

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390405

研究課題名(和文)小児腎腫瘍に対するリスク分類に基づく標準的治療確立および新規治療開発のための研究

研究課題名(英文) Establishment of new therapeutic protocol for pediatric renal tumor according to the new risk classification

研究代表者

福澤 正洋 (Fukuzawa, Masahiro)

大阪大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：60165272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円、(間接経費) 4,110,000円

研究成果の概要(和文)：小児腎腫瘍に対するリスク分類に基づく標準的治療確立および新規治療開発のため、以下の研究を行った。リスク分類に有用な分子生物学的予後因子を検索した所、RASSF1A遺伝子のメチル化とWTX遺伝子変異が予後不良因子であることが判明したため、次期プロトコルでその有用性を検討することになった。両側性腎芽腫に対して、過去の症例の解析により腎温存の点では不十分で、長期フォローで腎機能障害が問題になっていたため腎機能の温存に主眼をおいた新たな治療プロトコルを開発した。予後不良の腎ラブドイド腫瘍に対し、より安全で有効性の高い新規治療法を確立するための新規治療研究を計画した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed methylation status of tumor suppressor gene RASSF1A in 84 Wilms tumors and found out that it was significantly associated with a poor outcome. Moreover, we analyzed the mutation of WTX gene and revealed that this also was significantly associated with a poor outcome. Therefore these biomarkers were considered be candidates of the new biomarkers for risk classification to create the new therapeutic protocols.

The survival rate of bilateral Wilms tumors (BWT) has been improved; however, the results are not satisfactory in terms of the renal preservation. We reviewed the outcome of BWT registered in JWiTS. Bilateral nephron-sparing surgery (NSS) was achieved only in 10 of 28 cases (36%) and 10 children (40%) developed impaired renal function. The protocol should be changed to improve the rate of preservation of the renal parenchyma. Preoperative chemotherapy should be performed to shrink the tumors, and subsequent NSS should be carried out after a central imaging evaluation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 小児外科

キーワード：小児腎腫瘍 予後因子 RASSF1A遺伝子 WTX遺伝子 両側性腎芽腫 腎機能障害 治療プロトコル 腎ラブドイド腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

小児腎腫瘍の治療の改善のため、欧米において大規模な多施設共同研究が行われ、集学的治療の進歩により治療成績は飛躍的に改善してきた。本邦においても 1996 年に日本ウィルムス腫瘍スタディグループが発足し、全国規模の多施設共同研究が実施され、その一次解析の結果は、2009 年に報告されたが、腎芽腫、腎明細胞肉腫の 5 年生存率はそれぞれ 91.1%、74.5%、RFS と、欧米の成績と遜色はなかった。しかし腎ラブドイド腫瘍の 5 年生存率は 22.2% と極めて不良であり、より強力な新規治療プロトコルが必要と考えられた。また、両側性腎芽腫に関しては、生存率は改善したものの、腎摘出に至る症例が多く、腎温存の見地からプロトコルの見直しが必要ではないかと考えられた。また、小児腎腫瘍に関しては未だ有効な生物学的リスク分類方法が確立されておらず、画一的なプロトコルによる治療が行なわれている。しかし有効な予後因子を見出し、リスクに応じた治療の層別化を行うことにより、低リスクの症例に対しては、治療を軽減することにより合併症の発生を抑えて患者の QOL を保ち、また高リスクの症例では、治療の強化や新規治療薬の導入などにより、再発率、死亡率の低下を図ることが可能となる。

米国 NWTS グループは約 2000 例の腎芽腫検体を用いて 1 番染色体短腕(1p)および 16 番染色体長腕(16q)の LOH 解析を実施し、1p LOH と 16q LOH を同時に示す favorable histology 腎芽腫はそれ以外の患者に比較して予後不良であったと報告した。しかし日欧間では腎芽腫の分子遺伝学的背景に違いがあり、1p LOH および 16q LOH を日本人腎芽腫のリスク分類の因子に加えるには、その有用性について日本人腎芽腫において検証する必要がある。

RASSF1A はがん抑制遺伝子であり、プロモーター領域のメチル化により不活化される。

小児がんでは肝芽腫、神経芽腫、成人がんでは肺癌、大腸癌、乳癌において RASSF1A メチル化は予後不良因子であることが報告されている。RASSF1A メチル化を腎芽腫の分子マーカーになるかどうかを検討した研究は他にない。そこで、これら 1p LOH および 16q LOH、RASSF1A メチル化などが腎芽腫の予後因子と成り得るのかを本邦の腎芽腫症例で検証する必要がある。この他、腎芽腫の原因遺伝子として 1990 年に WTI 遺伝子が、2007 年に WTX が単離され、また 1999 年に  $\beta$  カテニンをコードする CTNNB1 遺伝子の変異が腎芽腫の一部にみられることが報告されている。しかしこれら遺伝子異常が予後と関連するか否かは不明であり、今後の検証が必要である。

## 2. 研究の目的

- (1)腎芽腫における有用な新しい分子生物学的予後因子の候補として、既知の遺伝子異常の解析を行ない予後との相関を検討する。
  - (2)既知の予後因子も含めた各種予後因子と臨床データをもとに腫瘍をリスク分類し、リスク分類に応じて層別化したプロトコルを開発する。
  - (3)絶対的に予後不良の腎ラブドイド腫瘍(RTK)に対し、強力な治療プロトコルを開発する。
  - (4)両側性腎芽腫に対して、腎機能の温存に主眼をおいた治療プロトコルを開発する。
- 以上により、小児腎腫瘍に対する、より安全で有効性の高い新規治療法を確立することが、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### 1. Wilms 腫瘍における癌関連遺伝子メチル化分析

日本 Wilms 腫瘍スタディグループ(JWiTS)に登録された腫瘍 200 例を対象にする。ゲノム DNA を bisulfate 法により処理し、

methylation-specific PCR、定量 PCR 法、direct sequencing を行う。両分析法により RASSF1A 遺伝子メチル化の有無を検討する。

## 2. 各種遺伝子異常解析・予後との相関

JWiTS に登録された患者を対象として、既知原因遺伝子である WT1, IGF2, CTNNB1 および WTX 遺伝子の変異及び発現解析と、SNP array 解析を行う。また、遺伝子異常と予後との相関を解析する。

## 3. RTK 及び両側性腎芽腫に対する治療プロトコルの作成

過去の治療経験より、RTK に有効な抗腫瘍剤としては VCR, DOX, CY, IFM, VP16 などが挙げられるが、これらの薬剤と放射線治療を組み合わせ、RTK に対する従来よりも強力な新規治療プロトコルの作成を目指す。

両側性腎芽腫に関しては、従来のプロトコルではまず生検または腫瘍摘出を行った後に化学療法を施行していたが、腎機能温存の観点からまず化学療法を行い、腫瘍を縮小せしめたのちに腎機能を温存しつつ腫瘍を摘出する方針で、両側性腎芽腫に対する新規治療プロトコルを作成する。また術前化学療法による腫瘍の縮小を客観的に評価するため、中央画像診断システムの構築を目指す。

## 4. 研究成果

### (1) RASSF1A 遺伝子メチル化分析

JWiTS による腎芽腫 171 例の解析において、RASSF1A メチル化腫瘍患者は RASSF1A 非メチル化腫瘍患者に比較して overall survival、relapse free survival のいずれも有意に不良であった (図 1 A, B)。

### (2) 既知の遺伝子異常と予後との関連

JWiTS による 114 例の腎芽腫患者を対象にした preliminary study では、WT1 異常 36(31.6%)、CTNNB1 異常 29 (25.4%)、WTX 異常 26(22.8%)、IGF2 発現様式異常 24(21.1%)であ

り、予後との関連では、WTX 正常腎芽腫患者に比較して WTX 異常症例の overall survival は有意に不良であった ( $P=0.04$ )。 (図 2, A, B)

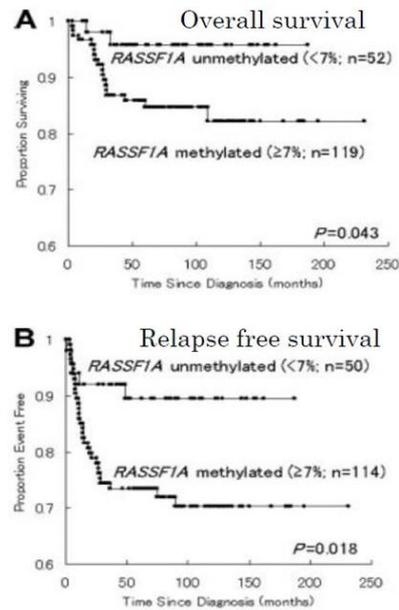


図 1 RASSF1A 遺伝子メチル化と予後

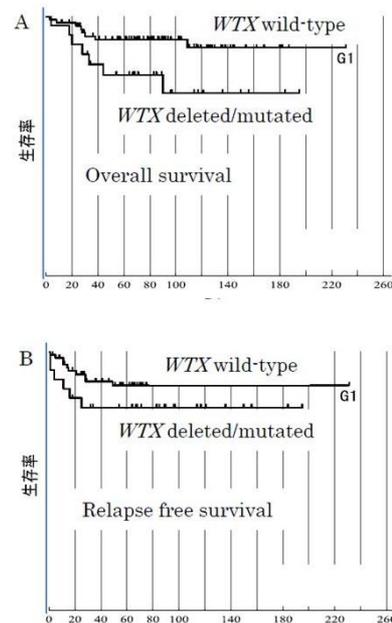


図 2 WTX 遺伝子異常と予後

### (3) 両側性腎芽腫の治療成績

新たな治療プロトコル作成にあたり過去の治療状況を把握するため、JWiTS) に登録

された両側性腎芽腫についての2次調査を行った。1996年から2011年までにJWiTS登録された腎腫瘍355例のデータベースから同時性両側性腎芽腫を抽出し、2次調査票を各施設に送付して治療経過及び予後に関して調査解析を行った。その結果、(1)両側性腎芽腫は31例で腎腫瘍全体の約10%であった。男女比は16:15、平均月齢は15.2月(7ヶ月~5歳)であった。(2)術前化学療法は20例で施行され、DD4A(16例)が最も多く用いられた。11例で化学療法前に生検が行われていた。重篤な有害事象はVODが1例に認められたのみであった。(3)手術の詳細が判明した20例中2例で両側、9例で片側腎摘が施行され、両側の腎実質が温存できたのは9例のみであった。(4)病理組織型はすべて腎芽腫 favorable histology で anaplasia は認めなかった。8例が fetal rhabdomyomatous nephroblastoma (FRN)であった。(5)WT1 遺伝子変異は25例で分析され、うち20例(80%)に変異が認められた。(6)予後の判明した22例中20例が生存しているが、6例が腎機能障害を有し、うち3例は腎不全に陥り人工透析・腎移植の適応となった。

以上の結果を踏まえて次期両側性腎芽腫に対するプロトコールとしては、(1)術前の生検は行わず、全例でDD4Aによる術前化学療法を施行する、(2)腫瘍の縮小を図った後に腎温存に留意して摘出術を施行する、(3)手術所見と病理組織所見に基づき術後化学療法、放射線療法を行う、(4)WT1の体細胞と胚細胞変異を検討する方針で作成し、近々全国で多施設共同臨床試験を開始する予定である。

(5) RTK に対する新規治療プロトコール  
RTK に対する治療成績の報告の分析より、現時点での有効なレジメンは、VCR,DOX, CY (VDCy)、 IFM,CBDCA, VP16(ICE)と IFM, VP16(IE)と考えられた。そこで、RTK に対する時期プロトコールとして、VCR,DOX, CY (VDCy)と IFM, VP16(IE)用いた新規プロトコ

ールを考案し、多施設共同研究を行うべく準備中である(図3)

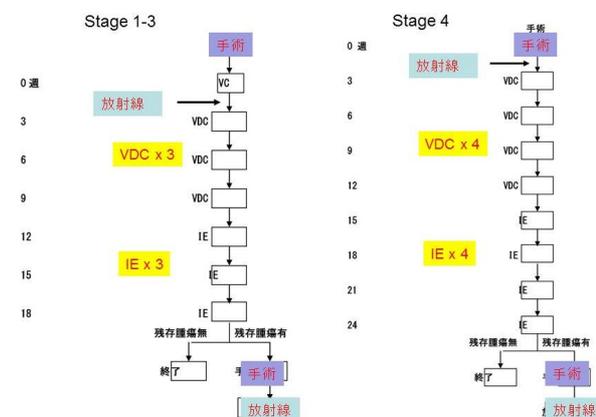


図3 RTK に対する新規治療プロトコール案

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10件)

1. Que T, Uehara S, Yamanaka H, Takama Y, Oji Y, Fukuzawa M. Expression of Wilms tumor 1 gene in a variety of pediatric tumors. J Pediatr Surg 46:2233-8, 2011 (査読有)
2. Wang J, Que T, Uehara S, Yamanaka H, Oji Y, Fukuzawa M. The role of WT1 gene in neuroblastoma. J Pediatr Surg 46:326-31, 2011 (査読有)
3. Ohshima J, Okita H, Koshinaga T, Oue T, Hinotsu S, Fukuzawa M, Kaneko Y (他7人 13番目). Methylation of the RASSF1A Promoter Is Predictive of Poor Outcome among Patients with Wilms Tumor, Pediatric Blood Cancer, 59: 499-505, 2012. (査読有)
4. Haruta M, Okita H, Fukuzawa M, Kaneko Y (他9名、12番目). Different incidences of epigenetic but not genetic abnormalities between Wilms tumors in Japanese and

- Caucasian children. *Cancer Sci*, 103: 1129-1135, 2012 ( 査読有 )
5. 野崎美和子、小児固形腫瘍の放射線治療、臨床放射線、査読なし、57,2012, 1321-1330.
  6. Honda S, Miyagi H, Kaneko Y, (他 8 名、6 番目). RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int*. (11):1147-52, 2013. ( 査読有 )
  7. Ueno H, Okita H, Akimoto S, Kobayashi K, Nakabayashi K, Hata K, Fujimoto J, Hata J, Fukuzawa M, Kiyokawa N. DNA methylation profile distinguishes clear cell sarcoma of the kidney from other pediatric renal tumors. *PLoS One*. 査読有, 8(4), 2013:e62233. doi: 10.1371 ( 査読有 )
  8. Kumon K, Kaneko Y. Social and biological factors influencing the outcomes of children with Wilms tumors in Kenya and other Sub-Saharan countries. *Transl Pediatr*. 3:42-46, 2014. ( 査読有 )
  9. Oue T, Koshinaga T, Okita H, Kaneko Y, Hinotsu S, Fukuzawa M. Bilateral Wilms tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Feb 12. [Epub ahead of print] ( 査読有 )
  10. Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y. RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. *Cancer Lett*. 2014 Mar 26. pii: S0304-3835(14)00179-7. doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.022. ( 査読有 )
- [ 学会発表 ] ( 計 12 件 )
1. Oue T, Uehara S, Yamanaka H, Takama Y, Oji Y, Fukuzawa M: Expression of WT1 Gene in a Variety of Pediatric Tumors, 44<sup>th</sup> PAPS Annual Meeting, Cancun, Mexico, 2011
  2. Oue T, Uehara S, Yamanaka H, Takama Y, Oji Y, Fukuzawa M: Expression of WT1 Gene in a Variety of Pediatric Tumors. International Surgical Week, Yokohama, Japan, 2011
  3. 大喜多肇, 秦順一, 柴田理恵, 高田礼子, 菊池春人, 藤本純一郎, 金子安比古, 堀江弘, 田中祐吉, 福澤正洋, 清河信敬. 日本における WT1 遺伝子変異を有するウィルムス腫瘍の臨床病理学的検討 . 第 100 回日本病理学会総会 , 4 月 28 日-30 日 , 2011 , パシフィコ横浜 ( 神奈川県 ) .
  4. 大島淳二郎, 春田雅之, 渡辺直樹, 新井康仁, 寺下友佳代, 長祐子, 井口晶裕, 有賀正, 大喜多肇, 越永従道, 大植孝治, 樋之津史郎, 中舘尚也, 堀江弘, 福澤正洋, 金子安比古. がん抑制遺伝子 RASSF1A のプロモーターメチル化は Wilms 腫瘍の予後不良因子である 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 , 11 月 25 日-27 日 , 2011 , ベイシア文化ホール ( 群馬県 ) .
  5. 上野瞳, 大喜多肇, 清河信敬. 小児腎肉腫における DNA メチル化解析 . 第 34 回日本分子生物学会年会 , 12 月 13 日-16 日 , 2011 , パシフィコ横浜 ( 神奈川県 ) .
  6. 野崎美和子、小児腫瘍の放射線治療、第 24 回日本放射線腫瘍学会 2011.11.18、神戸
  7. Oue T, Fukuzawa M, Okita H, Mugishima H, Horie H, Hata J, Saito M, Nozaki M, Chin M, Nakadate N, Hinotsu S, Koshinaga T, Kaneko Y, Kitano K, Tanaka Y. Current Results the Japan Wilms Tumor Study (JWiTS) and Future Protocols ( シンポジウム ) 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜、2012
  8. Oue T, Uehara S, Fukuzawa M, Miyoshi Y,

- Ohta H, Hashii Y: Problema of Childhood Cancer Survivors in Pediatric Surgical Clinic. 44<sup>th</sup> Congress of the International Society of Paediatric Oncology, London, UK, 2012
9. 上野瞳, 大喜多肇, 秋元信吾, 福澤正洋, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. 網羅的 DNA メチル化解析による腎明細胞肉腫 (CCSK) の分子マーカー. 第 101 回日本病理学会総会, 4 月 26 日-28 日, 2012, 京王プラザホテル (東京都新宿区) .
  10. Que T, Fukuzawa M, Okita H, Horie H, Saito M, Nozaki M, Chin M, Nakadate N, Hinotsu S, Koshinaga T, Kaneko Y, Tanaka Y: Bilateral Wilms' tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol. 45<sup>th</sup> Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, China, 2013
  11. 大植孝治, 福澤正洋, 越永従道, 大喜多肇, 金子安比古, 堀江 弘, 斉藤正博, 野崎美和子, 陳 基明, 中館尚也, 樋之津史郎, 田中祐吉, 春田雅之, 桑島成子, 高安 肇, 日本ウィルムス腫瘍研究グループに登録された両側性腎芽腫の検討 第 55 回日本小児血液・がん学会, 福岡, 2013
  12. 野崎美和子, 最新放射線治療技術の小児がんへの応用・陽子線・重粒子線・IMRT の基礎・相違点. 厚生労働省科学研究費ワークショップ: 小児がんの粒子線治療: 最新の成績と臨床研究の現状小児がん粒子線治療技術の小児がんへの応用, 2014.2.26, 高崎
- 〔図書〕(計 4 件)
1. 大植孝治, 福澤正洋, 小児がん診療ハンドブック(堀部敬三編) 腎腫瘍, 459-466, 医薬ジャーナル社, 2011
  2. 大植孝治, 小児科 診断・治療指針 (遠藤文夫編) Wilms腫瘍(腎芽腫), 894-897, 中山書店, 2012
  3. 大植孝治, 別冊日本臨床 腎臓症候群(第 2 版) 上, 腎芽腫(Wilms腫瘍), 629-632, 日本臨牀社 2012
  4. 大植孝治, 系統小児外科学第 3 版(福澤正洋, 中村哲郎, 窪田昭男編), 病理組織検査法, 72-74, 分子標的治療, 327-330, 再生医療, 331-336, 腎芽腫, 712-718, 肝腫瘍, 719-729, 横紋筋肉腫, 730-736, 膵腫瘍, 743-746, 悪性リンパ腫, 754-756, 永井書店, 2013
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
福澤 正洋 (FUKUZAWA, Masahiro)  
 大阪大学・医学部・名誉教授  
 研究者番号: 6 0 1 6 5 2 7 2
- (2) 研究分担者  
大植 孝治 (OUE, takaharu)  
 大阪大学・医学部・講師  
 研究者番号: 5 0 3 1 4 3 1 5
- 金子 安比古  
 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所・研究所長  
 研究者番号: 5 0 3 7 3 3 8 7
- 野崎 美和子  
 獨協医科大学越谷病院・放射線科・教授  
 研究者番号: 3 0 1 9 7 7 2 7
- 大喜多 肇  
 国立成育医療研究センター研究所・室長  
 研究者番号: 5037260
- 樋之津 史郎  
 岡山大学病院・新医療研究開発センター・教授  
 研究者番号: 8 0 3 2 3 5 6 7