

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02880

研究課題名（和文）全てのサブグループを網羅した神経芽腫患者由来PDXライブラリーの構築

研究課題名（英文）Generation of neuroblastoma patient-derived PDX library covering all subtypes

研究代表者

梅田 雄嗣（Umeda, Katsutsugu）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80397538

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：日本小児がん研究グループ（JCCG）を母体とした前向き観察研究「神経芽腫患者由来異種移植ライブラリーの構築」を2021年6月より開始した。約2年9ヶ月が経過した時点で、38医療機関が研究に参加し、難治性神経芽腫30症例の新鮮腫瘍組織または骨髄を免疫不全マウスに移植し、うち2つの予後不良なサブグループ群（MYCN増幅、ALK遺伝子異常）の各1例を含む4例で患者由来異種移植（PDX）マウスを樹立した。現在、生着した腫瘍の大量増幅、サブグループの特定、臨床情報を合わせた統合データの作成、他の研究施設へのPDXマウスの供給体制の整備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大半の神経芽腫症例では診断のために生検のみが実施され、十分な腫瘍を確保できないため、患者検体を用いた研究は限られている。PDXモデルの最大の利点は大量に増殖した腫瘍を用いた多属性オミックス解析や前臨床試験レベルの研究が可能なことである。また、臨床的特徴及び分子生物学的特性などに基づき6種類のサブグループに分類されるため、各サブグループの症例からPDXライブラリーを構築することにより、必要最低限の症例数で実用性の高いin vivo研究体制が整備できる可能性が高い。本研究により主要なサブグループを網羅したPDXライブラリーを構築することは新規治療の選択肢を提供する点において非常に意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：Prospective observational study “Development of neuroblastoma patient-derived tumor xenograft library”, initiated since June 2021, under the Japan Children’s Cancer Group (JCCG). After about 2 years and 9 months, fresh frozen tumor tissues or bone marrow were collected from the 38 institutions participated in this study, which were transplanted with immunodeficient mice. Among them, 4 patient-derived tumor xenograft (PDX) mice, including those from 2 patients in poor prognostic subgroup (i.e., MYCN amplification and ALK gene abnormality group), has been established. We are currently in the process of massive expansion of engrafted tumor cells, identifying subgroup, creating integrated data combined with clinical information, establishing supply system of PDX mice to other research facilities.

研究分野：小児がん

キーワード：神経芽腫 異種移植モデル 免疫不全マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は脳腫瘍に次いで 2 番目に多い小児悪性固形腫瘍であり、本邦における新規発症例は年間 150-200 例である。臨床的特徴(発症時年齢・原発部位・病期など) 病理組織学的特徴・分子生物学的特性によりその生命予後は著しく異なる。高リスク神経芽腫では多剤併用化学療法、外科治療、放射線治療、大量化学療法などを組み合わせた強力な集学的治療を行っても長期生存率は 20-40%に留まり、改善の余地が残されている。一方、治療に用いる高線量放射線や抗がん剤は性腺機能障害、聴力障害、二次がんなどの晩期合併症のリスクが高い。つまり、標準的治療法は確立されておらず、アンメット・メディカル・ニーズが極めて高い疾患と言える。

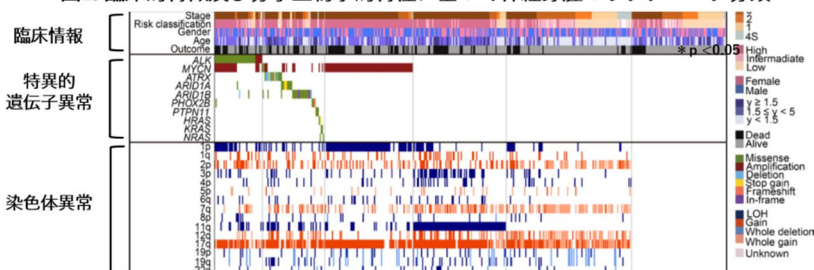
近年ゲノム研究が急速に進歩し、その成果を基にした分子標的薬の開発が活発に行われているが、小児悪性固形腫瘍では治療標的となるドライバー遺伝子異常が少なく、臨床応用可能な分子標的薬の開発が困難なことが報告されている。実際、神経芽腫においても ALK 遺伝子の機能獲得型変異例に対する ALK 阻害剤や ATM 経路の異常例に対する PARP 阻害薬など、特異的な遺伝子異常を有する一部の症例に対してのみ分子標的薬の有用性が確認されている。従って、神経芽腫の発生や進展には体細胞変異の蓄積以外の分子機序が関与しており、その克服にはゲノム解析以外の解析手法を加えた本質的な新規治療標的の開発が有用な可能性が推測される。

神経芽腫に対する臨床応用可能な分子標的薬が少ない別の原因として、臨床を反映した薬剤スクリーニング結果が得られる前臨床モデルが整備されていないことが挙げられる。近年、超免疫不全マウスに患者由来腫瘍を移植する患者由来異種移植 (patient-derived xenograft: PDX) モデルは腫瘍生着率が高く、生着した腫瘍は患者特有の特徴を保持しているため、生体内の臨床病態を忠実に反映した実用的なデータが得られる可能性が高い。特に、小児悪性固形腫瘍は多数例から検体を得ることが困難であり、かつ解析に十分な細胞が確保できないことが多いため、PDX マウスで増幅した細胞を代替の実験ツールとした研究が注目されている。ただし、PDX モデルでは腫瘍の生着に時間がかかり、全ての患者で生着したマウスを作成するのは不可能なため、現時点では腫瘍を提供した個々の患者の医療に直接貢献するのは困難である。

多数例での全ゲノム解析により、神経芽腫は臨床的特徴及び分子生物学的特性などに基づく

6 種類のサブグループに分類されることが報告されている(図 1)。個々のサブグループ内の各症例は臨床的特徴や分子遺伝学的背景が類似しており、治療標的となり得る特異的遺伝子異常を共有していることが多い。

図1. 臨床的特徴及び分子生物学的特性に基づく神経芽腫のサブグループ分類



2. 研究の目的

本研究では、強力な集学的治療を施行しても依然として予後不良な難治性神経芽腫に対して、個々の患者の分子病態に立脚した新規治療薬の開発と実用的な *in vivo* 薬剤スクリーニングが実現可能な PDX モデルを作成することを目的とする。具体的には、全国の医療機関から収集した難治性神経芽腫の患者検体を超免疫不全マウスへ移植して PDX マウスを作成する、マウス内に生着した腫瘍の病理解析・遺伝子解析を行い、臨床的特徴と分子生物学的特性に基づいたサブグループを特定する、マウス内で大量に増殖された腫瘍を用いて新規治療薬標的の探索と *in vivo* 薬剤感受性試験を実施する、全てのサブグループを網羅した PDX ライブラリーを構築し、臨床情報及び薬剤感受性試験データを統合したデータベースを作成する。本研究を通じて本質的かつ有効性の高い神経芽腫の新規克服法の開発と最適化医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) 神経芽腫 PDX ライブラリーの構築

1) 患者検体の収集と PDX マウスの樹立

日本小児がん研究グループ (JCOG) を母体とした小児固形腫瘍観察研究の付随研究として、全国の医療機関から難治性神経芽腫の腫瘍組織または骨髄を PDX マウス作成施設に収集し、超免疫不全マウスの皮下または骨髄内に移植した。マウス内で生着が確認された腫瘍は摘出して新しいマウスへの移植を継続して増幅するとともに、新鮮腫瘍組織・ゲノム DNA・メッセンジャー RNA・パラフィン包埋標本を保存した。

2) 生着した腫瘍の表現型解析及びサブグループの特定

摘出された腫瘍と抽出した DNA、mRNA 及び PDX マウス内で複数回生着が確認された腫瘍の一

部を用いて、病理検査（HE 染色、免疫染色、FISH 法など） 遺伝子検査（ゲノムコピー数解析、全エクソシーケンス、全ゲノムシーケンスなど）を実施し、元の腫瘍の病理学的及び遺伝学的特徴がマウス内で増殖後も維持されているかを確認した。小児固形腫瘍データセンターから PDX ライブラリー管理部門に提供された臨床情報（発症時年齢・性別・病期など）と照合して解析し、サブグループを特定した。

3) PDX ライブラリーの構築及び統合データベースの作成

PDX ライブラリー管理部門では、1)、2)で得られたデータに小児固形腫瘍データセンターから提供された追加の臨床情報（治療内容、転帰など）を統合した。さらに、PDX マウス由来腫瘍の保存情報も加えた統合データベースを作成した。

(2) PDX モデルを用いた神経芽腫に対する CD146 の *in vivo* 抗腫瘍効果の検討

1) 抗ヒト CD146 ウサギポリクローナル抗体作製

CD146 細胞外ドメインにおいて親水性、ターン構造、抗原性に優れた抗原ペプチドを選択し、マウスに第 1・3・5・7 週目に皮下注射した。第 8 週目に採取した全血から血清を分取し、CD146 ペプチドカラムで精製後に ELISA にて濃度を測定し、分注して-80 で凍結保存した。

2) PDX 細胞を移植したマウスに対する抗 CD146 抗体の治療効果の検討

複数回生着が確認された MYCN 増幅のある Stage 4 の進行性神経芽腫患者から樹立した PDX 腫瘍を次世代マウスの皮下に移植した後に抗 CD146 抗体を投与した群とウサギ IgG 投与群に振り分け、有効性（腫瘍サイズの経時的変化、摘出後の腫瘍重量、全身転移の有無など）及び安全性（体重の経時的変化など）を評価した。

(3) 新規 ALK 融合遺伝子を有する難治性神経芽腫患者由来 PDX マウスを用いた ALK 阻害剤耐性獲得機序の解明

1) 難治性神経芽腫患者の病態に関与する遺伝子異常の同定

FISH にて ALK に関連した融合遺伝子の存在が示唆された難治性神経芽腫患者の初発時の骨髄検体、ALK 阻害剤投与中に新規に出現した骨転移病変の生検組織、末梢血を用いて全エクソシーケンス、全 RNA シーケンスを実施した。

2) 患者由来 PDX マウスを用いた ALK 阻害剤、FGF 阻害剤併用療法の治療効果の検討

第 2 世代 ALK 阻害剤投与中に新規に出現した骨転移病変の生検組織から樹立した PDX 腫瘍を次世代マウスの皮下に移植した後に ALK 阻害剤単独投与した群と ALK 阻害剤 + FGF 阻害剤併用投与群に振り分け、有効性（腫瘍サイズの経時的変化、摘出後の腫瘍重量、全身転移の有無など）及び安全性（体重の経時的変化など）を評価した。

4 . 研究成果

(1) 神経芽腫 PDX ライブラリーの構築

全国の医療機関が参加する JCCG を母体とした前向き観察研究「神経芽腫患者由来異種移植ライブラリーの構築」を 2021 年 6 月より開始した。開始から約 2 年 9 ヶ月が経過した時点で、38 医療機関が研究に参加し、難治性神経芽腫 30 症例の新鮮腫瘍組織または骨髄を免疫不全マウスに移植し、うち 2 つの予後不良なサブグループ群（MYCN 増幅、ALK 遺伝子異常）の各 1 例を含む 4 例で PDX マウスを樹立した（表 1）。生着した腫瘍は超免疫不全マウス内で大量に増幅するとともに、腫瘍細胞のサブグループの特定を進めている。さらに、小児固形腫瘍観察研究のデータセンターから提供された臨床データを合わせた統合データを作成し、他の研究施設への PDX マウスの供給体制の整備を進めている。

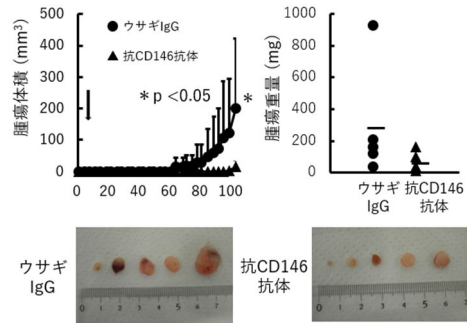
表 1. PDX マウスが樹立された症例の臨床的特徴

症例 No.	初診時 年齢・性別	病期	検体の 種類	病理学的及び 遺伝学的特徴
1	2 歳・女児	Stage 3 (初診時)	腫瘍組織	MYCN 増幅
2	1 歳・男児	Stage 4 (再発時)	腫瘍組織	<i>BEND5-ALK</i> 融合遺伝子
3	3 歳・男児	Stage 4 (再発時)	骨髄	検索中
4	3 歳・男児	Stage 4 (再発時)	骨髄	MYCN 増幅

(2) PDXモデルを用いたCD146の *in vivo* 抗腫瘍効果の検討

これまでの検討により、細胞表面抗原 CD146 が悪性ラブドイド腫瘍、神経芽腫、肝芽腫など様々な小児悪性固形腫瘍に共通して発現すること、抗 CD146 抗体が悪性ラブドイド腫瘍に対して優れた *in vitro*、*in vivo* 抗腫瘍効果を示すことが確認されている。神経芽腫患者由来 PDX 腫瘍を移植したマウスに抗ヒト CD146 ポリクローナル抗体を投与したところ、ウサギ IgG 投与群と比較して有意な腫瘍径の縮小や腫瘍重量の低下を認め(図2)、抗 CD146 抗体の神経芽腫に対する優れた腫瘍形成抑制効果が確認されたとともに、本モデルの新規薬剤開発における有用性を示した。

図2. PDXモデルを用いた神経芽腫に対するCD146の *in vivo* 抗腫瘍効果の検討



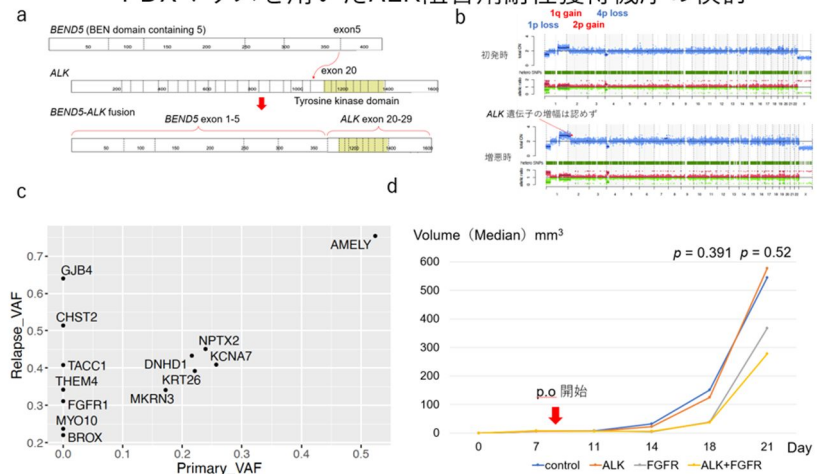
(3) 新規 ALK 融合遺伝子を有する難治性神経芽腫患者由来 PDX マウスを用いた ALK 阻害剤耐性獲得機序の解明

全 RNA シーケンスにより初発時・増悪時検体から新規の *BEND5-ALK* 融合遺伝子(図3a)、全エクソンシーケンスにより増悪時検体からのみ *FGFR1* 遺伝子変異を同定した(図3c)。治療中増悪時の腫瘍からは *ALK* 遺伝子の新規変異は認めなかった(図3c)。

ALK 阻害剤の薬剤耐性には *ALK* 依存性 (*ALK* 融合遺伝子に存在するチロシンキナーゼドメインの点突然変異、*ALK* 遺伝子の増幅など)と *ALK* 非依存性の機序 (*EGFR*・*KIT*・*NRAS*・*FGFR* 遺伝子などの機能獲得型の変異による bypass pathway の活性化、P 糖タンパク質の過剰発現など)が存在することが知られている。本例では治療中増悪時の腫瘍からは *ALK* 遺伝子の新規変異を認めなかったことより、*FGFR1* 遺伝子変異により ERK、STAT3、AKT など別の経路が活性化されて薬剤耐性が生じた可能性が高いと考えた。

上記の仮説を検証するため、患者由来 PDX 腫瘍を移植したマウスに ALK 阻害剤または *FGFR* 阻害剤の単剤投与群、ALK 阻害剤・*FGFR* 阻害剤併用投与群における *in vivo* 腫瘍形成能を検討したところ、有意差は認めないものの ALK 阻害剤・*FGFR* 阻害剤併用投与が最も高い腫瘍形成抑制効果を示した(図3d)。

図3. 新規 *BEND5-ALK* 融合遺伝子を有する難治性神経芽腫患者由来 PDX マウスを用いた ALK 阻害剤耐性獲得機序の検討



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Obu S, Umeda K, Ueno H, Sonoda M, Tasaka K, Ogata H, Kouzuki K, Nodomi S, Saida S, Kato I, Hiramatsu H, Okamoto T, Ogawa E, Okajima H, Morita K, Kamikubo Y, Kawaguchi K, Watanabe K, Iwafuchi H, Yagyū S, Iehara T, Hosoi H, Nakahata T, Adachi S, Uemoto S, Heike T, Takita J.	4. 巻 112
2. 論文標題 CD146 is a potential immunotarget for neuroblastoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4617-4626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15124.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tasaka K, Ueno H, Yamasaki K, Okuno T, Isobe T, Kimura S, Umeda K, Hara J, Ogawa S, Takita J.	4. 巻 113
2. 論文標題 Oncogenic FGFR1 mutation and amplification in common cellular origin in a composite tumor with neuroblastoma and pheochromocytoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1535-1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田坂 佳資, 上野 浩生, 山崎 夏維, 奥野 高裕, 磯部 知弥, 木村 俊介, 梅田 雄嗣, 原 純一, 小川 誠司, 滝田 順子
2. 発表標題 共通の細胞起源から生じた,FGFR1変異/増幅を有する神経芽腫/褐色細胞腫の複合腫瘍
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katsutsugu Umeda
2. 発表標題 Neuroblastoma
3. 学会等名 International Atomic Energy Agency (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田坂佳資, 上野浩生, 梅田雄嗣, 山崎夏維, 奥野高裕, 木村俊介, 原純一, 小川誠司, 滝田順子
2. 発表標題 Integrated genetic analysis of composite tumor with neuroblastoma and pheochromocytoma
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	瀧本 哲也 (Takimoto Tetsuya) (40393178)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・研究所小児がん疫学臨床研究センター・室長 (82612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関