

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253095

研究課題名(和文) 小児固形悪性腫瘍の非侵襲的診断と新規治療開発のためのトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文) Development of non-invasive diagnosis and novel therapies for pediatric solid tumor

研究代表者

細井 創 (Hosoi, Hajime)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20238744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：小児がんについて、わが国の先端的基礎研究を結集・統合し、次期臨床試験に応用できるトランスレーショナルリサーチを推進することを目的とした。その結果、血液から抽出できる小児がんの新規バイオマーカーを探索し、治療層別化へ応用可能なマーカーを抽出。低・中間リスク小児がん患者に対する副作用軽減を目指し、間葉系幹細胞を用いたドラッグデリバリーシステムの可能性。高リスク小児がん患者に対するペプチドワクチン、PD-1阻害剤、NKT細胞療法を用いた新規免疫療法の可能性。超高リスク小児がんに対し、次世代ゲノム解析技術を用いた詳細な分子病態を解析・新規分子標的の候補となるゲノム異常、について明らかにした。

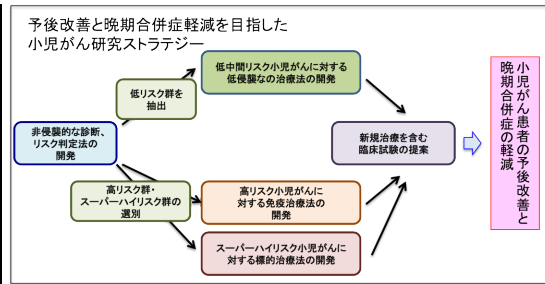
研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to develop a novel non-invasive diagnostic methods and therapeutic strategy for pediatric cancer, which can be translated into the upcoming clinical trial. We have identified 1) potent serum-based biomarkers for the therapeutic stratification of neuroblastoma and rhabdomyosarcoma, 2) a potent delivery system using human mesenchymal stem cells targeting neuroblastoma, 3) a novel immunotherapeutic strategy for pediatric cancers using peptide vaccine system, anti PD-1 antibody, or NKT cell therapy, 4) novel molecular-based stratification system for pediatric cancers detected by next generation sequencing analysis.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：小児がん トランスレーショナル・リサーチ がん免疫療法 liquid biopsy 神経芽腫 横紋筋肉腫

1. 研究開始当初の背景

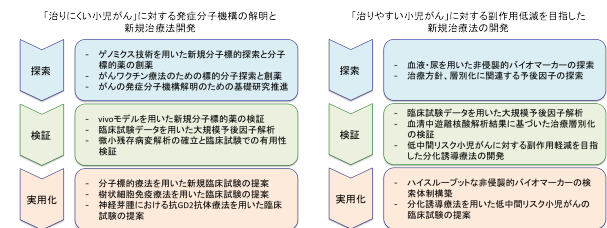
小児がんの治療の進歩により、その生存者（経験者）は年々増加し、今やその成長過程や成人後の晩期合併症が大きな問題となっている。一方、この30年間、診断と治療の進歩の恩恵を被ることなく、依然として生命予後の不良のままである難治性小児がんも少なからず残されている現状がある。小児がんでは、その希少性から、患者のQOLと予後のさらなる改善のためには、多施設共同臨床試験が必須であるが、その臨床試験では、検証する仮説となる基礎的研究結果がまた必須となる。そこで、我々は、わが国発の1) 非侵襲的手法による迅速・的確な病理ならびに悪性度診断技術を用い、妥当で新たな治療層別化を行うことを第一の目的とする。また、2) 小児がんの病態解明に基づく新規分子治療標的の同定と治療薬の開発のための研究を連携・連結・統合し、低・中間リスク群小児がん患者の治療軽減ならびに高・超高リスク群小児がん患者の予後改善を目指した新規治療薬（法）の開発のためのトランスレーショナルリサーチを行い、その成果を臨床試験に持ち込むことを第二の目的として、上記の研究を行う。申請者は現在までに、代表的な小児がんである神経芽腫や横紋筋肉腫を中心に、トランスレーショナルリサーチを推進し、その成果を上げてきた。特に、血清中腫瘍由来遊離核酸を用いた遺伝子診断への応用では世界をリードする研究成果を挙げている(Yagyu S, Hosoi H et al. Cancer Lett. 2011, Miyachi M, Hosoi H et al. Clin Cancer Res. 2009)。この手法は、血液検査のみで迅速かつ非侵襲的に、治療層別化に必要ながんの遺伝子解析が可能で、がん組織検体が入手困難なことの多い小児がん診療において有用性が極めて高く、現に全国から多数の解析依頼を受けている。また、申請者、分担研究者らは、次世代シーケンサーやDNAマイクロアレイなど最新のゲノム解析技術を基にした新規小児がん治療への分子基盤の構築、あるいは、分子標的療法や免疫療法を用いた小児がん特異的治療の開発を進めており、世界にその成果を発信している(Chen Y, Takita J et al. Nature. 2008, Ohira M, Nakagawara A et al. Cancer Sci. 2010)。これらの成果をより発展させ、有機的に結合させるため、申請者は本共同研究を計画した。これまでの基礎研究の成果を小児がん臨床試験に応用し、また、臨床試験より得られた貴重な患者データや検体を基礎研究に有効に活用することで、予後良好な小児がんに対する最小限の副作用の治療法の開発と、予後不良な難治性小児がんに対するがん細胞特異的分子標的薬や免疫療法の開発が可能になると考えられる。



2. 研究の目的

脳腫瘍に次ぎ最も頻度の高い小児固形悪性腫瘍である神経芽腫と、最も頻度の高い小児軟部肉腫である横紋筋肉腫を対象に、各小児がん共同臨床試験研究で蓄積された臨床データと検体バンクを用い、網羅的分子生物学的手法で当該小児がんの特異的遺伝子異常を解析し、それらの機能解析から小児がんの新規診断法、治療標的の探索を行う。これらの結果を将来の臨床試験に応用し、治療軽減が可能な「治りやすい小児がん」の選別とそれらに対するより低侵襲の新規治療薬（法）の開発、また予後不良な「治りにくい小児がん」の選別と新規治療法の開発を目指す。

1. 血液を用いた小児がんのバイオマーカー探索と治療層別化への応用
2. 低・中間リスク小児がん患者に対する副作用軽減を目指した分化誘導療法ならびに癌抑制遺伝子活性化治療法の開発
3. 高リスク小児がん患者に対する新規免疫治療法の開発
4. 超高リスク小児がんの病態解明に基づく新規分子標的治療薬開発のための基礎研究



3. 研究の方法

主任研究者、分担研究者は、それぞれ大学院生や研修員等を研究協力者として、研究活動の円滑な遂行を目指す。主任研究者は、毎年数回の報告会を開催し、研究活動の進捗状況を確認する。研究成果は、本研究期間内に国内外の当該分野の学術集会で発表されることを目標とし、各小児がん研究グループに対して、本研究結果を踏まえた次期臨床試験の提案を最終の目標とする。

4. 研究成果

- 1) 血液を用いた小児がんのバイオマーカー探索と治療層別化への応用

血清を用いた小児がんの診断、層別化治療への応用(研究分担: 細井、家原、土屋、宮地)

横紋筋肉腫において miR-206 遺伝子を血清中で検出し、非侵襲的な診断、層別化治療への応用について検討した。小児がん血清検体 60 検体(横紋筋肉腫 28 例、非横紋筋肉腫 32 例)を対象として、血清 200 μ l を用いて microRNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR により血清 1 μ l 当たりのコピー数を測定した。血清 miR-206 発現は、横紋筋肉腫症例において有意に高値であり、新規診断的バイオマーカーとして有用であることが証明された。また、血清 miR-206 発現は、転移例において高値を示し、かつ、高発現群の生存期間中央値が有意に低値であることより、新規予後因子となりうることを示唆された。

小児固形悪性腫瘍の less invasive fluid biopsy への試み(研究分担: 檜山)

血漿中の遊離 DNA を用いた診断法を検討した。小児がん患者の診断時の血漿中の遊離 DNA 量を測定したところ、病期が進行した例で遊離 DNA 量が有意に高値であった(図 1)。次に、神経芽腫の MYCN 遺伝子増幅検出に血漿遊離 DNA を用いたデジタル PCR 法にて、増幅例 8 例、非増幅例 7 例を検討した結果、従来のリアルタイム PCR 法と同等で、より再現性のよい結果が得られた(図 2)。より微量の DNA サンプルから検出可能で、正確なコピー数の算出には、DNA 量が 2.5-5 ng 程度が適していると考えられた。となった。次に、血漿中遊離 DNA を用いて、50 個程度の遺伝子の変異が検出可能な Cancer Panel (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2) のライブラリー作成を行い、検出を試みたところ、いくつかの腫瘍の遺伝子変異検出が可能であった。

2) 低中間リスク小児がんに対する副作用軽減を目指した治療法の開発

ヒト間葉系幹細胞を用いた神経芽腫に対するドラッグデリバリーシステムの開発(研究分担: 田尻)

本研究では、MSC を用いた神経芽腫に対する新規治療法の開発を目的とした。神経芽腫発生モデルである MYCN トランスジェニックマウス(MYCN-TgM)を用いて、神経芽腫における MSC の homing 効果について検討を行った。in vivo における神経芽腫に対する homing 効果から、MSC が神経芽腫においても腹腔内投与によるドラッグデリバリーシステムとしての可能性を持つことが示唆された。

3) 高リスク小児がんに対する新規免疫治療法の開発と臨床応用 小児固形悪性腫瘍における Glypican3 発現と

ペプチドワクチン療法(研究分担: 木下)

本研究では小児固形悪性腫瘍 141 例について GPC3 発現を免疫組織学的検討血清学的検討(図 1)し、また剖検検体における正常組織における GPC3 発現の検討(図 2)を行った。肝芽腫や Yolk sac tumor では免疫組織、血清ともに高発現していた。また正常検体の検討では 1 歳未満の肝、腎などの組織にて発現を認めた。以上より、GPC3 を発現する 1 歳以上の症例においては GPC3 ペプチドワクチンの良い適応となることを示唆された。

Alpha-fetoprotein (AFP) -L2 分画による小児固形悪性腫瘍の新規診断システム開発(研究分担: 木下)

本研究では小児期における L2 分画が高値を示す腫瘍における診断システムを開発することを目的とした。LCA および Con A を用いた電気泳動法の併用で、肝がんによる AFP 上昇と生理的、または胚細胞腫瘍による AFP 上昇を鑑別出来ることが示された。

横紋筋肉腫に対する免疫療法の開発(分担研究: 宮地)

転移性横紋筋肉腫の中でも予後不良な PAX3-FOXO1 陽性横紋筋肉腫の細胞株 Rh30 を用いた検討で、PAX3-FOXO1 ノックダウンにより、腫瘍表面の PD-L1 発現が低下し、単核球との共培養の系では CD8 陽性 T 細胞の分裂能は亢進した。これらの結果より、PAX3-FOXO1 は PD-L1 の発現を亢進させ、抗腫瘍免疫に対して抑制的に働くことが明らかになった。

神経芽腫に対する NKT 細胞免疫系を用いた免疫細胞療法の開発研究(研究分担: 菱木)

神経芽腫に対する NKT 細胞を用いた免疫療法の臨床応用を目指し、神経芽腫細胞株に対する NKT 細胞の抗腫瘍効果および抗 GD2 抗体療法併用による相乗効果を検討した。NKT 細胞を用いた免疫療法は抗 GD2 抗体療法の治療効果を増強する可能性があり、今後臨床試験等による更なる検討が必要と考えられる。

4) スーパーハイリスク腫瘍に対する新規治療薬開発のための分子基盤構築と臨床応用

腎芽腫に対する診断マーカー、治療標的の検索(研究分担: 大喜多)

小児腎腫瘍のホルマリン固定パラフィン切片を用いて、腎の発生に關与する転写因子である WT1 (Leica, WT49)を用いて免疫組織化学染色を行い、腫瘍特異性を検討した。WT1

は腎芽腫のマーカーとしては、やや感度が低く、必ずしも特異度が高くないものの、腎芽腫の診断マーカーとなることが示唆された。感度が低い要因としては、*WT1* 遺伝子変異を持つ腫瘍が含まれる可能性が考えられた。

横紋筋肉腫に対する予後予測因子、治療標的の探索（研究分担：北條）

平成 25～27 年度分担研究では JRSO（日本横紋筋肉腫研究グループ）登録例から組織型、骨格筋系マーカー、HMGA2 発現、NOS-1 発現、PAX3/7-FKHR fusion gene の有無、予後解析結果が判明した症例を抽出した。さらに、myogenin, HMGA2, NOS-1 については半定量的、定量的な grading system を用い myogenin と HMGA2 の 2 者の発現パターン、あるいは NOS-1 を加えた 3 者の発現パターンから 3 つの IHC (immunohistochemistry) phenotype を区別し、PAX3/7-FKHR fusion gene の有無、予後との関連性を検討し PAX3/7-FKHR fusion gene(+) 腫瘍を感度 93%、特異度 92%で予測することが可能で、遺伝子解析の代替し得る有用な補助診断法と考えられた。

横紋筋肉腫の分子病態、治療標的の探索（研究分担：滝田）

横紋筋肉腫の分子病態の全体像を明らかにするために、横紋筋肉腫 60 例の臨床検体を用いて exome 解析、target deep sequencing、SNP アレイおよび網羅的メチル化解析を行った。その結果、DNA メチル化パターンにより RMS は 4 群に分類されることが見出された (Seki et al, Nat Commun 2015)。特記すべきことは、従来の予後因子では全く分類不能であった胎児型横紋筋肉腫の中に極めて予後不良なサブグループ (E2) が存在することが明らかとなった点である。

臨床試験の提案に向けた患者データの管理と解析（研究分担：瀧本）

本研究班では小児固形腫瘍に対する分子標的療法やワクチン療法など従来の抗がん剤を中心とした治療を超えた新規治療開発を目指している。これには多種の臨床試験の実施が必要となるが、データセンターのリソースを有効に活用してこれらを支援する体制を構築するために、データセンターでデータ管理を行う臨床試験に対して「要求される基準」と「それに応じた品質管理」の段階分けを行い、手順を整備した。これによって、現在計画中の臨床試験とは異なる要求基準の臨床試験のデータ管理にも対応できるものと考えられる。

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 47 件)

1. Mise N, Takami M, Suzuki A, Kamata T, Harada K, Hishiki T, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Ikeuchi T, Nakayama T, Yoshida H, Motohashi S. Antibody-dependent cellular cytotoxicity toward neuroblastoma enhanced by activated invariant natural killer T cells. *Cancer Sci.* 107:233-241, 2016 (査読あり) .
2. Takenouchi A, Saito K, Saito E, Saito T, Hishiki T, Matsunaga T, Isegawa N, Yoshida H, Ohnuma N, Shirasawa H. Oncolytic viral therapy for neuroblastoma cells with Sindbis virus AR339 strain. *Pediatr Surg Int.* 31:1151-1159, 2015 (査読あり) .
3. Hishiki T, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Hayashi H, Yoshida H. Radioguided localization of neuroblastomas in laparoscopic surgery using (123)I- radiolabeled metaiodobenzylguanidine. *Pediatr Blood Cancer.* 62:1297-1299, 2015 (査読あり) .

ほか 44 件

〔学会発表〕(計 87 件)

1. Mise N, Suzuki A, Hishiki T, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Yoshida H, Motohashi S. Investigation of ADCC enhancement by NKT cell toward neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Congress 2014 May 13 Cologne Germany.*
2. 三瀬 直子, 鈴木 茜, 菱木 知郎, 斎藤 武, 照井 慶太, 光永 哲也, 中田 光政, 吉田 英生, 本橋 新一郎. 神経芽腫細胞に対する NKT 細胞による ADCC 増強効果の検討. 第 51 回日本小児外科学会学術集会. 2014 年 5 月 8 日、大阪国際会議場、大阪
3. 三瀬 直子, 菱木 知郎, 斎藤 武, 照井 慶太, 光永 哲也, 中田 光政, 國井 直樹, 藤川 陽, 堀中 敦史, 鎌田 稔子, 蒔田 勇治, 内田 亮介, 伊原 史英, 吉田 英生, 本橋 新一郎. 神経芽腫細胞に対する NKT 細胞による ADCC 増強効果の検討. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013 年 11 月 29 日、ヒル

トン福岡シーホーク、博多、福岡

ほか 84 件

〔図書〕(計 6 件)

1. 木下義晶他 診断と治療社. 第 2 章 小児がん C.小児がんの検査と診断 1. 腫瘍マーカー 日本小児血液・がん学会編集. 2015 年 pp88-90
2. 田尻達郎, 文野誠久他 診断と治療社. 第 2 章小児がん D 小児がんにおける治療法〔外科治療〕 3 内臓固形腫瘍. 小児血液・腫瘍学 日本小児血液・がん学会編 2015 年 pp158-161
3. 木下義晶他 診断と治療社. 第 4 章 支持療法 1.がん救急 f.泌尿器 日本小児血液・がん学会編集. 2015 年 pp222-224

ほか 3 件

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

細井 創 (HOSOI, Hajime)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：20238744

(2)研究分担者

中川原 章 (NAKAGAWARA, Akira)

佐賀県医療センター好生館・理事長

研究者番号：50117181

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

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

北條 洋 (Hojo, Hiroshi)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90209213

瀧本 哲也 (TAKIMOTO, Tetsuya)

国立成育医療センター・研究所小児がん疫学臨床研究センター・室長

研究者番号：40393178

家原 知子 (IEHARA, Tomoko)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20285266

滝田 順子 (TAKITA, Junko)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00359621

木下 義晶 (KINOSHITA, Yoshiaki)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80345529

大喜多 肇 (OKITA, Hajime)

国立成育医療センター・小児血液・腫瘍研究部・室長

研究者番号：50317260

菱木 知郎 (HISHIKI, Tomoro)

千葉県こども病院・医長

研究者番号：00375776

土屋 邦彦 (TSUCHIYA, Kunihiko)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：90381938

宮地 充 (MIYACHI, Mitsuru)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40584983

(3)連携研究者

なし