

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。Endostatin の持続投与により抗腫瘍作用が高まることを見だし、gemcitabine 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 lymphotactin を導入した遺伝子治療は抗腫瘍性が弱いこと、白血病発生に対する安全性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 Falconensones 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。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。

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
中川原 章	*1千葉県立がんセンター 研究局長	小児がんの特化した DNA チップの作製とそれを用いた
大平美 紀	*2千葉県立がんセンター 研究員	難治性小児固形腫瘍の新しい予後予測法

*1：平成15年4月1日～平成16年3月31日

*2：平成16年4月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

前方視的なグループ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、一見遠回りのような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

2-1 血管増生抑制因子による治療法の開発

endostatin の間歇的投与による *in vivo* の実験では有効性が不十分であったため、浸透圧ポンプでの3日間連続投与を行った。その結果抗腫瘍効果が明らかに向上し、著効が得られた。rh-endostatin の持続投与期間は3日間であったが、効果は連続10日の間歇投与を遙かに凌駕し、抗 nestin 抗体、抗 factor-VIII 抗体による免疫染色でも血管系の変化が明瞭に示された。

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. ウィルスを用いた神経芽腫特異的治療法の開発

RNA ウィルス (Reovirus, Sindbisvirus) を用いた腫瘍融解ウイルス療法の有効性を、神経芽腫培養細胞を用い検討した。Sindbisvirus は、幼弱なマウスの脳に感染し、アポトーシスを引き起こすことが知られている。Reovirus ウィルス液では抗腫瘍効果が見られなかったのに対し、Sindbis virus ウィルス液では神経芽腫株細胞に非常に高い有効性を確認でき、さらに紫外線照射ウィルスでも一定以上のウィルス量があれば抗腫瘍効果があることが確認された。本法は人体に病原性を持たないが、体内で増殖したウィルスを用いているので従来の遺伝子治療と比べ有効性が高いと考えられた。神経芽腫株細胞をヌードマウスの両側腹部に移植し、腫瘍増大後に一方の腫瘍内のみ弱毒化 PV を投与し、抗腫瘍効果を調べた結果、投与側の腫瘍に加え非投与側の腫瘍も完全に消失し、血流により PV が遠隔腫瘍に伝播し抗腫瘍活性を持つことが確認された。弱毒化 PV は神経芽腫に対して強い抗腫瘍活性を持つことが明らかになり、進行神経芽腫の治療に有用であることが示唆された。ただし、弱毒化ウイルスによる運動神経麻痺が発症する可能性があり、抗腫瘍活性を有しつつ、正常組織への毒性を認めない安全な PV の開発が必要と考えられる

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リンフォタクチン (Lymphotoxin, Lptn) を遺伝子導入した細胞の安全性と、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。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、神経芽腫の遺伝子治療の安全性にも懸念が生じ、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 Falconenones (FN) による神経芽腫の分化・アポトーシス誘導

FN 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。高濃度では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、FN- A に比較して、その合成誘導体である FN A-Br および FN 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、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、FN 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 FN A-Br は有用な神経芽腫の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 (MRT) は、乳幼児に好発する非常に予後の悪い腫瘍である。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。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。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を認めた。以上より、ゲフィチニブが MRT 患者の有用な分子標的治療薬となりうると考えた。

2-7. 小児がんに特化した 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

中川原・大平らは、神経芽腫由来独立遺伝子 5,340 個について、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ニングした神経芽腫チップ (CCC-NB5000-Chip) を作成した。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相関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。

2-8. 進行神経芽腫の臨床研究：臨床試験にむけて

[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 プロトコルまでの進行神経芽腫の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。新しい治療方式では局所治療を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なるとともに、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。

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、これ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。