

13 - 19 難治性小児固形腫瘍に対する新たな治療法の 臨床への導入に関する研究

主任研究者 筑波大学臨床医学系 金子道夫

研究成果の要旨

難治性小児悪性固形腫瘍の新たな治療法を求めて次のような成果を挙げた gemicitabine が神経芽腫に対し有効であることが基礎研究で示唆された。IL-2 と lymphotoxin を導入した遺伝子治療は抗腫瘍性が弱いこと、白血病発生の問題から中止された。レチノイン酸誘導体の新規ポリエン Falconenones による神経芽腫の分化・アポトーシス誘導の研究ではレチノイン酸とは異なるメカニズムで抗腫瘍効果を示すことが示され、新規治療薬として注目される。小児固形腫瘍で最も治療困難な malignant rhabdoid tumor に対し、ゲフィニチブの有用性を示唆する in vivo, in vitro の研究結果が得られた。神経芽腫や肝芽腫に特化した DNA チップの作製とそれを用いた新しい予後予測法の開発が進み、世界に先駆けて臨床導入された。一方、本研究班にて討議された神経芽腫の臨床試験体制の整備が進み、2005 年 4 月より進行神経芽腫の臨床試験が開始される。併行して日本神経芽腫スタディグループが発足し、将来第 1 相試験も行える体制が出来た。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
金子道夫	筑波大学臨床医学系 教授	難治性小児固形腫瘍の標準的治療法確立の研究
水田祥代	九州大学大学院医学研究院 教授	難治性小児固形腫瘍の新たな治療法開発に向けての予後因子-高感度解析の研究
杉本徹	京都府立医科大学 教授	難治性小児固形腫瘍の分子遺伝学的異常を標的とする治療法の開発
麦島秀雄	日本大学医学部 教授	ESFT のキメラ遺伝子の検出とその臨床応用に関する研究
林 富	東北大学医学部 教授	レチノイドによる神経芽腫のアポトーシス誘導に関する基礎的研究
大平美紀	千葉県立がんセンター 研究員	小児がんに特化した DNA チップの作製とそれを用いた難治性小児固形腫瘍の新しい予後予測法

総括研究報告

1 研究目的

前方視的なグルーパスタディによる集学的治療により小児悪性固形腫瘍の治療は大きく進歩した。幹細胞移植を含めた多剤大量の化学療法、安全でよりの確な手術、

術中照射や陽子線照射など洗練された照射の導入などがその主な要因である。しかし、進行神経芽腫、進行横紋筋肉腫、ユーイング肉腫などは我が国でも欧米でも依然予後不良である。これらの腫瘍は化学療法によく反応す

るものの、耐性を獲得した一部の腫瘍細胞が急速に再増殖し、最終的には腫瘍死に至る。集学的治療の3要素とされた化学療法、手術、放射線療法の進歩はほぼ限界に近く、新抗腫瘍剤に対して従来の研究体制を維持しつつも、全く新たな治療法の開発導入が必要不可欠である。臨床応用可能な新たな治療法としては、(1)血管増生抑制因子による治療 (2)レチノイン酸などによる分化誘導維持療法、(3)遺伝子治療も含めた腫瘍特異的免疫療法、(4)腫瘍のアポトーシス誘導の4つがあげられる。これらの基礎研究とその臨床応用を推進することは、一見遠回りのようだが予後不良の小児悪性固形腫瘍に対する治療成績を更に向上させる上で、必要不可欠であると考えられる。

2 研究成果

前年に引き続き班長研究協力者(千葉大学 松永正訓、三重大学 駒田美弘、帝京大学 飯沼久恵、東京大学医科学研究所 山下直秀)と共同で研究を進めた。

2-1. MYCN と共増幅をする DDX-1 の予後への影響解析

金子らは primary 神経芽腫 113 例について MYCN、DDX1 および NAG 遺伝子のコピー数と遺伝子発現レベルを詳細に調べ、予後・年齢との相関を検討した。MYCN 増幅例を診断時月齢で 2 群に分けて検討した結果、18 ヶ月未満では DDX1 や NAG の co-amplification とは無関係に、MYCN 高増幅(40 コピー-)症例の生存率が MYCN 低増幅(<40 コピー-)症例の生存率と比較して有意に高かった($p=0.039$)。一方、18 ヶ月以上の MYCN 増幅症例では、DDX1 高発現かつ NAG 低発現例の生存率が、DDX1 低発現あるいは NAG 高発現例の生存率より有意に高いことが分かった($p=0.021$)。

2-2. Gemcitabine を用いた神経芽腫に対する新しい化学療法の開発

駒田らは *in vitro*、*in vivo* の実験で神経芽腫細胞株が gemcitabine に高い感受性を示すことを明らかにした。神経芽腫細胞株 11 種における IC50 値(中央値)は cytarabine に比較し gemcitabine で 1/123 と有意に低かった($p<0.01$)。薬剤耐性の神経芽腫細胞株をヌードマウスに皮下移植した実験で gemcitabine による有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。以上の結果より gemcitabine は神経芽腫に対し治療効果が期待でき、今後の臨床応用の可能性があると考えられた。

2-3. ウイルスを用いた神経芽腫特異的治療法の開発

神経芽腫に対し RNA ウイルス(Reovirus, Sindbis virus)を用いた腫瘍融解ウイルス療法の有効性を検討す

るため、特に Sindbis virus のが腫瘍融解作用を詳細に調べた。線維芽細胞と 5 種類の神経芽腫細胞株では、Reovirus を感染させてもまったく変化はなかった。Sindbis virus を 2 種類の神経膠腫細胞株、5 種類の神経芽腫細胞株に感染させると MOI=0.01 で day3 には、ほぼ 100%の細胞が死滅し、神経芽腫で特にその効果が顕著だった。ウイルス感染後の細胞培養液を回収し、ウイルス力価を測定したところ、100 倍に上昇していた。Reovirus は ras 遺伝子が活性化した細胞内で特異的に増殖するとされている。神経芽腫では ras が活性化していないため、上記の結果は予測どおりであった。一方、Sindbis virus は、幼弱な神経細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。Sindbis virus は神経芽腫に対しては極めて強い腫瘍融解効果を示した。ウイルスの感染に際してアポトーシスが誘導され、感染後、ウイルスは細胞内で増殖することが証明された。

2-4. 神経芽腫に対する遺伝子治療

IL-2 と T 細胞を強力に誘導するケモカインであるリンフォタクトン(Lymphotoxin, Lptn)を遺伝子導入された細胞が、安全に投与されるかどうか、またそれが IL-2 の導入細胞による抗腫瘍効果を高めるかどうかを検討した。治療にエントリーした神経芽腫の患者胸水より得られた神経芽腫培養細胞が IL2 と Lptn を十分な産生することを認めた。しかし、その後米国で行われている神経芽腫に対する IL-2 と Lptn の第 1 相臨床研究で、IL-2+Lptn の遺伝子治療は IL-2 単独の遺伝子治療と比較してその効果が勝っていないことが明らかとなった。また、小児の遺伝子治療において白血病の発生が報告され、神経芽腫に対する遺伝子治療の安全性に懸念が生じ、その治療効果も優れているとは言えないので、現在本遺伝子治療は中断している。

2-5. 新規ポリエン Falconensones による神経芽腫の分化・アポトーシス誘導

Falconensones の分化誘導作用として、神経芽腫細胞株においても低濃度で分化誘導傾向を認めた。高濃度でアポトーシス誘導作用が優位であった点は RA とは異なり、4-HPR と類似していた。神経芽腫細胞株に対する細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用は、Falconensone A に比較して、その合成誘導体である Falconensone A-Br および Falconensone A-0X の方が強い傾向があった。NB-39-nu におけるアポトーシス誘導作用の検討では、アスコルビン酸によるアポトーシス誘導作用の抑制効果を認めなかったことから、Falconensones は ROS 産生によるアポトーシス誘導作用を持つ 4-HPR とは別のアポト

ーシス誘導経路を持つことが推測された。RA や 4-HPR とは違った機序での細胞増殖抑制作用が期待できる Falconensone A-Br は今後有用な神経芽腫治療薬となる可能性が示唆された。

2-6. Malignant Rhabdoid tumor に対するゲフィチニブの抗腫瘍効果

悪性横紋筋肉腫様腫瘍 (malignant rhabdoid tumor 以下 MRT) は、乳幼児に好発する非常に予後の悪い腫瘍で、特に 1 歳未満発症例の 4 年生存率は 9.7% と悲劇的であり、分子生物学的には INI1 遺伝子の異常が認められる。近年、EGFR チロシキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブは非小細胞性肺がんの治療に使用され第 1 相試験でその有効性が示された。杉本らは MRT 組織と細胞株での EGFR の発現と、*in vitro* と *in vivo* でのゲフィチニブの抗腫瘍効果を調べ、MRT の治療へのゲフィチニブの有用性を検討した。無血清下では、MRT 細胞株のリン酸化 EGFR は検出できないが、EGF を添加すると強くリン酸化された。1 μ M のゲフィチニブ添加により EGFR のリン酸化は抑制され、ゲフィチニブは MRT 細胞株に存在する EGFR のリン酸化を抑えることが確認された。

MRT 細胞株にゲフィチニブを 0.1~100 μ M で添加すると、48 時間後から濃度依存性に増殖が抑制された。また、MRT 細胞に 20 μ M のゲフィチニブを添加すると、細胞は小球形に変形して浮遊し、これがアポトーシス誘導であることを確認した。アポトーシス誘導には JNK 経路が関与すると考えられた。ヌードマウスを用いた *In vivo* 抗腫瘍効果実験では、有意にゲフィチニブ投与群で腫瘍の増大抑制効果を認めた。以上より、ゲフィチニブは MRT の患者の予後改善のために有用な分子標的治療薬となりうると考えられた。

7 小児がんにて特化した DNA チップの作製とそれを用いた新しい予後予測法の開発

従来の予後因子だけでは予測困難な神経芽腫について正確に予測できる新たな予後診断システムの構築が急務である。そこで中川原・大平らは、DNA チップを神経芽腫の予後予測に導入することを目的に、神経芽腫由来の遺伝子を搭載した独自の DNA チップを作製し、136 症例の神経芽腫について網羅的遺伝子発現解析を行った。また、神経芽腫由来独立遺伝子 5,340 個について、DNA チップの作製を行った。遺伝子の断片を Long-PCR 法により増幅し、インクジェット方式を用いてスライドガラス表面にスポットングした (CCC-NB5000-Chip) 神経芽腫チップを作成した。複数の神経芽腫の腫瘍組織より完全長 cDNA を豊富に含むオリゴキャッピング cDNA ライブラリーを

作製して、3,700 個の遺伝子に対する特異的なプライマーを合成し、典型的な予後良好群および不良群のサブセット各 16 症例ずつを用いた半定量 PCR によるスクリーニングを行い、異なるサブセット間で発現に差の見られる遺伝子を 438 種類同定した。

患者予後と強く関連する遺伝子の同定

予後との相関の高い順に様々な個数の遺伝子を使用して、予後を予測する分類器をコンピュータでシミュレート (マシン学習) した結果、遺伝子を相関の高い順に 70 個選択した際に、最も高い予測能が得られることが判明、予後を予測すると正解率は約 90% であった。以上の結果から、神経芽腫にて特化したチップシステムを用いることにより、神経芽腫の予後と強く関連する遺伝子を大量に同定することが出来た。これらの遺伝子発現を組み合わせた患者予後の分類器の構築は、それに基づいた適切な治療法の選択に大いに貢献できると期待される。

2-7. ユーイング肉腫のキメラ遺伝子解析

ES は組織学的特徴が他の腫瘍と共通するが、最近では融合遺伝子の存在を利用して臨床検体から mRNA を抽出し、その転座部位を RT-PCR 法を用いて検索することによって、診断を確定する。この解析法は腫瘍細胞の骨髄転移の検索、治療中や治療後の微小残存病変の評価にも有効であると考えられている。シーケンス解析を行えば、各遺伝子の exon の種類まで判定できる。6 例の ESFT 検体を含む 29 例の臨床検体で検索を行った結果、5 例の ESFT で融合遺伝子が検出され、ESFT 以外の腫瘍からは EWS-ETS 融合遺伝子は検出されなかった。検体量不十分の 1 例を除きシーケンス解析が可能であった。複数の融合遺伝子が検出された例があり、その原因として、原発腫瘍にその融合遺伝子が存在していたか、その後の治療で誘導されたと考えられるが、いずれの融合遺伝子も予後不良症例に認められる融合遺伝子であった。本法は SRCT に属する神経芽腫、横紋筋肉腫、悪性リンパ腫の鑑別診断に有用で、さらに、exon の type を確定することによって、予後の予知も可能であると考えられた。

2-8. 進行神経芽腫の臨床研究：臨床試験にむけて

[これまでの進行神経芽腫治療の総括] 進行神経芽腫の治療は厚生労働省がん研究助成金による研究班が中心となって全国的なグループスタディが行われ、現在は 98 プロトコールによる治療で、年に 2 回集計報告がなされている。現在のプロトコールでは 6 コースの初期治療 98A3 の間に腫瘍切除が行われる。さらに 0 - 4 コースの

地固め療法の後、多くの患者では high MEC を中心とした preconditioning の後に幹細胞移植が行われる。初期治療と手術で 68% の患者が完全緩解に入り 総計 88% が一旦は部分緩解ないし完全緩解となる。この初期治療は有効性が高いが、問題点として 1) 副作用が非常に強いこと 2) プロトコルの改変が多いこと、3) TBI を含めて幹細胞移植の前処置がまちまちなことなどがあげられる。

2004 年 9 月の集計では 50 施設 202 例が登録され、解析可能な適格例は 184 例であった。現在まで 61 例が死亡し、腫瘍死は 37 例であった。患者の 85% 以上を占める病期 4 では 2 年 progression free survival が 69% であった。この治療法の導入により予後不良といわれた N-myc 増幅例の治療成績が向上し、N-myc 50 コピー以上増幅の症例では 3 年生存率が 60% を越え、欧米の治療成績を遙かに凌駕している。

[進行神経芽腫の臨床試験に向けて] 厚生労働省の「厚生労働省科学研究費がん臨床」にて進行神経芽腫の臨床研究が開始される。98 プロトコルまでの治療成績を基盤に厳密な臨床試験を行うことになった。転移巣の完全なコントロールを目指して、はじめに初期治療から幹細胞移植まで治療間隔を厳守して施行し、局所療法、すなわち手術と放射線治療は、幹細胞移植を伴う大量療法の後に行う治療方式の評価を行うこととした。局所療法は施設間で術式、手術時期、術後の化学療法再開の時期などのばらつきが多かった。そのため、治療の均質性を保つことが困難であった。今後は局所治療を治療の最後にもってくることにより、局所療法の意義がより明らかに評価できるとともに、摘出腫瘍の状態と再発の関連をきわめて明瞭に示すことが可能である。手術・放射線治療にも厳密な quality control を行い、均質化に向けて合意が得られた。成育医療センター内に神経芽腫登録センターを設置し、厚生労働省科学研究費の牧本班データセンターにてデータ管理を行い、05 プロトコルによる臨床試験が 2005 年 4 月にもキックオフ可能となった。それに引き続き、全く同じ初期治療で、局所治療を超大量化学療法の前に行う臨床試験を 2005 年に併走させる。

[今後の研究の方向性] この 1 年間神経芽腫全体を包括した研究組織 Japan Neuroblastoma Study Group (JNBSG) 結成に向けて活発に活動し、2005 年 4 月に発足する運びになった。神経芽腫をリスク別に分類して各々にスタディを組み、臨床試験を行い、基礎研究とリンクした質の高い臨床研究を行うものである。恒常的にかつ妥当なパイロット研究、第 1 相研究を行い、そこから新規治療法

の開発を国内外に発信する組織がようやく完成する。さらに他の小児固形腫瘍の研究グループと合同して、Japan Children's Oncology Group の結成を目指すこととなる。

3 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、神経芽腫・横紋筋肉腫グループスタディですでに臨床治療研究の意義を説明し、それへの参加および正常組織、腫瘍組織検体の利用、保存の informed consent を、様式を統一化して施行している。これらの個人情報のごく少数の情報管理者により匿名化して管理されている。また、phase study, randomized study の手法は今や国際的にも国内的にも必須であるが、この意義についてもこれまでのような施設による個別のものではなく、統一化された informed consent を得る体制を確立した。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Kubota M, Kaneko M et al. Effect of postoperative chemotherapy on the serum alpha-fetoprotein level in hepatoblastoma. *J Pediatr Surg* 39:1775-1778, 2005
2. Hiyama E, Kaneko M, et al High expression of telomerase is an independent prognostic indicator or poor outcome in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 91:972-9, 2004
3. Yamada S, Kaneko M., et al. Expression profiling and differential screening between hepatoblastoma and normal infant's liver: Identification of preferential expression of PLK1 oncogene in hepatoblastoma. *Oncogene*. 23:5901-11, 2004
4. Isobe, K., Kaneko M., et al. Expression of the human telomerase reverse transcriptase in pheochromocytoma and neuroblastoma tissue. *Endocrine Journal* 51(1):47-52, 2004
5. Isobe K, Kaneko M, et al. Expression of mRNAs for PACAP and its receptor in human neuroblastoma and their relationship to catecholamine synthesis. *Regulatory Peptides* 123:29-32, 2004
6. S Tanaka, Suita S et al Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 39: 63-68, 2004
7. S Suita, T Tajiri, et al Improved survival outcome

- for hepatoblastoma based on an optimal chemotherapeutic regimen. -A report from the study group for pediatric solid malignant tumors in the Kyushu area, Japan. *J Pediatr Surg* 39:195-198, 2004
8. T Tajiri, S Suita et al Biological diagnosis for neuroblastoma using the combination of highly sensitive analysis of prognostic factors *J Pediatr Surg* (in press)
 9. Kuwahara Y, Sugimoto T. et al. Antitumor activity of gefitinib in malignant rhabdoid tumor cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 10:5940-5948, 2004
 10. Oson S, Sugimoto T. et al. Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells. *Int J Cancer*, 112:219-224, 2004
 11. Misawa A, Sugimoto T. Translocation (1;22)(p36;q11.2) with concurrent del(22)(q11.2) resulted in homozygous deletion of SNF5/INI1 in a newly established cell line derived from extrarenal rhabdoid tumor. *J Hum Genet*, 49:586-589, 2004
 12. Saito-Ohara F, Sugimoto T, PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res* 63:1876-1883, 2003
 13. Yoshino N, Mugishima H: Diagnostic significance and clinical applications of chimeric genes in Ewing's Sarcoma *Biol Pharm. Bull.* 26(5):585-588, 2003
 14. Nagata N., Mugishima H et al: Profiling of genes differentially expressed between fetal liver and postnatal liver using high-density oligonucleotide DNA array *International Journal of Molecular Medicine* 11: 713-721, 2003
 15. Ikeda Y, Mugishima H et al.: Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene. *Hypertens Res* 27(2): 119-128, 2004
 16. Yamada S., Nakagwara A et al. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: identification of high expression of the PLK1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene.* 23:5901-5911, 2004
 17. Sato,A., Nakagwara A et al. Alteration in the cellular response to retinoic acid of a human acute promyelocytic leukemia cell line, UF-1, carrying a patient-derived mutant PML-RARalpha chimeric gene. *Leuk Res.* 28: 959-967, 2004
 18. Lu L., Nakagwara A et al. Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced cloneB in human adrenal cortex and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:4113-4118, 2004
 19. Sato,A., Nakagwara A et al. Acute renal failure due to leukemic cell infiltration followed by relapse at multiple extramedullary sites in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 45: 825-828, 2004
 20. Hamano, S., Ohira, M et al. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int. J. Oncol.*, 24:1457-66, 2004
 21. Nakagawara, A., Ohira, M et al Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model. *Cancer Lett.*, 204:213-24, 2004
 22. Yamada, S., Ohira, M et al. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the PLK1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene*, 23:5901-11, 2004
 23. Kato, C., Ohira, M et al High expression of human tubulin tyrosine ligase and enhanced tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with neuronal differentiation in neuroblastomas with favorable prognosis. *Int. J. Cancer*, 112:365-75, 2004
 24. Abe, M., Ohira, M et al. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.*, 65:828-34, 2005
 27. Ohira, M. et al. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.*, In press, 2005

日本語論文

1. 金子道夫、他：神経芽腫の治療 小児科診療
67(4):583-589, 2004
2. 金子道夫、他：日本における進行神経芽腫の治療成績
小児外科 36: 11-15, 2004
3. 松永真紀、金子道夫、他：HiMEC を前処置とした自家
骨髄移植後に重度の Fanconi 症候群を発症し、片腎
萎縮を来した肝芽腫の 1 例 小児がん
41(4):850-853, 2004
4. 田中丈夫、金子道夫、他：神経芽腫進展リスク評価の
特異性と感度 - 臨床診断神経芽腫での検討 - 小
児外科 36: 71-75, 2004
5. 堀 哲夫、金子道夫、：胆道閉鎖症に肝細胞癌を合併
し生体肝移植後 5 年後に後腹膜リンパ節に再発を認
めた 1 例 小児がん 41(4):854-858, 2004
6. 田尻達郎、水田祥代、他：神経芽腫治療における外科
治療の役割 小児がん (印刷中), 2005
7. 東 真弓、水田祥代、他：神経芽腫難治例に対するイ
リノテカンの治療経験 小児がん (印刷中), 2005
8. 田中真司、水田祥代、他：神経芽腫における予後関
連遺伝子の高感度解析系の確立 小児がん (印刷中)
, 2005
9. 田中丈夫、杉本 徹. 生物学的指標によるマス・スク
リーニング発見神経芽腫の腫瘍進展リスクの評価, 小
児がん 41(1): 76-80, 2004
10. 細井 創、杉本 徹. 神経芽細胞腫マス・スクリー
ニングの成果と問題点、マス休止にあたり文献的考察、
日本がん検診・診断学会誌 11 68-73, 2004