

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24年5月15日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791710
 研究課題名（和文） 小児固形がんにおける新規血清腫瘍マーカーとしての Hh 蛋白の有用性に関する研究
 研究課題名（英文） The utility of the Hh protein as the new serum tumor marker in the childhood solid cancer
 研究代表者
 宗崎 良太（SOUZAKI RYOTA）
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：10403990

研究成果の概要（和文）：

Hedgehog signal伝達系(Hh)は胎生期の形態形成に重要な役割を果たし、神経系、腸上皮や肺の発達・分化に関与していることが明らかとなっている一方で、髄芽腫や基底細胞癌の発生に関与しているといわれている。今回、小児がんである神経芽腫において、Hhシグナルの活性化の検討を行った。臨床神経芽腫検体92例の検討から、67-79%の症例でHh関連タンパクが発現していることが確認された。MYCN増幅症例では発現が低く、MYCN非増幅症例では発現が高いことが明らかとなった。また、MYCN非増幅症例においては、その発現と病期・予後には負の相関が認められた。これらの結果から、神経芽腫において、Hhシグナルは血清マーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The hedgehog (Hh) signaling pathway plays an important role in the growth and patterning in a variety of tissues during embryonic development. On the other hand, the activation of the Hh signal pathway due to mutations or ligand-dependent stimulation of the pathway is associated with tumorigenesis of a lot of cancers. This study revealed that 67-79% neuroblastoma samples showed positive for Hh proteins. There was a significant association between Hh signal proteins and the status of MYCN gene. The percentage of Hh protein positive cells in early stage samples was higher than that with advanced stage. The 5-year OS rate of Hh protein positive cases without MYCN amplification is significantly higher than that in GLI1 negative cases. Based on these result, the Hh signal proteins are possible to be a serum marker of neuroblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：小児外科

キーワード：神経芽腫、hedgehog signal

1. 研究開始当初の背景

Hedgehog signal伝達系(Hh)は胎生期の形態形成に重要な役割を果たし、神経系、腸上皮や肺の発達・分化に関与していることが明らかとなっている一方で、Hhの変異や増幅に伴い、髄芽腫や基底細胞癌の発生することが知られている。また、胃がん、膵癌、乳がんなどの成人癌領域において、Hhがligand依存性に活性化していることが知られており、その発がんに関与しているといわれている。実際、新規分子標的治療薬としてHhシグナル阻害剤が臨床に用いられ、髄芽腫や基底細胞癌において、効果が報告されている。しかし、小児固形悪性腫瘍、特に神経系の腫瘍である神経芽腫におけるHhの活性化の意義は未だ不明である。今回、我々は神経芽腫におけるHhの活性化とその臨床的意義について検討を行うとともに新規血清腫瘍マーカーとしてのHhシグナルの可能性について検討することを目的とした。

2. 研究の目的

小児腎腫瘍や横紋筋肉腫といった小児固形がんにおいては、現在、血清腫瘍マーカーとなりうるものは発見されておらず、診断・化学療法の有効性・再発の有無については画像診断でのみ行っているのが現状である。今回我々は、小児の髄芽腫、成人の消化器癌、基底細胞癌など種々の発癌に関与することが知られているHedgehog(Hh)シグナル伝達系がこれら小児固形腫瘍においても、活性化していることから、それらのシグナル伝達に関与する蛋白を小児固形腫瘍の新規血清腫瘍マーカーとしての可能性を検討することを目的とした。

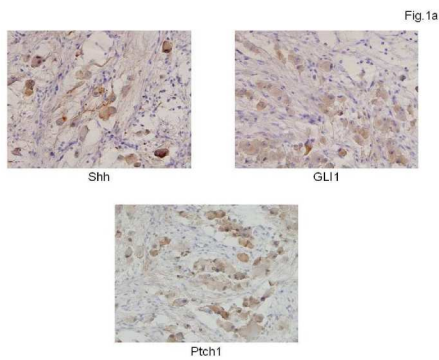
3. 研究の方法

当科で治療を行った神経芽腫82例、神経節芽腫10例の合計92例を対象とした。男児は56例、女児36例で、INSS stage1が33例、stage2が9例、stage3が16例、stage4が29例、stage4Sが5例であった。また、58例が診断時年齢が1歳以下の症例で、48例がマスキング発見例であった。

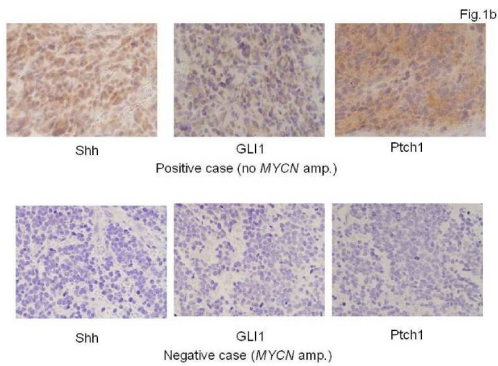
Paraffin切片に対しての免疫染色にてHhsignal経路の中でその活性化の指標となっている蛋白であるSonic hedgehog(Hh)、Patched(Ptch)、Gli1(Gli1)発現を判定、定量化した。50%以上の細胞が陽性のものを陽性とした。また、Hhの活性化の指標の1つとして、Gli1蛋白の核内移行率を測定した。*MYCN*増幅の有無はFISH法・定量的PCRを用いて判定した。FISH法はdual color FISHでは、*MYCN*シグナルが2番染色体中心体シグナルに対して4倍までを非増幅、4倍より増加しているものを*MYCN*増幅と定義した。

4. 研究成果

神経芽腫・神経節芽腫の全92例中Shhは67例(73%)、GLI1は62例(67%)、Patch1は73例(79%)が陽性であった。なかでも、神経節芽腫症例においては、分化傾向を示すneuroblastにおいてHh関連蛋白の発現を強く認めた。一方、間質のシュワン細胞は陰性であった。



MYCN増幅症例20例において、陽性例はShh 2例(10%)、GLI1 2例(10%)、Patch 4例(20%)であり、MYCN増幅症例においてはHh関連蛋白の発現が有意に低かった。一方MYCN非増幅症例においては、65例(90%)がShh陽性、60例(83%)がGLI1陽性、69例(96%)がPtch1陽性であった。



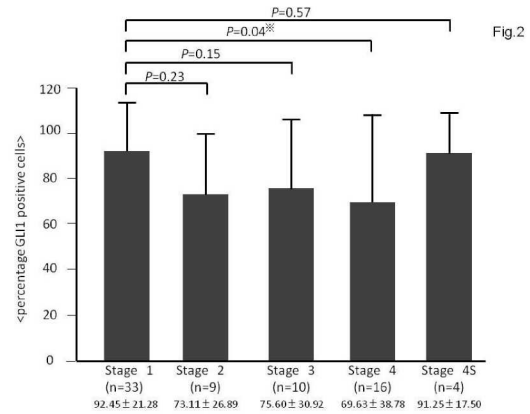
また、MYCN増幅症例とMYCN非増幅症例の間でHh関連蛋白の陽性率に有意差を認めた。 $(p \leq 0.01)$ 。

		positive			negative	
		++	+	-		
Shh	MYCN amp.	2	0	18	20	$p \leq 0.001$
	no MYCN amp.	62	3	7	72	
		64	3	25		

		positive			negative	
		++	+	-		
GLI1	MYCN amp.	2	0	18	20	$p \leq 0.001$
	no MYCN amp.	51	9	12	72	
		53	9	30		

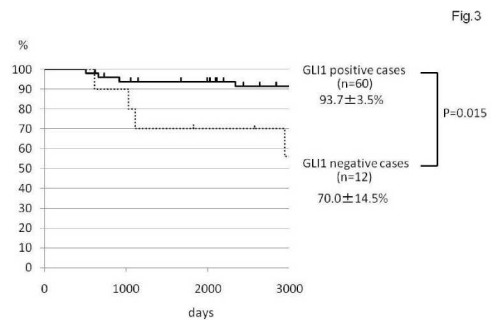
		positive			negative	
		++	+	-		
Ptch1	MYCN amp.	4	0	16	20	$p \leq 0.001$
	no MYCN amp.	66	3	3	72	
		70	3	19		

また、72例のMYCN非増幅症例において、stage1症例はstage4症例と比較して、有意にGLI1の発現が高かった。 $(92.45 \pm 21.28$ vs. 69.63 ± 38.78 ; $p=0.04$)。しかし、それ以外



のstageにおいては、有意差を認めなかった。stage 1 v. s. stage 2 ($p=0.23$), stage 1 v. s. stage 3 ($p=0.15$), stage 1 v. s. stage 4S ($p=0.57$)

またMYCN非増幅例をGLI1陽性例(n=60)とGLI1陰性例(n=12)に分け予後を検討したところ、GLI1陽性例は有意に予後良好であった($p=0.015$)。



全92例の中でGLI1の核内移行を10%以上認めた症例はわずか2例であった。

【結論】成人癌領域において、Hhシグナルの活性化は、発癌やその悪性化に関与しているといわれていることが明らかとなっている。実際、髄芽腫や基底細胞癌に対しては、分子標的治療として、Hhシグナル阻害剤が臨床的

に使用され、その有効性が報告されている。今回、小児固形腫瘍の1つである神経芽腫臨床検体の多くで Hh シグナルが活性化していることが明らかとなった。Hh シグナルを対象として、血清レベルでの Hh シグナル蛋白が腫瘍マーカーとなりうる可能性が示唆された。しかし、一方で、今回の結果においては、活性化の程度においては、腫瘍の進行度が低いものや予後が良い症例ほど、活性化が強いという結果であった。また、成人癌領域においては、より活性化の強いものにおいては、GLI1 蛋白の腫瘍細胞の核内移行が認められると報告されているが、神経芽腫においては、核内への移行を認めた症例はわずかであった。このことから、神経芽腫における Hh の活性化の意義は、神経節芽腫において neuroblast が強く染色されたことからその悪性を反映しているのではなく、neuroblast の分化を反映している可能性も考えられる結果であった。今後、血清レベルでの Hh 蛋白の検討には、今回の結果が非常に有用であると考えられる。

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 11 件)

1. 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. 2012 Feb;42(3):220-4.
2. 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. 2011 Dec;46(12):2228-32.
3. Ieiri S, Uemura M, Konishi K, Souzaki R, Nagao Y, Tsutsumi N, Akahoshi T, Ohuchida K, Ohdaira T, Tomikawa M, Tanoue K, Hashizume M, Taguchi T. Augmented reality navigation system for laparoscopic splenectomy in children based on preoperative CT image using optical tracking device. Pediatr Surg Int. 2012 Apr;28(4):341-6.
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. 2012 Jan;28(1):27-31.
5. Souzaki R, Kinoshita Y, Matsuura T, Tajiri T, Taguchi T, Ieiri S, Hong J, Uemura 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. 2011 Mar;46(3):608-11.
6. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Hayashi A, Souzaki R, Tajiri T, Onimaru M, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M. High EGFR mRNA expression is a prognostic factor for reduced survival in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. Int J Oncol. 2011 Mar;38(3):629-41.
7. Souzaki R, Tajiri T, Teshiba R, Higashi M, Kinoshita Y, Tanaka S, Taguchi T. The

genetic and clinical significance of MYCN gain as detected by FISH in neuroblastoma. *Pediatr Surg Int.* 2011 Mar;27(3):231-6.

8. Harada C, Kawaguchi T, Ogata-Suetsugu S, Yamada M, Hamada N, Maeyama T, Souzaki R, Tajiri T, Taguchi T, Kuwano K, Nakanishi Y. EGFR tyrosine kinase inhibition worsens acute lung injury in mice with repairing airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Mar 15;183(6):743-51.

9. 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.* 2010 Dec;45(12):2312-6.

10. 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.* 2010 Dec;45(12):2299-304.

11. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Souzaki R, Tajiri T, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M. Gene expression levels as predictive markers of outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Neoplasia.* 2010 Oct;12(10):807-17.

12. 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.*

2010 Oct;26(10):1045-8.

[学会発表] (計 14 件)

1. 宗崎良太、田尻達郎、代居良太、木下義晶、古賀友紀、住江愛子、孝橋賢一、小田義直、原 寿郎、田口智章 「精巣原発悪性腫瘍の 2 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
2. Souzaki R, Tajiri T, Kinoshita Y, Yosue R, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T 「Correlation between the number of segmental chromosome aberrations and the age at diagnosis in diploid neuroblastomas without MYCN amplification」 PAPS2011 10-14 April 2011, Mexico
3. 宗崎良太、家入里志、田尻達郎、植村宗則、木下義晶、古賀友紀、住江愛子、孝橋賢一、小田義直、原 寿郎、橋爪 誠、田口智章 「小児外科領域における手術ナビゲーションの導入・実践」 第 111 回日本外科学会定期学術集会 平成 23 年 5 月 26 日～28 日、東京
4. 宗崎良太、家入里志、橋爪 誠、田口智章 「小児消化管穿孔に対して腹腔鏡下閉鎖術を行った 2 例」 第 25 回日本小児救急医学会 平成 23 年 6 月 10～11 日、東京
5. 宗崎良太、臼井規朗、左 勝則、佐合治彦、野坂俊介、中村知夫、金森 豊、米田光宏、北野良博、田口智章 「胎児仙尾部奇形腫の周術期合併症および後遺症に関する検討：本邦における他施設共同研究（第 4 報）」 第 47 回日本周産期・新生児学会学術集会 平成 23 年 7 月 10～12 日、札幌
6. 宗崎良太、木下義晶、田尻達郎、代居良太、古賀友紀、住江愛子、孝橋賢一、小田義直、原 寿郎、田口智章 「精巣原発悪性腫瘍の 2 例」 第 20 回日本小児泌尿器科学会総会 平成 23 年 7 月 13～15 日、秋田
7. 宗崎良太、木下義晶、林田 真、松浦俊治、田口智章 「当科で経験した腓外傷症例

の検討」第 48 回日本小児外科学会学術集会
平成 23 年 7 月 20～22 日、東京

8. 宗崎良太、家入里志、木下義晶、林田 真、
松浦俊治、橋爪 誠、田口智章 「当科で経
験した小児腭外傷 8 例」第 47 回日本腹部救
急医学会総会 平成 23 年 8 月 11～12 日、福
岡

9. 宗崎良太、家入里志、松浦俊治、永田公
二、林田 真、木下義晶、田尻達郎、田口智
章 「Interval appendectomy の至適待機期間
について」第 41 回九州小児外科研究会
平成 23 年 8 月 27 日、福岡

10. Souzaki R, Tajiri T, Kinoshita Y,
Teshiba R, Yosue R, Kohashi K, Oda Y,
Taguchi T 「The increase of segmental
chromosomal abnormalities in proportion to
age at diagnosis in neuroblastoma without
MYCN mplification」ISW2011 平成23年8月28
日～9月1日、横浜

11. 宗崎良太、家入里志、石井裕之、富川盛
雅、松岡紀之、高西淳夫、橋爪 誠、田口智
章 「小児内視鏡外科手術における客観的技
術評価システム開発の試みー小児内視鏡外
科手術の安全性を求めてー」第 21 回九州内
視鏡下外科手術研究会 平成 23 年 9 月 3 日、
福岡

12. Souzaki R, Tajiri T, Teshiba R,
Kinoshita Y, Yosue R, Kohashi K, Oda Y,
Taguchi T

「The number of Segmental Chromosome
Aberrations Significantly Increases in
Proportion To the Age at Diagnosis in
Subjects with Diploid/Tetraploid
Neuroblastomas without MYCN
Amplification」43rd Congress of the
International Society of Pediatric
Oncology (SIOP2011) 27-30 October 2011,
New Zealand

13. 宗崎良太、田尻達郎、代居良太、木下義
晶、三好きな、孝橋賢一、小田義直、田口智
章 「神経芽腫MYCN非増幅症例における
segmental chromosome aberrationと年齢との
相関」第53回日本小児血液・がん学会学術集
会 平成23年11月25～27日、前橋

14. 宗崎良太、田口智章、臼井規朗、左 勝
則、左合治彦、野坂俊介、中村知夫、金森 豊、
米田光宏、北野良博 「本邦の多施設共同研
究における胎児仙尾部奇形腫の週術期合併
症および後遺症の検討」第 9 回日本胎児治療
学会 平成 23 年 12 月 2～3 日、福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織
研究代表者
宗崎 良太 (そうざき りょうた)
九州大学・大学病院・小児外科
研究者番号：10403990