

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 3月 31日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390328

研究課題名（和文）日本小児肝がんスタディグループの新たな治療戦略のための分子基盤の構築

研究課題名（英文）Molecular analysis for developing the new targeting therapy in Japanese Pediatric Liver Tumor study group.

研究代表者

上松瀬 新 (KAMIMATSUSE ARATA)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：90569881

研究成果の概要（和文）：

小児肝がんは、化学療法の導入によって予後が改善したが、遠隔転移を来す高リスク群や根治的肝切除術が困難な中間リスク群の予後は必ずしも良好ではない。そこで、予後不良群と予後良好群から得られた100あまりの腫瘍のゲノム異常と遺伝子発現解析を行い、分子標的を抽出した。抽出された分子標的は、血管増殖因子、テロメラーゼ遺伝子（TERT）およびWntシグナル関連遺伝子であった。これらを用いて、肝芽腫患者を3群に層別すると臨床経過とほぼ一致した。これらの遺伝子に対する阻害剤とsiRNAを用いて、肝芽腫細胞株によるセルテストと、免疫不全マウスへの移植片への効果をみるアニマルテストを行った。その結果、これらは有効であり、悪性度の高い肝芽腫への分子標的治療としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The cumulative survival rates of pediatric liver tumor, especially hepatoblastoma have been increased but the those of the high risk patients with distant metastasis and those of the intermediate risk patients whose tumors are difficult to be radically resected remain poor. In this study, more than 100 hepatoblastoma tumors were analyzed in genomic aberrations and gene expression using microarray and molecular targets were selected. Selected targets were mainly classified in vascular growth factors, telomerase associated genes and Wnt signal related genes. Using these molecular markers, the hepatoblastoma patients were classified into three groups: low, intermediate, and high risk groups. The outcomes of these groups were almost accorded to the clinical courses. Inhibitors and siRNA for these targets were used for cell testing in hepatoblastoma cultured cell lines and for animal testing using NOD-SCID mice with hepatoblastoma implant. These testing suggested that these targets are promising candidates as molecular targeting therapy in unfavorable hepatoblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：小児腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

肝芽腫は小児の肝悪性腫瘍の中では最も多く、本邦では、日本小児肝癌スタディグループ (JPLT) で共通の治療ガイドラインを提唱し、治療的研究を行ってきた。その結果、現在では肝芽腫全体の3年生存率が約70%となり、肝3区域までに限局する腫瘍 (標準リスク群) では90%近くの生存率が得られ、術前・術後化学療法の有効性が明らかとなった。しかし、肝4区域を占める腫瘍のような中間リスク群や遠隔転移のある高リスク群例の生存率は、未だに不良である。近年、幹細胞移植を併用した大量化学療法により遠隔転移が消失するもの、肝移植で完治する例が報告されて平成21年から保険適応となり、治療が新たな局面を迎えている。こうした中で、JPLT では、切除腫瘍検体を保存し、 β -カテニン遺伝子の活性化変異が高率に認められること、テロメラーゼ活性が腫瘍の悪性度に相関していること、さらに病理分類が予後と関連している可能性を報告し、世界に先駆けて基礎的研究からのアプローチを行ってきた。現在は、欧米の SIOPEL と COG のグループとの共同の検討からも、標準リスク群では化学療法の軽減が、高リスク群では新たな治療プロトコールが必要とされ、それぞれに共同の作業部会を設置したところであるが、リスクを規定している因子が必ずしも明かでないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究は、新たな治療戦略へのブレークスルーを行うべく、JPLT に保存されている多検体と臨床データを利用し、トランスレーショナルリサーチを行うものである。そこで、JPLT で保存された検体と臨床データを用いて、網羅的遺伝子異常解析、遺伝子発現解析ならびにテロメラーゼ及び Wnt/ β -catenin シグナルの検討から、標準リスク群と中間・高リスク群を鑑別する因子を検索し、予後良好例の中で化学療法が不要な低リスク群を層別する因子を見出す。一方、中間・高リスク群では、腫瘍進展あるいは転移能を規定する分子標的を見出し、新たな臨床試験を組立てることを目的とした。

3. 研究の方法

肝芽腫は、1998 年から JPLT-2 では全国で統一した治療ガイドラインを示して治療すると共に、切除検体を保存してきており、これら 200 検体以上の腫瘍検体のうち、中央病理診断された 100 例あまりと、細胞株として HepG2、JPLT で樹立した細胞株 JPHB-1, 2, 3 を対象に検討を行なった。

(1) 網羅的遺伝子異常解析: SNPs アレイ等の

マイクロアレイシステムを用いて、これらの腫瘍における網羅的遺伝子異常の解析を行なった。

(2) 網羅的遺伝子発現解析: 全ゲノム型発現解析アレイを用いて、これらの腫瘍における網羅的遺伝子発現を検討した。

(3) β -カテニン異常、TERT との関連: 以前我々が報告したテロメラーゼ活性や TERT が肝芽腫の予後と相関することから、 β -catenin 異常、BRG1 発現との関連の検索し、Wnt シグナルを解析する。

(4) リスク別マーカーの選別: 1) -3) で得られた結果と、臨床経過・病理分類との関連を検討し、中間・高リスク群における局所再発と転移能を決定する遺伝子異常を探索すると共に、標準リスク群の中で特に予後良好な低リスク群を選別する因子を同定する。

(5) 臨床試験への導入の検討: 上記の結果を総括し、肝芽腫の発生、進展のメカニズムをバイオインフォマティクスを用いて解析する。そこで、悪性化に関連している異常やシグナル伝達系を解明し、標準リスク群では治療の軽減可能な低リスク群を層別できるマーカーを選別し、一方、中間・高リスク群には新たな分子標的を用いた分子診断とターゲット治療を見出し、広島大学で開発したセルテスティング、さらに動物実験でのアニマルテスティングの前臨床研究を行い、とくに抗テロメラーゼ剤や Wnt シグナル関連の分子標的に対する新たな治療薬を導入も考慮して、前臨床試験データを蓄積する。

4. 研究成果

(1) 網羅的遺伝子変化の検索: 106例の肝芽腫腫瘍DNAと各々の正常組織DNAを制限酵素で処理し、アダプターをつけた後に増幅後、現有のGene ChipシステムにてSNPアレイを用いて、全染色体上にある約300万個のSNPsのシグナルを検出した。同一患者の正常組織 (末梢血リンパ球、正常肝組織) を対照として検討した結果、染色体1q, 2q, 3p, 4pq, 9p, 17qに高頻度に異常を認めた (図1)。両親のDNA23組も対象として、SNP解析用アレイにて高頻度に欠失あるいは二本が同一親由来のホモ領域での共通欠失領域の同定を試みたところ、11番と13番、19番染色体に候補部位が見出された。これらの欠失部位での欠失アレルの親由来を検討したところ、11番と13番染色体で母方或いは父方に有意に偏って欠失を認めた。

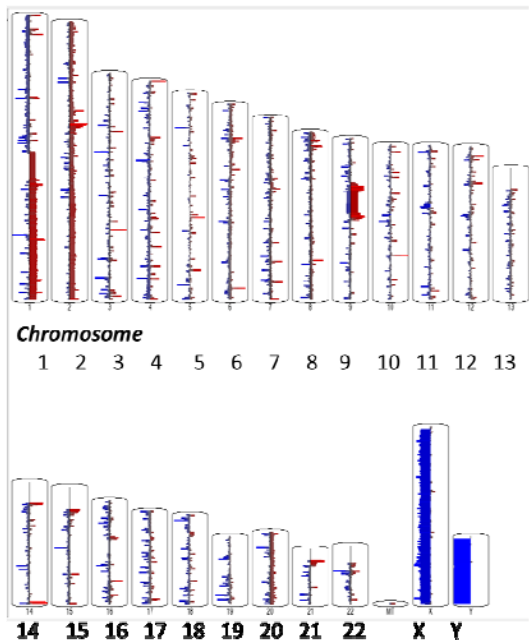


図1：SNPアレイデータ
赤がgain、青がlossの部位、XYは性差が分けられていないために欠失として出ている。

(2) 網羅的遺伝子発現の検索：全ゲノム型の発現解析アレイにて検索し、1. のゲノム異常のある部位で有意に発現が変動している遺伝子を抽出した結果、幾つかの遺伝子の発現が有意に変動し、これの遺伝子を分類すると細胞増殖、癌化、細胞生存に関わる遺伝子であった（図2）。

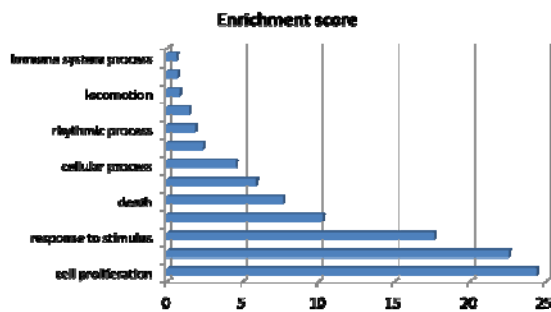


図2：予後不良の肝芽腫で有意に発現している遺伝子の分類

そこで、これらの遺伝子は、定量RT-PCR法と購入した細胞解析用PCR（シングルセルスライドサイクラー）で検証したところ、3つの遺伝子で有意の発現変動を認めた。このうち、2つは4番染色体にある血管成長因子に関わる遺伝子であった（図3）。また、(1)での欠失の部位から、肝芽腫の発生に関わるインプリンティングの検索と同定を行った。その結

果、6遺伝子はその領域内に存在し、網羅的遺伝子発現検索から検討すると腫瘍で4遺伝子の発現が低下しており、残りの2つの遺伝子は発現が上昇していた。これらは、インプリンティング遺伝子の可能性があり、発現上昇した遺伝子は父性遺伝子であった。そこで、肝芽腫に関与するインプリンティングも含めて、遺伝子発現変化の機序、ネットワーク解析を行ったところ、Wntシグナル下流遺伝子とTERT遺伝子発現レベルがリスクと有意に関連していることが示された。

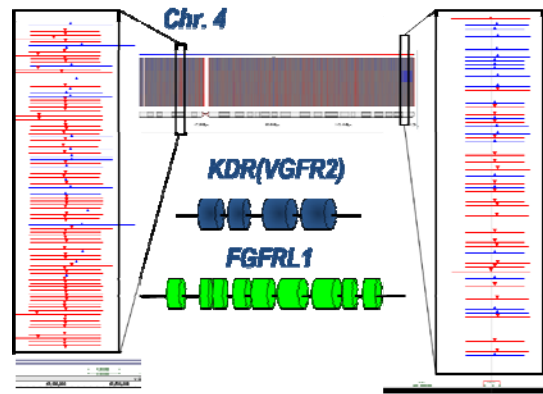


図3：予後不良な肝芽腫で有意に発現している4番染色体上の2遺伝子：血管成長因子にかかわるKDRとFGFR1遺伝子

Wntシグナル異常、テロメラーゼとネットワーク解析：本症で高頻度に見られるβ-カテンン異常、テロメラーゼの活性部位であるTERT(telomerase reverse transcriptase)の発現、さらにこの両者と結合するBRG1の発現レベルを検討し、上記の遺伝子との間を解析ソフト（IPA: Ingenuity Pathways Analysisなど）を用いて解析したところ、Wntシグナルの上流の変化が推定された。一方、生物学的特性と関連しているバイオマーカーとしては、Wntシグナル異常、テロメラーゼとネットワーク解析から、MYCをはじめとする10数個の遺伝子が抽出された。

(3) リスク別マーカーの選別：臨床病理分類、臨床リスク分類との関連を解析したところ、TERTとさらにWntシグナル下流のMYCをはじめとする7遺伝子を選別し、これらの発現により、肝芽腫症例を高リスク、中間リスク、及び低（標準）リスクに層別した。これらの層別された各リスクの患者の生存曲線は図4のごとくになった。

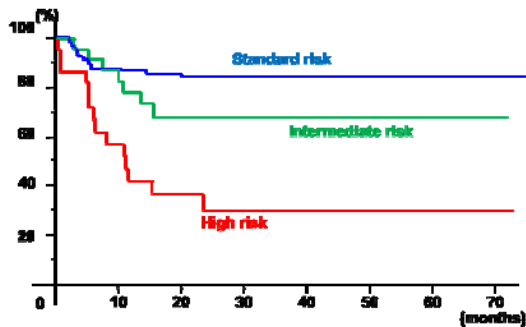


図4：生物学的特性からリスク分類した症例の生存曲線

(4) セルテストとアニマルテスト：そこで、これらの遺伝子及び関連遺伝子について、肝芽腫細胞株での遺伝子発現阻害によるセルテストと、NOD-SCIDマウスへの腫瘍接種によるアニマルテストで効果判定を行った。ターゲットとしては先に見出した*KDR*と*FGFRL1*遺伝子であり、これらの抑制物質とSiRNAを用いて、肝芽腫細胞株によるセルテスト、NOD-SCIDマウスへの移植腫瘍への効果をみるアニマルテストを行った。また、分子標的*MYC*に対するsiRNAを肝芽腫細胞株(HEpG2並びにJPHB 1, 2, 3)に投与して、細胞内代謝産物の変動を検討したところ、増殖停止とともにアポトーシスと肝還元酵素の誘導が生じていた。肝芽腫細胞株を皮下注射して腫瘍を形成させたNOD-SCIDマウスでの*in vivo*で*MYC*のsiRNAの局所投与をおこなった腫瘍増大は継続し、有意な病理学的差異は認められなかった。上記の結果から、Wntシグナル下流遺伝子とTERTによって肝芽腫のリスク評価が可能であった。その下流遺伝子の一つである*MYC*単独の抑制では有効な効果はえられず、さらに標的を変更、或いは追加することが必要と考えられた。

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 22 件)

1. López-Terrada D, Hiyama E, et al. Proceedings of the Los Angeles COG International Liver Tumors Symposium. Modern Pathology. in press. 査読有
2. Tajiri T, Hiyama E, et al. Surgical strategies for unresectable hepatoblastomas. Journal of Pediatric Surgery. 47: 2194-2198. 2012. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.09.006. 査読有
3. Ogura T, Hiyama E, et al. Clinical feature of anaplastic lymphoma kinase-mutated neuroblastoma. Journal of Pediatric Surgery. 47: 1789-1796. 2012. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.05.007. 査読有
4. Iehara T, Hiyama E, et al. Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12 months of age and older really excellent? European Journal of Cancer. 48: 1107-1112. 2012. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.01.010. 査読有
5. Sakabe R, Hiyama E, et al. Prognostic significance of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase expression in ampullary carcinoma. Annals of Surgical Oncology. 19: 3072-3080. 2012. DOI: 10.1245/s10434-012-2245-2. 査読有
6. Yuasa Y, Hiyama E, et al. Histological loss of pancreatic exocrine cells correlates with pancreatic exocrine function after pancreatic surgery. Pancreas. 41: 928-933. 2012. DOI: 10.1097/MPA.0b013e31823d837d. 査読有
7. Hiyama E, et al. Neoplastic transformation by TERT in FGF-2-expanded human mesenchymal stem cells. International Journal of Oncology. 39: 5-11. 2011. DOI: 10.3892/ijo.2011.1029. 査読有
8. Ueda Y, Hiyama E, et al. Wnt signaling and telomerase activation of hepatoblastoma: correlation with chemosensitivity and surgical resectability. Journal of Pediatric Surgery. 46: 2221-2227. 2011. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.003. 査読有
9. Kato Y, Hiyama E, et al. Impact of intratumoral thymidylate synthase expression on prognosis after surgical resection for ampullary carcinoma. World Journal of Surgical Oncology. 103: 663-668. 2011. DOI: 10.1002/jso.21879. 査読有
10. Hishiki T, et al. Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT. Pediatric Surgery International. 27: 1-8. DOI: 10.1007/s00383-010-2708-0. 2011. 査読有
11. Nagatani S, Hiyama E, et al. Edaravone,

- a Free Radical Scavenger, Promotes Engraftment of Intraportally Transplanted Islet Cells. *Pancreas*. 40: 126-130. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181f7e436. 2011. 査読有.
12. 檜山 英三, 他. テロメラーゼ. 検査と技術. 39: 68-70. 2011. 査読無
 13. Kojima K, Hiyama E, et al. Telomerase activation without shortening of telomeric 3'-overhang is a poor prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Science*. 102: 330-335. 2011. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01786.x. 査読有.
 14. Arai Y, Hiyama E, et al. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 49: 596-609. 2010. DOI: 10.1002/gcc.20770. 査読有.
 15. Shalaby T, Hiyama E, et al. Telomere maintenance as Therapeutic Target in Embryonal Tumours. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 10: 196-212. 2010. URL: <http://www.eurekaselect.com/71171/article>. 査読有.
 16. Ohtaki M, Hiyama E, et al. A robust method for estimating gene expression states using Affymetrix microarray probe level data. *BMC Bioinformatics*. 11: 183. 2010. doi:10.1186/1471-2105-11-183. 査読有.
 17. Arifin M, Hiyama E, et al. Carcinogenesis and cellular immortalization without persistent inactivation of p16/Rb pathway in lung cancer. *International Journal of Oncology*. 36: 1217-1227. 2010. URL: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/36/5/1217>. 査読有.
 18. Kamimatsuse A, et al. Surgical intervention for patent ductus venosus. *Pediatric Surgery International*. 26: 1025-1030. 2010. DOI: 10.1007/s00383-010-2662-x. 査読有.
- [学会発表] (計 58 件)
1. Hiyama E, et al. Session of the discipline groups to plan for new trials. SIOPEL group Spring Meeting. March 15, 2013. Bologna, Italy.
 2. Hiyama E, et al. Low risk hepatoblastoma. SIOPEL group Spring Meeting. March 14, 2013. Bologna, Italy.
 3. Piotr Czauderna, Hiyama E, et al. CHICS diagnostic risk grouping presentation. SIOPEL group Spring Meeting. March 14, 2013. Bologna, Italy.
 4. 本多 昌平, 檜山 英三, 他. メチル化解析による予後予測マーカーの予測. 第 23 回日本消化器癌発生学会総会. 2012 年 11 月 16 日. 徳島県鳴門市.
 5. Hiyama E. A genome-wide association study identifies new candidate loci associated with progression of hepatoblastoma in JPLT2 study experience. SIOP2012. October6, 2012. London.
 6. Ueda Y, Kamimatsuse A, et al. Echanism of Wnt signal pathway activation in hepatoblastoma. SIOP2012. October6, 2012. London.
 7. Hiyama E, et al. Next-generation sequencing: Integrated exotome analysis in human multiple neuroblastoma. ANR2012. June 19, 2012. Tronto, Canada.
 8. Marcio H. Malogolowkin, Hiyama E, et al. Hepatocellular carcinoma in children and Adolescents:The international Therapeutic experience. 43th APSA Annual Meeting APSA-IPSO SYMPOSIUM. MAY 19-20, 2012. TEXAS, USA.
 9. 本多 昌平, 檜山 英三, 他. 肝芽腫の組織型に関する DNA メチル化以上と予後予測マーカー確立の試み. 第 49 回日本小児外科学会学術集会. 2012 年 5 月 14 日. 横浜市.
 10. Hiyama E, et al. Cisplatin plus pirarubicin based chemotherapy for hepatoblastoma: Experience and future in japanese study group for pediatric liver tumor (JPLT). The 7th SIOP Asia Congress. April 22, 2012. Yogyakarta, Indonesia.
 11. 河嶋 茉澄, 檜山 英三, 他. 腫瘍破裂で発見された肝芽腫の 1 例. 第 158 回日本小児科学会 広島地方会. 2011 年 12 月 4 日. 広島市.
 12. 小倉 薫, 他. 家族性大腸腺腫家系に発生した肝芽腫の 1 例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25 日. 群馬県前橋市.
 13. 池田 均, 檜山 英三, 他. 公知扱い

- にならないピラルビシンの国内使用実績. 第48回日本小児外科学会学術集会. 2011年7月20日. 東京都.
14. 檜山 英三. 小児肝癌の国際共同臨床試験とゲノム解析. 第32回IFN治療研究会. 2011年6月24日. 広島市.
 15. 檜山 英三. 小児肝腫瘍に対する治療の現状と将来. 第40回九州地区小児固形悪性腫瘍研究会. 2011年2月19日. 福岡市.
 16. 上田 祐華, 上松瀬 新, 他. 肝芽腫における β カテニンの転写調節に関するBRG1およびTERT発現に関する検討. 第26回日本小児がん学会学術集会. 2010年12月17日. 大阪市.
 17. 檜山 英三, 他. 小児肝癌の国際的標準治療法の確立に関する研究. 第26回日本小児がん学会学術集会. 2010年12月17日. 大阪市.
 18. 菱木 知郎, 他. 難治性肝芽腫の治療～拡大肝切除・転移巣切除・IVR. 第26回日本小児がん学会学術集会. 2010年12月17日. 大阪市.
 19. 上松瀬 新, 他. JPLT2における高リスク群肝芽腫症例の検討. 第26回日本小児がん学会学術集会. 2010年12月17日. 大阪市.
 20. Hiyama E, et al. Outcome of Hepatoblastoma Treated with the JPLT-2 Protocol from the Experience of JPLT (Study Group for Pediatric Liver Tumor) Study. SIOP2010. 2010年10月22日. Boston, USA.
 21. 上松瀬 新, 他. 小児肝芽腫に対するJPLT-2プロトコルの治療成績. 第47回日本小児外科学会学術集会. 2010年6月17日. 名古屋市.
 22. Hiyama E, et al. Cisplatin plus pirarubicin chemotherapy and combination ifomide, etoposide, pirarubicin, and carboplatin chemotherapy for hepatoblastoma. ASCO 10th Annual Meeting. 2010年6月4日. Chicago, USA.

[その他]

日本小児肝癌スタディグループ(JPLT)ホームページ:

URL: <http://home.hiroshima-u.ac.jp/eiso/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上松瀬 新 (KAMIMATSUSE ARATA)
 広島大学・病院・病院助教
 研究者番号: 90569881

(2) 研究分担者

檜山 英三 (HIYAMA EISO)
 広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
 研究者番号: 00218744

亀井 尚美 (KAMEI NAOMI)
 広島大学・病院・医科診療医
 研究者番号: 20569727
 (H22→H23)

外丸 祐介 (SOTOMARU YUSUKE)
 広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授
 研究者番号: 90309352

小倉 薫 (OGURA KAORU)
 広島大学・病院・講師
 研究者番号: 10346653
 (H23→H24)

(3) 連携研究者

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

菱木 知郎 (HISHIKI TOMORO)
 千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
 研究者番号: 00375776

渡邊 健一郎 (WATANABE KENICHIRO)
 京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
 研究者番号: 20324634

大植 孝治 (OUE TAKAHARU)
 大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
 研究者番号: 50314315

近藤 知史 (KONDO SATOSHI)
 名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
 研究者番号: 50234935

井田 孔明 (IDA KOMEI)
 帝京大学・医学部・教授
 研究者番号: 60313128

中川原 章 (NAKAGAWARA AKIRA)
 千葉県がんセンター(研究所)・研究局・局長
 研究者番号: 50117181