

令和元年6月20日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11347

研究課題名(和文) 小児固形悪性腫瘍に対する、免疫学的糖鎖解析法を用いた新規診断システム法の開発

研究課題名(英文) Establishment of new diagnostic system for pediatric malignant solid tumors by immunological glycan analysis

研究代表者

木下 義晶 (Kinoshita, Yoshiaki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80345529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：代表的腫瘍マーカーであるAFP (Alpha-feto protein) には3つの分画(L1, L2, L3)がある。本研究では免疫学的手法、質量分析法などを用いてL2分画をL3より分離して測定することを可能にし、非侵襲的新規簡易診断システムの開発を行うことを目的とした。小児固形悪性腫瘍患者、および良性疾患患者の児(対照群)の血清検体、組織検体を用い、免疫電気泳動法によるL2分画の分離、定量化により得られたデータより新生児期・乳児期における生理的L2分画の基準値設定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人の肝細胞癌ではL3分画が特異的に高値を示す。採血検体からL3分画を簡易的に測定できるシステムが1990年代後半に確立されたが、この診断システムは分析方法の限界によりL2とL3分画を分離して測定できないため、測定値にはL2値を含む。

小児期においては生理的にL2分画が新生児期～幼児期には高いこと、小児固形悪性腫瘍としてはL2分画が高いとされる卵黄嚢癌、L3分画が高いとされる肝芽腫があることなどより、このシステムではL3分画が高値と測定されても生理的高値なのか、卵黄嚢腫瘍成分を反映しているのか、肝腫瘍成分を反映しているのかを区別することは臨床的・学術的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：There are three fractions (L1, L2, L3) in AFP (Alpha-feto protein) which is a typical tumor marker. Purpose of this project is to separate L2 fraction from L3 using an immunology and mass spectrography, and establish non-invasive simple diagnostic system. By immuno electrophoresis method using serum and tissue samples obtained from patients (target) with solid malignant tumors and benign diseases (control), physiological regression of L2 fraction was developed

研究分野：小児外科

キーワード：小児固形悪性腫瘍 免疫学的糖鎖解析法 AFP 診断システム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

代表的腫瘍マーカーである AFP (Alpha - feto protein) には 3 つの分画(L1,L2,L3)があり、成人の肝細胞癌では L3 分画が特異的に高値を示す。採血検体から L3 分画を簡易的に測定できるシステムが 1990 年代後半に確立されたが、この診断システムは分析方法の限界により L2 と L3 分画を分離して測定できないため、測定値には L2 値を含む。小児期においては生理的に L2 分画が新生児期～幼児期には高いこと、小児固形悪性腫瘍としては L2 分画が高いとされる卵黄嚢癌、L3 分画が高いとされる肝芽腫があることなどより、このシステムでは L3 分画が高値と測定されても生理的高値なのか、卵黄嚢腫瘍成分を反映しているのか、肝腫瘍成分を反映しているのか区別できない。

### 2. 研究の目的

本研究では免疫学的手法、質量分析法などを用いて L2 分画を L3 より分離して測定することを可能にし、非侵襲的新規簡易診断システムの開発を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究材料として小児固形悪性腫瘍患者 150 例 (被験者群)、および良性疾患患者・術後経過観察中の児 100 例 (対照群) の血清検体、組織検体を対象とした。

1) Con A レクチンを用いた免疫電気泳動法による L2 分画の分離、定量化新生児期・乳児期における生理的 L2 分画の基準値設定と AFP 生理的減衰曲線との対比

AFP は糖タンパク質の一種で、糖鎖構造の違いからレンズ豆レクチンゲル (LCA) による電気泳動で 3 つの分画 (L1, L2, L3) に分離できる (図 1)。レンズ豆レクチンゲルにおける電気泳動では、L2 分画と L3 分画を完全に分離できない。しかし、ジャック豆レクチン (Concanavalin A: Con A) を用いると、L2 分画と L1 分画・L3 分画を分離できる (図 2)。そこで、被験者群ならびに対照群の血清中 L2 分画を、Con A を用いたレクチンゲル電気泳動法により分離する。

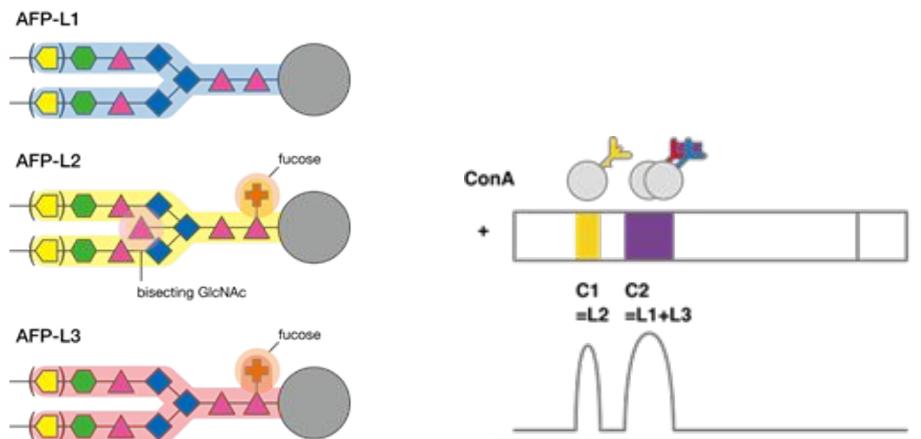


図 1 : 糖鎖の違いによる AFP3 分画 図 2 : Con A レクチンを用いた L2 分画の分離

2) 新生児期・乳児期における生理的 L2 分画の基準値設定

対照群のうち、生後 12 か月未満の新生児・乳児症例について、Con A を用いたレクチンゲル電気泳動で L2 分画値を求め、採血時日齢と L2 分画の割合をプロットし、推移曲線を描出する。

### 4. 研究成果

1) Con A レクチンを用いた免疫電気泳動法による L2 分画の分離、定量化新生児期・乳児期における生理的 L2 分画の基準値設定

1 歳未満の小児においては共通して L2 を示唆するバンドが認められた。さらに、抗 AFP 抗体

を結合した膜にプロットングを行った。(図3、図4、図5)

1 ヶ月、女児、肝血管腫

年齢	AFP(ng/ml)	L3(%)従来測定法
1m	2805.4	41.4
2m	680.5	74.3
4m	177.8	99.5
6m	74.4	<0.5
11m	14.4	<0.5

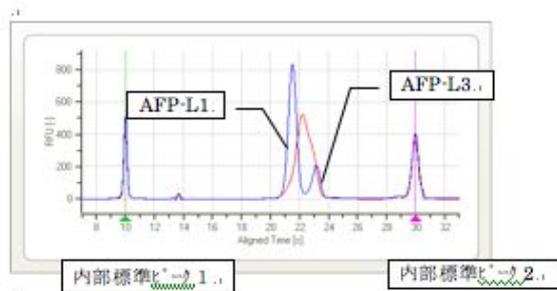
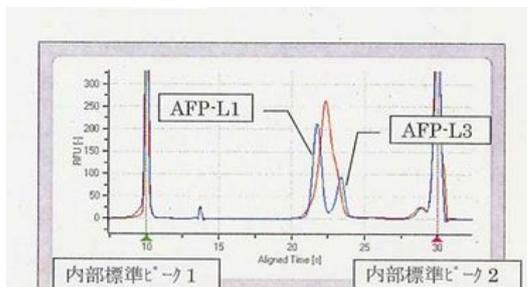


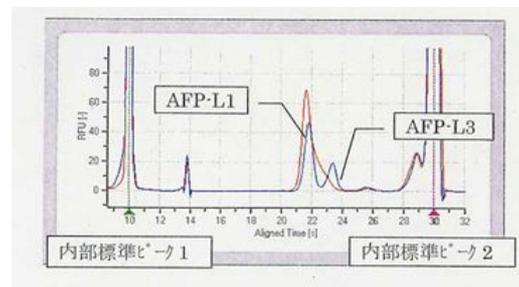
図3：4 ヶ月時のサンプル解析結果

AFP 177.8ng/ml L3(L2+L3) 99.5%



6 ヶ月時のサンプル解析結果

図4：AFP 74.4ng/ml, L3(L2+L3) <0.5%



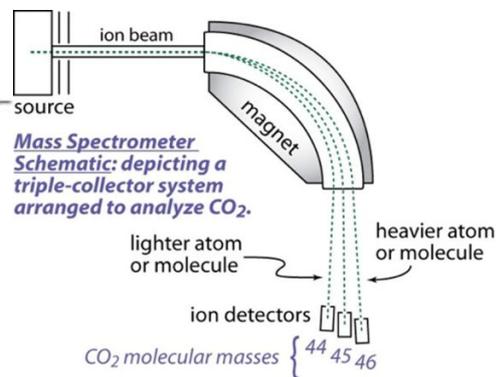
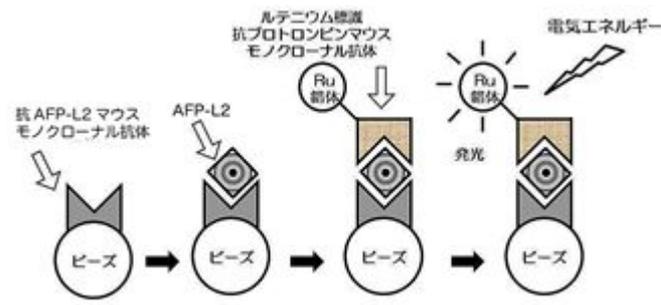
11 ヶ月時のサンプル解析結果

図5：AFP 14.4ng/ml, L3(L2+L3) <0.5%

2) 質量分析法による精製糖鎖%L2の測定

糖鎖解析に最適化した FT-MS 定性分析、LC-MS MRM モードによる AFP-L2 分画定量法の確立と Mass Spectrometry を用いた質量分析法

現在糖鎖抗原に対するモノクローナル抗体の作製と ECLIA 法による L2 分画測定ならびに、病理組織学的解析、質量分析法による精製糖鎖%L2 の測定を行い、データの整合性を検討している。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計17件)

1. Kawakubo N, Kinoshita Y, Souzaki R, Koga Y, Oba U, Ohga S, Taguchi T. The Influence of Sarcopenia on High-Risk Neuroblastoma. J Surg Res. 236(4):101-105, 2019

2. Shibui Y, Miyoshi K, Kohashi K, Kinoshita Y, Kuda M, Yamamoto H, Taguchi T, Oda Y. Glypican-3 expression in malignant small round cell tumors. *Oncol Lett.* 17(3):3523-3528, 2019
3. Ozeki M, Asada R, Saito AM, Hashimoto H, Fujimura T, Kuroda T, Ueno S, Watanabe S, Nosaka S, Miyasaka M, Umezawa A, Matsuoka K, Maekawa T, Yamada Y, Fujino A, Hirakawa S, Furukawa T, Tajiri T, Kinoshita Y, Souzaki R, Fukao T. Efficacy and safety of sirolimus treatment for intractable lymphatic anomalies: A study protocol for an open-label, single-arm, multicenter, prospective study (SILA). *Regen Ther.* 14(10):84-91, 2019
4. Ueno S, Fujino A, Morikawa Y, Iwanaka T, Kinoshita Y, Ozeki M, Nosaka S, Matsuoka K, Usui N. Indications for tracheostomy in children with head and neck lymphatic malformation: analysis of a nationwide survey in Japan. *Surg Today.* 49(5):410-419, 2019
5. Kubota M, Osuga Y, Kato K, Ishikura K, Kaneko K, Akazawa K, Yonekura T, Tazuke Y, Ieiri S, Fujino A, Ueno S, Hayashi Y, Yoshino K, Yanai T, Iwai J, Yamaguchi T, Amae S, Yamazaki Y, Sugita Y, Kohno M, Kanamori Y, Bitoh Y, Shinkai M, Ohno Y, Kinoshita Y. Treatment guidelines for persistent cloaca, cloacal exstrophy, and Mayer-Rokitansky-Küster-Häuser syndrome for the appropriate transitional care of patients. *Surg Today.* Epub ahead of print, 2019
6. Ueno S, Fujino A, Morikawa Y, Iwanaka T, Kinoshita Y, Ozeki M, Nosaka S, Matsuoka K, Usui N. Treatment of mediastinal lymphatic malformation in children: an analysis of a nationwide survey in Japan. *Surg Today.* 48(7):716-725, 2018
7. Souzaki R, Kawakubo N, Miyoshi K, Obata S, Kinoshita Y, Takemoto J, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T. The Utility of Muscle-Sparing Axillar Skin Crease Incision with Thoracoscopic Surgery in Children. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 28(11):1378-1382, 2018
8. Kawakubo N, Harada Y, Ishii M, Souzaki R, Kinoshita Y, Tajiri T, Taguchi T, Yonemitsu Y. Natural antibody against neuroblastoma of TH-MYCN transgenic mice does not correlate with spontaneous regression. *Biochem Biophys Res Commun.* 503(3):1666-1673, 2018
9. Kawakubo N, Kinoshita Y, Souzaki R, Koga Y, Oba U, Ohga S, Taguchi T. The Influence of Sarcopenia on High-Risk Neuroblastoma.
10. Yoshimaru K, Kinoshita Y, Yanagi Y, Obata S, Jimbo T, Iwanaka T, Takahashi Y, Esumi G, Miyata JA, Matsuura T, Izaki T, Taguchi T. The evaluation of rectal mucosal punch biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease: a 30-year experience of 954 patients. *Pediatr Surg Int.* 33(2):173-179, 2017
11. Yoshimaru K, Kinoshita Y, Shono T. The Safety and Efficacy of Laparoscopic Percutaneous Extraperitoneal Closure for Inguinal Hernia in Neonates and Infants Younger than 1 Year of Age in Comparison to Older Patients. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 27(1):91-96, 2017
12. Yoshimaru K, Taguchi T, Obata S, Takemoto J, Takahashi Y, Iwanaka T, Yanagi Y, Kuda M, Miyoshi K, Matsuura T, Kinoshita Y, Yoshioka T, Nakazawa A, Oda Y. Immunostaining for Hu C/D and CD56 is useful for a definitive histopathological diagnosis of congenital and acquired isolated hypoganglionosis. *Virchows Arch.* 470(6):679-685, 2017

13. Yoshimaru K, Matsuura T, Kinoshita Y, Hayashida M, Takahashi Y, Yanagi Y, Harimoto N, Ikegami T, Uchiyama H, Yoshizumi T, Maehara Y, Taguchi T. Graft reduction using a powered stapler in pediatric living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 21(6): Epub, 2017
14. Tanaka M, Kohashi K, Kushitani K, Yoshida M, Kurihara S, Kawashima M, Ueda Y, Souzaki R, Kinoshita Y, Oda Y, Takeshima Y, Hiyama E, Taguchi T, Tanaka Y. Inflammatory myofibroblastic tumors of the lung carrying a chimeric A2M-ALK gene: report of 2 infantile cases and review of the differential diagnosis of infantile pulmonary lesions. *Hum Pathol*. 66:177-182, 2017
15. Hayashida M, Matsuura T, Kinoshita Y, Esumi G, Yoshimaru K, Yanagi Y, Takahashi Y, Taguchi T. The parameters that help to differentiate biliary atresia from other diseases. *Pediatr Int*. Epub, 2017
16. Kawakubo N, Tanaka S, Kinoshita Y, Tajiri T, Yonemitsu Y, Taguchi T. Sequential actions of immune effector cells induced by viral activation of dendritic cells to eliminate murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg*. Epub, 2017
17. Tsuchiya N, Hosono A, Yoshikawa T, Shoda K, Nosaka K, Shimomura M, Hara J, Nitani C, Manabe A, Yoshihara H, Hosoya Y, Kaneda H, Kinoshita Y, Kohashi K, Yoshimura K, Fujinami N, Saito K, Mizuno S, Nakatsura T. Phase I study of glypican-3-derived peptide vaccine therapy for patients with refractory pediatric solid tumors. *Oncoimmunology*. 27;7(1):e1377872, 2017

〔学会発表〕(計 19 件)

1. Kinoshita Y, Hosoi H, Miyachi M, Nozawa K, Ohkita H, Soejima T. Meet The Expert 6 Tumor Board Sarcoma. SIOP 2018. Nov 16-19. Kyoto
2. 木下義晶、伊崎智子、三好きな、加藤聖子、窪田正幸、田口智章、総排泄腔外反症における性差医療、第 11 回日本性差医学・医療学会学術集会、2018.1.20-21、福岡
3. 木下義晶、横紋筋肉腫における QOL を重視した外科治療戦略、第 55 回日本小児外科学会 2018.5.30-6.1、新潟
4. 木下義晶、鈴木信、中田光政、北河徳彦、新開統子、金田英秀、東真弓、本多昌平、風間理郎、鈴木完、小松秀吾、荒井勇樹、脇坂宗親、近藤知史、高間勇一、栗原将、宗崎良太、田尻達郎、日本小児外科学会における小児の外科的悪性腫瘍の登録について(これまでとこれから)、第 55 回日本小児外科学会、2018.5.30-6.1、新潟
5. 木下義晶、田口智章、小児外科医が取得すべき専門医資格について(九州地区をモデルとして)、第 55 回日本小児外科学会、2018.5.30-6.1、新潟
6. 木下義晶、小児先天性水腎症診療手引き追補尿道疾患、第 27 回日本小児泌尿器科学会、2018.6.26-28、金沢
7. 木下義晶、小児泌尿器腫瘍、第 27 回日本小児泌尿器科学会、2018.6.26-28、金沢
8. Kinoshita Y、Treatment strategy for rhabdomyosarcoma (from the point of view of pediatric surgeon)、第 56 回日本癌治療学会、2018.10.18-20、横浜
9. 木下義晶、窪田正幸、小林隆、荒井勇樹、大山俊之、横田直樹、齋藤浩一、総排泄腔遺残に対する腔形成術として skin-flap 法を行った 2 例、第 38 回日本小児内視鏡外科・手術手技研究会、2018.10.25-26、東京
10. 木下義晶、窪田正幸、小林隆、荒井勇樹、大山俊之、横田直樹、齋藤浩一、総排泄腔異常症の思春期以降の機能的予後についての検討、第 34 回日本小児外科学会秋季シンポジウム、2018.10.27
11. Kinoshita Y、The role of surgery for the treatment strategy of rhabdomyosarcoma、第 60 回日本小児血液・がん学会学術集会、2018.11.14-16、京都
12. 木下義明、日本小児血液・がん学会疾患登録における 固形腫瘍新登録システムについて、第 60 回日本小児血液・がん学会学術集会、2018.11.14-16、京都

〔図書〕(計4件)

1. 臍の外科(小児の臍疾患治療と臍を利用した手術)

Sutureless abdominal closure の実際

メジカルビュー社 2018(分担執筆)総ページ数278

2. 【先天性高インスリン血症ガイドライン】外科的治療

日本小児内分泌学会 日本小児外科学会 on line 2017(分担執筆)

3. 【難治性血管腫・血管奇形・リンパ管腫・リンパ管腫症および関連疾患についての調査研究  
血管腫・血管奇形・リンパ管奇形診療ガイドライン2017】

(編集)三村秀文 on line 2017(分担執筆)

4. 先天性難治性稀少泌尿器疾患群(総排泄腔遺残症、総排泄腔外反 症、MRKH 症候群)にお  
けるスムーズな成人期医療移行のための分類・診断・治療ガイドライン メジカルビュー社、2017  
(分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 田口 智章

ローマ字氏名: Taguchi Tomoaki

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 医学研究院

職名: 教授

研究者番号(8桁): 20197247

研究分担者氏名: 宗崎 良太

ローマ字氏名: Souzaki Ryota

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 医学研究院

職名: 講師

研究者番号(8桁): 10403990

研究分担者氏名: 瀬戸山 大樹

ローマ字氏名: Setoyama Daiki

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 大学病院

職名: 助教

研究者番号(8桁): 30550850

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。