子発現様式を統計処理してポステリア値として0.0~1.0の範囲で示す手法として、すでにカスタム化に成功している。しかし、予後予測用マイクロアレイは新しい治療プロトコルに附随した前向き研究として、常に進化させる必要がある。そこで、JNBSGプロトコルの附随研究として、前向きマイクロアレイ研究を行い、第2世代の神経芽腫予後予測用実用化ミニチップを開発する。

③遺伝子のメチル化と予後

神経芽腫細胞株9種類に、脱メチル化剤である

5-aza-2'-deoxycytidine (5aza-dC)により脱メチル化処理を行い、回収した RNA を用いて半定量 RT-PCR を行う。

5種類以上の細胞株で脱メチル化処理後に発現回復を認めた5つの遺伝子の1つ、エンドセリン転換酵素様遺伝子 *ECEL1* を対象とし、9種類の神経芽腫細胞株および112例の臨床発見症例について、ゲノム DNA を bisulfite 処理し、Methylation-specific PCR (MSP) を行った。また、定量 RT-PCR による発現レベルを解析する。

更に神経芽腫のメチル化修飾の異常を網羅的に検出することを目的として、10例の神経芽腫検体について MeDIP-on-Chip アッセイを行う。

④血清 *MYCN* と臨床経過との関連に関する研究

家原らのオリジナルなアイデアである。TaqMan PCR を用いた方法で、血清 *MYCN*-DNA コピー数を測定する。1) 非増幅例 (閾値未満)、2) 低増幅例 (閾値以上~10倍未満) と 3) 高増幅例 (10倍以上) の3群に分け、各々の生存率 (全生存率と無病生存率) の差を Kaplan-Meier 法と Logrank test で検討する。また、*MYCN* 増幅例では、血清 DNA の *MYCN* コピー数を継時的に測定し、治療効果、再発との関係を検討する。

(3) 探索的な新規治療研究

①細胞免疫療法

治療抵抗性の神経芽腫症例を対象として、同種造血幹細胞移植を実施し、移植片対腫瘍反応が観察されるかどうかを確認し、同種免疫が抗腫瘍効果を有するか否かを検証する。

一方で、同種細胞ではなく、自己の細胞を用いた免疫療法を実用化する。センダイウイルスベクター (SeV) を使用すると樹状細胞そのものの活性を高めることが既に確認されている。神経芽腫のマウス皮下担がんモデルを作成し、SeV により活性化させた樹状細胞

(DC) を腫瘍内に投与してその有効性を検討する。無治療群、tumor lysate のみで刺激した樹状細胞、LPS+tumor lysate で刺激した樹状細胞、tumor lysate+SeV で刺激した樹状細胞をそれぞれ用いて腫瘍抑制効果を比較する。無治療群に比べて tumor lysate+SeV で刺激した樹状細胞を用いた群の腫瘍抑制効果が高まることを確認する。また MHC class I 発現増強効果をもつ IFN- β を搭載した SeV-IFN β を用いると腫瘍抑制効果増強の有無を解析する。

更に担がん小児の末梢血単核細胞を用いて、SeV 導入前後の免疫機能を分析する。

②分子標的療法

神経芽腫の分化誘導を目指した分子標的治療モデルを開発するために、以下の A と B との2つの解析を行う。A: Wnt シグナル系の主要遺伝子である β -catenin 遺伝子を強制発現させ、分化誘導を試みる。B: *MYCN* 発現抑制を行って分化誘導を試みる。

神経芽腫の遺伝子治療薬としてのピロール・イミダゾールポリアミドの開発を行う。ピロール・イミダゾールポリアミドは1996年に米国 Dervan らによって発見された化合物で、遺伝子 DNA のマイナーグループに結合し塩基特異性に遺伝子配列を認識し、遺伝子発現を抑制出来る。*MYCN* 遺伝子のプロモーター領域に結合するピロールで、イミダゾールポリアミドまたはコーディング領域にアルキル化能を持たせ、更に細胞透過性および核移行性の高くする分子設計を工夫する。神経芽腫マウスに対する腫瘍抑制効果の確認をする。合成したピロール・イミダゾールポリアミドの組織移行性、経口での薬物動態を検討し、経口投与可能な遺伝子治療薬としての確立を行う。

③薬物療法等

シンドビスウイルスを用いた腫瘍融解療法の有効性の確認を、ヌードマウスにヒト神経芽腫細胞株を移植した実験系を使用して確認する。更に CPT-11 の抗腫瘍効果を高める併用療法を開発す

るため、ヌードマウスへのヒト神経芽腫細胞株移植系を使用して、*in vivo*解析を行った。

4. 研究成果

(1) 全国的臨床試験の実施

①「進行神経芽腫に対し原発巣切除術を含む局所療法を大量化学療法後に遅延させて行う治療計画(遅延局所療法 delayed local treatment)の早期第 II 相臨床試験」(研究分担者: 麦島秀雄)では 11 症例、一方の②「高リスク神経芽腫に対する標準治療確立に関する臨床試験」(研究分担者: 熊谷昌明)では 50 症例の登録が得られた。前者では既に研究機関を終了し、詳細な統計解析を行っている段階である。後者では、プロトコール治療を終了し、経過追跡期間中である。

(2) 臨床研究の基盤を利用した基礎医学的研究・トランスレーショナルリサーチ

①神経芽腫のゲノム異常

アレイ CGH を用いた研究によって、silent, partial chromosomal gains/losses, および whole chromosomal gains の予後の異なる 3 群に分類できることを確認した。将来の臨床的実用化に向けて、迅速診断に用いられるミニゲノムチップを作成して、臨床試験登録症例において検証作業を行っている。

更に、MYCN 増幅と病理組織との比較検討によって、以下のことを確認した。即ち、Favorable Histology を示す MYCN 増幅神経芽腫は非常に稀であり、自験例では全例 18 か月未満、副腎原発であった。組織学的には、通常の poorly diff. low MKI の像であり、MYCN 増幅神経芽腫に特徴的な high MKI、大型核小体は認められなかった。全例 FISH 法にて MYCN 増幅を示したが、MYCN 蛋白発現は認められず、これが MYCN 増幅と組織像との乖離の原因と考えられた。Favorable Histology を示す MYCN 増幅神経芽腫には予後良好な症例がある可能性が示唆された。

一方で、SNP array の解析によって、同時性、異時性腫瘍の中に明らかな heterogeneity を認める腫瘍が存在し、ゲノム異常は時間、空間的に変動することを示した。

②神経芽腫の遺伝子発現様式

既にわが国で実用化した神経芽腫専用の発現チップが、現在用いられている標準治療において妥当かどうかを、全国的臨床試験において検証中である。

一方で、予後不良例で発現が亢進している遺伝子を ON/OFF に加えて、AND/OR 遺伝子としての解析を試みた。MYCN 遺伝子と相反して OR の関連で発現が増強している遺伝子を見出した。

③遺伝子のメチル化と予後

ECE1 の mRNA 発現レベルは、神経芽腫の予後と強い相関を示した(高い発現が良好な予後と相関、 $p=0.003$)。今回検討した 9 種類の神経芽腫細胞株では、5-aza-dC 処理前後において 6 種類の細胞株で *ECE1* 遺伝子の mRNA 発現の増強を認めた。プライマリー腫瘍に比べ細胞株における *ECE1* の発現は低く抑えられていた。*ECE1* ゲノム領域は、神経芽腫細胞株で高頻度にメチル化されており(6/9, 67%)、メチル化の有無は 5-aza-dC 処理後の発現の増強の有無とはほぼ一致していた。*ECE1* のメチル化症例群は非メチル化症例群に比較して発現レベルは低い傾向があり($p=0.06$)、メチル化が検出された症例群の予後は有意に不良であった($p=0.002$)。

更に、神経芽腫のメチル化修飾の異常を網羅的に検出することを目的として、10 例の神経芽腫検体について MeDIP-on-Chip アッセイを行った。MeDIP-on-Chip はメチル化修飾の異常を検出する有効なアッセイであり、抗メチル化ヒストン抗体などを用いることにより、エピゲノム修飾の状態をも網羅的に解析することが可能であった。*RASSF1*, *CASP8*, *TSP1*, *MDR1* などのメチル化が共通して検出された。

④定量 PCR による血清 MYCN 増幅の定量法を確立

した。87例の神経芽腫症例での検討で、高増幅および低増幅（10倍未満）が検出可能であること、腫瘍組織 *MYCN* 増幅と血清 *MYCN* 増幅の相関があることを確認した。また、血清 *MYCN* 増幅が、後の病理組織診断による *MYCN* 増幅を予見可能であることを実際の臨床例で確認した。

11 番染色体長腕の欠失等の候補遺伝子を複数抽出し、臨床試験における付随研究として検証中である。

更に、血清 *DCR2* のメチル化を標的として用いた解析では、治療の経過とともに血清 *DCR2* M/R ratio が変動し、血清を用いた治療効果判定マーカーとして有用となる可能性が示唆された。

(3) 探索的な新規治療研究

① 細胞免疫療法

治療抵抗性神経芽腫に対するT細胞非除去HLA半合致ドナーからの同種造血幹細胞移植の臨床試験を行い、一部の症例において、移植片対宿主病GVHDの発症と時期を同じくして腫瘍塊の縮小を観察した。免疫療法実現の可能性を示唆する所見である。

自家樹状細胞を使用した細胞免疫療法のための基礎的検討を行った。抗腫瘍効果を高めるために、センダイウイルスベクターによる遺伝子治療を応用したものである。マウス神経芽腫C1300に対するセンダイウイルスベクター作用樹状細胞(SeV/DC)の抗腫瘍効果は、腫瘍局所にX線を前照射することにより強力に増強され、十分に生着・発育した腫瘍に対しても著しい抗腫瘍効果を示した。放射線前照射によりSeV/DC療法が誘導する抗腫瘍免疫は、腫瘍特異的なCTL活性を増強し長期メモリーを成立させる。C1300に対してSeV/DC療法が誘導する抗腫瘍免疫において、原発巣の縮小に関してはCD4陽性T細胞、腫瘍再移植時ではCD8陽性T細胞が重

要であることが確認された。放射線前照射併用SeV/DC療法は、SeV/DCを腫瘍内投与することで直接治療を施行していない遠隔部腫瘍にも効果が認められた。

小児がん患者の末梢血単核球より、単球を分離し、樹状細胞に分化させることが可能であった。更にこの樹状細胞は、センダイウイルスベクターによって遺伝子導入可能であった。得られた樹状細胞にセンダイウイルスベクターを作用させる前後で表面マーカーの発現レベルに著変はなく、炎症性サイトカインの誘導が認められた。センダイウイルスベクターにて活性化された樹状細胞による新規免疫治療は、小児がん患者に対しても臨床応用可能であることが示された。

② 分子標的療法

分化誘導療法の探索として、A：変異型β-catenin導入によるWntシグナル系賦活を行うことによって神経芽腫細胞の分化誘導を行うことができた。B：*MYCN*発現抑制を行うことにより、神経芽腫細胞の分化誘導を行うことができた。以上から、これらは神経芽腫新規治療の標的分子となり得ると考えられた。

腫瘍細胞に対して効率よい増殖抑制活性を有するピロール・イミダゾールポリアミドを作成するために、腫瘍細胞株(HeLa)を使用して*in vitro*の基礎的研究を行った結果、候補となるものが確認された。これは神経芽腫細胞株に対しても増殖抑制効果を有し、今後は*in vivo*効果確認おこなう計画である。

③ 薬物療法等

シンドビスウイルスの腫瘍融解効果を、*in vivo*で確認した。

ヌードマウスにヒト神経芽腫細胞株を移植して行った研究によって、CPT-11単独投与と比較して、celecoxibまたはセレン化合物Se-(Methyl)selenocysteineの併用投与において、抗腫瘍効果の増強が確認できた。後者では副作用軽減効果も観察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[論文雑誌] (計 21 件)

1. 金子節子、金子道夫、ヒト神経芽腫および横紋筋肉腫移植マウス腫瘍に対する CPT-11 の抗腫瘍効果、小児がん、査読有、47(1)、2010、98-104
2. Kaneko M, Kaneko S, Suzuki K, Prolonged Low-dose Administration of the Cyclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib Enhances the Antitumor Activity of Irinotecan against Neuroblastoma Xenografts, Cancer Science, 査読有、100(11), 2009, 2193-2201
3. 金子道夫、小児外科疾患術後患者の長期予後 -成人期における諸問題- 7. 小児悪性固形腫瘍、日本外科学会誌、査読有、110(4)、2009、203-206
4. Cohn SL, Iehara T, et al., The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report, J Clin Oncol, 査読有、27(2), 2009, 289-297

[学会発表] (計 26 件)

1. 金子節子、鈴木健之、金子道夫、COX-2 阻害剤 celecoxib はヒト神経芽腫移植マウス腫瘍に対する CPT-11 の抗腫瘍効果を増強する、第 46 回日本小児外科学会、2009. 6. 1-3、大阪
2. Hiyama E, Telomere biology in neuroblastoma: Focusing on telomere binding proteins and alternative strengthening of telomere, 42nd Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2009. 5. 13, 香港
3. Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Matsuzaki A, Hara T, Taguchi T, Risks and benefits of ending of mass screening for neuroblastoma at 6 months of age in Japan, 42nd Annual Meeting Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2009. 5. 10-14, 香港

[図書] (計 1 件)

1. Hiyama E, et al., Transworld Research Network, Clinical Application of Molecular Diagnosis, 2009, 220

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 道夫 (KANEKO MICHIO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：60152807

(2) 研究分担者

林 富 (HAYASHI YUTAKA)
東北大学・医学部・教授
研究者番号：40125638
(H19)
家原 知子 (IEHARA TOMOKO)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20285266
麦島 秀雄 (MUGISHIMA HIDEO)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：80183648
檜山 英三 (HIYAMA EIZO)
広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
研究者番号：00218744
田尻 達郎 (TAJIRI TATSURO)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：80304806
菊田 敦 (KIKUTA ATSUSHI)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：40224894
菱木 知郎 (HISHIKI TOMORO)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00375776
福澤 正洋 (FUKUZAWA MASAHIRO)
大阪大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60165272
熊谷 昌明 (KUMAGAI MASAOKI)
国立成育医療センター・血液科・医長
研究者番号：60170049
林 泰秀 (HAYASHI YASUhide)
群馬県衛生環境研究所・群馬県立小児医療センター・研究員
研究者番号：30238133
大平 美紀 (OHIRA MIKI)
千葉県がんセンター (研究所)・臨床ゲノムセンター・室長
研究者番号：20311384
中川 温子 (NAKAGAWA ATSUKO)
国立成育医療センター (研究所)・臨床検査部・医長
研究者番号：90227736
福島 敬 (FUKUSHIMA TAKASHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：30323299