

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591980

研究課題名（和文）小児固形悪性腫瘍における GLYPICAN3 をターゲットとした分子標的治療

研究課題名（英文） GLYPICAN 3 targeted therapy in pediatric solid malignant tumors.

研究代表者

木下 義晶(KINOSHITA YOAHIKI)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：80345529

研究成果の概要（和文）：

【目的】小児固形悪性腫瘍における Glypican3 の新規腫瘍マーカーとしての有用性の検討と、特異的発現を示す小児固形悪性腫瘍に対しては診断システムの構築を行い、さらに Glypican3 を標的とした免疫遺伝子治療を開発することを最終目的とする。

【方法】当科で経験した小児固形悪性腫瘍の病理検体、および患者血清に対して Glypican3 と AFP の免疫組織学検討と ELISA による血清値測定を行った。

【結果】肝芽腫、悪性胚細胞腫のほぼ全例、約 1/3 のウィルムス腫瘍の患者、胞巣型横紋筋肉腫、未分化肉腫の患者の組織と血清には Glypican3 の発現が認められた。AFP に関しては肝芽腫、悪性胚細胞腫のほぼ全例に発現が認められた。

また非担癌患者においては出生直後の年齢層において血清 Glypican3 は高値であり、1 歳前後にかけて徐々に減衰傾向が認められ 1 歳以降においてはほぼ正常化することが確認され、生理的減衰傾向を示す胎児性腫瘍マーカーであることが示唆された。

【考察】Glypican3 は小児固形悪性腫瘍における新規腫瘍マーカーとして有用であることが示された。この基礎研究の結果を元に 1 歳以降で Glypican3 が発現している難治性の腫瘍に対してはがんワクチン療法をはじめとする免疫療法や関連遺伝子を対象とした分子標的治療の実現の可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：

【Purpose】 The purpose of this study is to analyze the usefulness of Glypican3 as a novel diagnostic tumor marker for pediatric solid malignant tumor, and to establish the new diagnostic system. Final goal is to develop the immuno-genetic therapy targeted for the Glypican3.

【Method】 The immunohistochemical analysis and serological analysis of Glypican3 and AFP was performed for the pathological materials and patient's serum.

【Results】 Immunohistochemically and serologically, most cases of hepatoblastoma and malignant germ cell tumor showed positive for Glypican3, and one of thirds Wilms tumor, alveolar type rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma were also positive. Concerning AFP, most cases of hepatoblastoma and malignant germ cell tumor showed positive. Concerning non-neoplastic patients', serum Glypican 3 was high just after birth and gradually decreased according to their age. The level normalized by the 1 year.

【Discussion】 Glypican3 was confirmed as the novel diagnostic marker for pediatric solid malignant tumors. Based on this research, for the refractory cases of pediatric solid malignant tumor over 1 year, such new treatment immuno-genetic therapy targeted for Glypican 3 will be expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医師薬学

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：GLYPICAN3、小児固形悪性腫瘍、腫瘍マーカー、AFP、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

腫瘍マーカーは癌の病期決定、癌の組織型、手術や化学療法 completion、再発癌の早期発見に不可欠な診断手段である。成人癌領域では様々な種類の臓器特異的および非特異的マーカーが知られている。小児領域でも代表的固形悪性腫瘍である神経芽腫には血清中のNSE、尿中VMA、尿中HVAが、また肝芽腫や悪性胚細胞腫にはAFPという腫瘍マーカーが有用な診断手段となるが、その他の固形腫瘍、例えばウィルムス腫瘍、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、その他の肉腫型腫瘍に関しては特異的な腫瘍マーカーはなく、術前の診断は画像診断に頼らざるを得ない点がある。

一方Glypican3は8個のエクソンと580個のアミノ酸からコードされ、細胞膜に接着する糖蛋白であり、細胞増殖を抑制する働きがある。胎児期の組織には広く発現し、成人の組織には減弱することが知られている。いわゆる癌胎児性抗原としての役割が認識されており1997年にHsuらが肝細胞癌における発現を報告して以来(Hsu HC et al, Cancer Res, 1997)、成人領域の悪性腫瘍では卵巣癌、悪性中皮腫、乳癌、大腸癌などで検討され、成人領域では悪性腫瘍との関連を検討した報告は多くなされている。一方小児固形悪性腫瘍について報告はほとんどなく、Yamauchiらが肝臓の腫瘍性病変として肝細胞癌に加えて肝芽腫も対象に加え、Glypican3を蛋白レベルで発現していることを報告し、(Yamauchi N, et al, Mod Pathol, 2005),その後Zyngerらの追試にて大半のHepatoblastomaに免疫組織学的に陽性を示すことが報告された(Zynger DL, et al, Human Pathol, 2008)。

成人癌領域、特に肝癌の治療においてはGlypican3を標的とした癌ワクチン療法を目指して前臨床試験は終了しており、マウスの実験系においてHLA-A24結合モチーフを有するGlypican3由来ペプチドを骨髄由来樹状細胞にパルスした樹状細胞ワクチンを用い

て、Glypican3陽性腫瘍発生のin vivoモデルが作成されている。(Nakatsura T, et al, Clin Cancer Res, 2004)。現在Glypican3ペプチドワクチンの実用化にむけて成人癌を対象とした第2相臨床試験が開始されている。

2. 研究の目的

小児固形悪性腫瘍におけるGlypican3の新規腫瘍マーカーとしての有用性の検討と、特異的発現を示す小児固形悪性腫瘍に対しては診断システムの構築を行い、さらにGlypican3を標的とした免疫遺伝子治療を開発することを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1)小児固形悪性腫瘍におけるGlypican3の発現についての検討(ELISA法)

当科で経験した約100例の小児固形悪性腫瘍の検体(組織、患者血清)を対象とする。組織に対しては免疫組織学的にGlypican3の発現を検討する。また血清検体についてはGlypican3の発現量の定量をGPC3(HUMAN GLYPICAN-3) ELISA KIT (Bio Mosaics)により行う。これらと同じ胎児性抗原であるAFPについても同様の手技で行い、Glypican3の発現動態との比較検討を行う。

さらに血清検体についてはGlypican3の発現が胎児期から生後どのように自然減衰していくのか生理的減衰曲線についても検討を行う。

(2)分子標的治療のターゲットとなる遺伝子の候補の選定

成人領域で始まっているGlypican3による免疫がんワクチン療法でターゲットとなっている抗原の関連遺伝子を分子標的治療のターゲットの候補とし、それらの遺伝子の発現について免疫組織学的、分子生物学的に検討を行う。

4. 研究成果

(1)Glypican 3 の発現

肝芽腫、悪性胚細胞腫のほぼ全例、約 1/3 のウィルムス腫瘍の患者、胞巣型横紋筋肉腫、未分化肉腫の患者の組織と血清には Glypican3 の発現が認められた。AFP に関しては肝芽腫、悪性胚細胞腫のほぼ全例に発現が認められた。

また非担癌患者においては出生直後の年齢層においては血清は高値であり、1 歳前後にかけて徐々に減衰傾向が認められ 1 歳以降においてはほぼ正常化することが確認され、生理的減衰傾向を示す胎児性腫瘍マーカーであることが示唆された。

この基礎研究結果に基づき、1 歳以上の年齢を対象にして、当施設も含めた多施設共同研究の第 1 相臨床試験として難治性小児固形悪性腫瘍に対する GPC3 ペプチドワクチン療法のエントリーが始まっており、当施設においても、倫理委員会申請承認後、臨床試験施行の準備段階に入っている。

(2)分子標的治療のターゲットとなる遺伝子の候補の選定

Glypican3 による免疫がんワクチン療法でターゲットとなっている抗原の関連遺伝子に関しては、成人癌における研究の実績をもとに複数の候補が挙がっており、現在、共同研究者の施設において免疫組織学的、分子生物学的に検討を行っている。

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)

[雑誌論文] (計 12 件)

- (1) Kinoshita Y, Suminoe A, Inada H, Yagi M, Yanai F, Zaizen Y, Nishi M, Inomata Y, Kawakami K, Matsufuji H, Suenobu S, Handa N, Kohashi K, Oda Y, Hara T, Taguchi T, The prognostic significance of blastemal predominant histology in initially resected Wilms' tumors: a report from the Study Group for Pediatric Solid Tumors in the Kyushu Area, Japan, J Pediatr Surg, 査読有, 47, 2012, 2205-2209, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.09.009.
- (2) Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Taguchi T, Implications of surgical intervention in the treatment of neuroblastomas: 20-year experience of a single institution, Surg Today, 査読有, 42, 2012, 220-224, DOI: 10.1007/s00595-011-0053-0. Epub 2012 Jan 19.
- (3) Kohashi K, Nakatsura T, Kinoshita Y,

Yamamoto H, Yamada Y, Tajiri T, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y, Glypican3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression, Hum Pathol, 査読有, Epub ahead of print, 2012, DOI:

10.1016/j.humpath.2012.06.014. Epub 2012 Oct 16.

- (4) Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Yosue R, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T, Surgical intervention strategies for pediatric ovarian tumors: experience with 60 cases at one institution, Pediatr Surg Int, 査読有, 28, 2012, 27-31, DOI: 10.1007/s00383-011-3004-3.
- (5) Tajiri T, Kimura O, Fumino S, Furukawa T, Iehara T, Souzaki R, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Hishiki T, Hosoi H, Hiyama E, Taguchi T, Surgical strategies for unresectable hepatoblastomas, J Pediatr Surg, 査読有, 47, 2012, 2194-2198, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.09.006.
- (6) Souzaki R, Kinoshita Y, Matsuura T, Tajiri T, Taguchi T, Ieiri S, Hong J, Umemura M, Konishi K, Tomikawa M, Tanoue K, Hashizume M, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Successful resection of an undifferentiated sarcoma in a child using a real-time surgical navigation system in an open magnetic resonance imaging operation room, J Pediatr Surg, 査読有, 46, 2011, 608-611, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2010.11.043.
- (7) Souzaki R, Tajiri T, Teshiba R, Kinoshita Y, Yosue R, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T, Correlation between the number of segmental chromosome aberrations and the age at diagnosis of diploid neuroblastomas without MYCN amplification, J Pediatr Surg, 査読有, 46, 2011, 2228-2232, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.005.
- (8) 高橋由紀子, 西本祐子, 松浦俊治, 林田真, 田尻達郎, 増本幸二, 藤田桂子, 木下義晶, 宗崎良太, 武富紹信, 前原喜彦, 猪股裕紀洋, 田口智章, 肝移植のタイミングに難渋した巨大肝芽腫の1例, 臨床と研究, 査読有, 87, 2010, 1288-1289
- (9) 竜田恭介, 木下義晶, 田尻達郎, 中辻隆徳, 東真弓, 宗崎良太, 江藤正俊, 立神勝則, 孝橋賢一, 内藤誠二, 恒吉正澄, 田口智章, 樹状細胞療法を施行した小児腎細胞癌の1例, 小児がん, 査読有, 47,

2010, 441-446,
http://ci.nii.ac.jp/els/110008661027.pdf?id=ART0009741000&type=pdf&lang=jp&host=cinii&order_no=&ppv_type=0&lang_sw=&no=1369212538&cp=

- (10) Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Masumoto K, Ohira M, Nakagawara A, Taguchi T, Concordance for neuroblastoma in monozygotic twins: case report and review of the literature, *J Pediatr Surg*, 査読有, 45, 2010, 2312-2316, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2010.08.025.
- (11) Souzaki R, Tajiri T, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T, Successful treatment of advanced pancreatoblastoma by a pylorus-preserving pancreatoduodenectomy after radiation and high-dose chemotherapy, *Pediatr Surg Int*, 査読有, 26, 2010, 1045-1048, DOI: 10.1007/s00383-010-2655-9.
- (12) Souzaki R, Tajiri T, Souzaki M, Kinoshita Y, Tanaka S, Kohashi K, Oda Y, Katano M, Taguchi T, Hedgehog signaling pathway in neuroblastoma differentiation, *J Pediatr Surg*, 査読有, 45, 2010, 2299-2304, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2010.08.020.

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 木下義晶, 宗崎良太, 代居良太, 大場詩子, 古賀友紀, 住江愛子, 三好きな, 孝橋賢一, 原寿郎, 小田義直, 田口智章, 小児腎腫瘍に対する術前化学療法の検討, 第 55 回日本小児血液・がん学会, 平成 24 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 横浜
- (2) Kinoshita Y, Suminoe A, Inada H, Yagi M, Yanai F, Zaizen Y, Nishi M, Inomata Y, Kawakami K, Matsufuji H, Suenobu S, Kohashi K, Hara T, Oda Y, Taguchi T, The Prognostic Significance of Blastemal Predominant Histology in Initially Resected Wilms' Tumors: A Report from the Study Group for Pediatric Solid Tumors in the Kyushu Area, Japan, 45th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2012.06.4-6, Shanghai, China
- (3) Kinoshita Y, Yosue R, Souzaki R, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T, Blastemal predominant type of Wilms tumor has a poor biology compared with other types: A report from a single institution, SIOP Asia 2012,

2012.04.21-24, Yogyakarta, Indonesia

- (4) 木下義晶, 住江愛子, 稲田浩子, 八木実, 柳井文男, 財前善雄, 西真範, 猪股裕紀, 洋, 川上清, 松藤凡, 末延聡一, 孝橋賢一, 原寿郎, 小田義直, 田口智章, 小児泌尿器腫瘍の新病理分類による九州地区登録例の解析, 九州地区小児固形悪性腫瘍研究会, 平成 24 年 3 月 3 日, 福岡
- (5) 木下義晶, 住江愛子, 稲田浩子, 八木実, 柳井文男, 財前善雄, 西真範, 猪股裕紀, 洋, 川上清, 松藤凡, 末延聡一, 孝橋賢一, 原寿郎, 小田義直, 田口智章, 新病理分類による九州地区登録例の解析, JWiTS 研究会, 平成 24 年 1 月 29 日, 東京
- (6) 木下義晶, 宗崎良太, 古賀友紀, 住江愛子, 久田正昭, 三好きな, 孝橋賢一, 原寿郎, 小田義直, 田口智章, JWiTS 設立後の当施設における MRTK5 例の検討, 2013 年 JWiTS 研究, 平成 24 年 1 月 27 日, 東京
- (7) 木下義晶, 手柴理沙, 江角元史郎, 宗崎良太, 永田公二, 田尻達郎, 湯元康夫, 藤田恭之, 福嶋恒太郎, 和気徳夫, 田口智章, 当科における巨大仙尾部奇形腫の検討と胎児治療に関する展望, 第 48 回日本小児外科学会, 平成 23 年 7 月 20 日~22 日, 東京
- (8) 木下義晶, 田尻達郎, 代居良太, 宗崎良太, 林田真, 松浦俊治, 古賀友紀, 孝橋賢一, 小田義直, 原寿郎, 田口智章, 生体肝移植を行った肝芽腫 3 例, 第 40 回九州地区小児固形悪性腫瘍研究会, 平成 23 年 2 月 19 日, 福岡
- (9) 木下義晶, 田中桜, 田尻達郎, 宗崎良太, 孝橋賢一, 小田義直, 馬場秀夫, 福島智, 西村泰治, 田口智章, 小児固形悪性腫瘍における新規腫瘍マーカーとしての Glypican3 の有用性, 第 47 回日本小児外科学会, 平成 22 年 6 月 17 日, 名古屋
- (10) Kinoshita Y, Tanaka S, Kohashi K, Tajiri T, Souzaki R, Yoshinao Oda, Baba H, Fukushima S, Nishimura Y, Taguchi T, Clinical implications of serum Glypican 3 level as the novel tumor marker in pediatric malignant solid tumors, 43rd Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2010.05.26, Shanghai, China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 義晶 (KINOSHITA YOSHIKI)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号: 80345529

(2)研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI TOMOAKI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：20197247

田尻 達郎 (TAJIRI TATSURO)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：80304806

宗崎 良太 (SUZAKI RYOTA)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：10403990

田中 桜 (TANAKA SAKURA)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：40467923

(3)連携研究者

()

研究者番号：