

17-13 小児横紋筋肉腫に対する中央病理診断及び遺伝子診断に基づく臨床試験の確立と新規治療開発に関する研究

主任研究者 慶應義塾大学 森川 康 英

研究成果の要旨

小児横紋筋肉腫の治療成績の向上を目指してリスク分類と中央病理診断、遺伝子診断にもとづいた臨床試験を開始した。17%に施設病理診断との違いがみられることと、胞巣型腫瘍におけるキメラ遺伝子の検出率はこれまでの報告よりも高かった。VACを中心とする低リスク群および中間リスク群においてはVODの発生が5例に達し、患者登録を中止してプロトコルの改訂をおこない効果安全性評価委員会の評価を受けてプロトコル治療を開始した。また、会陰部原発腫瘍を対象として後方視的研究が行われ、外科治療の標準化の必要性が示唆された。

胞巣型横紋筋肉腫細胞株の運動能を制御する主要なシグナル伝達路はRas-Raf-ERK1/2経路であり、特にERK2のリン酸化が重要な役割を担うことが示唆された。浸潤・転移を抑制するにはERK2リン酸化阻害薬が合理的な治療薬になる可能性が示唆された。また、*c-MET*の高発現と*p16^{INK4A}*および*p14^{ARF}*の低発現または発現欠失が認められたことからこれらの遺伝子は一部のRMSの発生や進展に関与する可能性が示唆された。プロテオーム解析では10タンパク質の発現プロファイルによって胎児型横紋筋肉腫と胞巣型横紋筋肉腫の判別が可能であることが示された。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題名
森川 康 英	慶應義塾大学医学部 教授	研究総括：中間リスク群に対する臨床試験/低侵襲外科治療
原 純 一	大阪市立総合医療センター 部長	高リスク群に対する臨床試験
細 井 創	京都府立医科大学 助教授	低リスク群に対する臨床試験/腫瘍の遺伝子および機能解析とその臨床応用
池田均	独協医科大学越谷病院 教授	標準的外科治療の確立
川 井 章	国立がんセンター中央病院 医長	横紋筋肉腫のプロテオーム解析およびその臨床応用
滝田 順子	東京大学医学部 助手	横紋筋肉腫に対する分子標的治療の開発
(班友)		
新小田雄一	九州がんセンター 医師	小児横紋筋肉腫の分子遺伝子学的診断に関する研究

研究報告

1 研究目的

横紋筋肉腫は小児悪性固形腫瘍の3.5%を占め、米国ではその5年生存率は70%を超えているが、わが国の治療成績は約20ポイント低く、改善が強く望まれている。このため主任研究者森川等により日本横紋筋肉腫研究グループ(JRSG)が組織され、小児固形腫瘍では唯一の臨床試験を2004年に開始することとなった。

本研究の目的は横紋筋肉腫を米国IRSGと同様にリスク群に分類し治療を行うとともに、その基礎となる病理診断に中央病理診断を採用することと、予後不良な胞巣型腫瘍に見られるPAX3, 7-FKHRキメラ遺伝子の検索を併用して各群における治療成績(3年無増悪生存割合)の検討を行うものである。本研究では治療成績全体のボトムアップとともに、低リスク群では薬剤投与期間と投与量の減量により有害事象の軽減を図ること、中間リスク群では米国において多発の報告が見られる肝VODの発生割合の軽減、高リスク群では強化化学療法と大量化学療法的安全性と有効性の検証を行う。同時に付随研究として腫瘍特異的な遺伝子変異を同定し、分子標的治療の開発を試みる。また、網羅的プロテーム解析を行うことにより新しい診断と分類法の確立を目指す。また、わが国における新しい外科治療開発のために登録症例のretrospective解析を行う。

分担研究課題

中間リスク群に対する臨床試験/低侵襲外科治療(森川康英)

横紋筋肉腫に対する分子標的治療の開発(滝田順子)

標準的外科治療の確立(池田均)

低リスク群に対する臨床試験/腫瘍の遺伝子および機能解析とその臨床応用(細井創)

高リスク群に対する臨床試験(原純一)

腫瘍のプロテオーム解析/患肢温存術式の臨床試験(川井章)

小児横紋筋肉腫の分子遺伝子学的診断に関する研究(新小田雄一)

2 研究方法

本年度の研究方法は以下のごとくである。

1) 臨床試験

① 患者登録とリスク分類

慶應義塾大学医学部内に研究事務局を設置し、参加施設の病理診断にもとづき横紋筋肉腫の診断が得られた

症例を一次登録する。患者情報にもとづき担当者(細井創)はリスク分類を行い、これに基づき参加施設は低リスク群プロトコル(A群、B群)、中間リスクプロトコル、高リスクプロトコルの4つのプロトコルのいずれかのプロトコルに二次登録を行う。

② 中央病理診断

中央病理診断用標本と新鮮凍結標本は中央病理診断施設(国立成育医療センター研究所:秦順一)に送付され、中央病理診断を受ける。新鮮凍結組織はRT-PCRによるPAX3, PAX7-FKHRキメラ遺伝子の検索に供される。

③ プロトコル治療

JRSGプロトコルにもとづく治療はそれぞれのリスク群に対応するデータセンターにおいて登録、追跡される。また、有害事象報告は各リスク群の主任研究者に報告され、必要に応じて研究事務局代表および効果安全性評価委員会において評価を受ける。データセンターは定期的にモニタリングを行い、年二回モニタリングレポートを参加施設に公開する。

2) これまでの治療成績の解析

横紋筋肉腫の24症例に対し、組織型、原発部位、IRS Group分類、診断時年齢、および、日本横紋筋肉腫研究グループ(JRSG)のリスク分類での予後の解析を後方視的に行った

3) 標準的外科治療の確立

平成17年度は安全な腫瘍コントロールと良好な機能的予後の両立の可能な外科的治療法に関しての後方視的研究を行なった。対象は会陰を含む肛門周囲原発横紋筋肉腫とした。

4) 基礎研究

①ヒトaRMS細胞株(Rh30, Rh28, RM2, Rh2)、ヒト胎児型RMS細胞株(RD, CT-11, MM-1, KHBm)、臨床検体(PAX3-FKHR陽性例4例、陰性例6例の腫瘍組織)を用い、RT-PCR法でCB-R1 mRNAの発現を検討した。CB-Rの内因性アゴニストanandamideと合成アゴニストWIN55,212-2を用い、細胞株での増殖能(細胞数、フローサイトメトリー)、運動能(migration assay)を検討した。

②RMS細胞株7株と新鮮腫瘍30例について、PCR-SSCP、直接塩基決定法を用いて、*c-MET*遺伝子の傍膜領域とtyrosine kinase domain(exon 14-21)の変異の検索を行った。またReal-time PCR解析により、RMS細胞株7株と新鮮腫瘍16例の*c-MET*、*p16^{INK4A}*および*p14^{ARF}*遺伝子の発

現を検討した。また*c-MET*の蛋白発現およびリン酸化の同定を細胞株につきウエスタンブロット法を用いて解析した。

③手術(生検)時採取された臨床凍結材料よりタンパク質(約500 μ g)を抽出、分離する。レーザースキャナーで各スポットを読み取り、画像解析ソフトによって各スポット濃度を数値化、標準化する。タンパク質の同定は、当該タンパク質をタンパク質分解酵素でペプチド化した後、質量分析計を用いて行なう。発現の定量性の確認はWestern blottingにより行なう。得られたタンパク質発現情報はサポートベクターマシンを用いた機械学習法、主成分分析、クラスター解析等のデータマイニングの手法を用いて解析する。

3 研究成果

本年度の成果は、以下のごとくである。

1) 臨床試験

平成18年3月までに施設の倫理審査により承認された施設7施設であった。これまでに55例の症例登録があり、それぞれリスクに分類されプロトコール治療が開始された。全体の17%の症例で施設病理診断と中央病理診断の異なる例が見られ、リスク分類の変更が必要となった。また、低リスクおよび中間リスク群に採用されたVAC療法により肝VODの発生が5例報告されたため、本臨床試験の新規登録を一時停止し、プロトコールの改訂を行い、さらに効果・安全性評価委員会の承認を得て平成17年10月より臨床試験を再開した。

高リスク群では多剤併用・大量化学療法+幹細胞移植が用いられているが、治療関連死はなく、Grade 4の非血液毒性が9件報告された。内訳は、疲労3件、放射線皮膚炎2件、アナフィラキシー1件、口内炎3件であり、このうち治療開始直後のエトポシドによるアナフィラキシーを生じた1例でプロトコール治療が中止されている。いずれのリスク群においても予定された症例集積には至っておらず、中間解析は行われていない。

2) 外科治療確立のための後方視的研究

会陰を含む肛門周囲原発横紋筋肉腫(20歳以下)の本邦報告例29例を解析した。年齢は3カ月から20歳(中央値、14歳)で、2歳と15歳をピークに二峰性の分布を示した。性別は男児(性)6例、女児(性)23例で、特に10歳以上では19例中17例(89%)が女児(性)であった。病期はgroup I、II、III、IVがそれぞれ3例(12%)、6例(23%)、8例(31%)、9例(35%) (不明3例)であり、stageは2、3、

4がそれぞれ2例(9%)、12例(52%)、9例(39%) (不明6例)であった。特に10歳以上の症例では10歳未満の症例よりもgroup、stageともに進行例が有意に多く(それぞれ $p=0.010$ 、 0.008)、前者ではgroup IIIまたはIVが17例中13例(76%) (不明を除く)、stage 3または4が15例中15例(100%) (同)であった。領域リンパ節転移は17例中13例(76%) (同)に認められ、13例全例で鼠径部リンパ節転移が陽性であった。また、遠隔転移または経過中の再発部位に乳腺あるいは乳房と記載された症例が3例に認められた。組織型は27例中18例(67%) (不明を除く)が胞巣型で、10歳以上では10歳未満より胞巣型が有意に多く($p=0.026$)、18例中15例(83%) (同)が胞巣型であった。以上29例のうち治療結果が記載されている症例は18例で、その2年生存率は40%、5年生存率は20%であった。以上の結果を米国のIntergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)の集計報告と比較した。同集計では会陰を含む肛門周囲原発横紋筋肉腫症例(20歳以下)の年齢分布は生後1カ月から19歳(中央値、6歳)であり、性差は認められていない。症状は本邦とIRSに差を認めなかった。IRS症例の進行度はgroup I、II、III、IVがそれぞれ11%、25%、41%、23%で、本邦の症例ではIRSに比しgroup IIIの頻度が少なく遠隔転移を有するgroup IVの頻度が多い傾向にあった。また10歳以上の症例で10歳未満の症例に比し進行例が多い点はIRSも同様であった。組織型に関しては67%が胞巣型で、特に10歳以上の症例で胞巣型が多い点はIRSと差を認めなかった。領域リンパ節転移に関しては本邦で高頻度であった。IRSの治療成績は全体の5年生存率が49%、group I、II、III、IVの5年生存率がそれぞれ100%、63%、43%、25%であり、本邦の治療成績よりも良好である。

3) 基礎研究

①#1. PAX3-FKHR陽性横紋筋肉腫細胞株3株中3株でCNR1 mRNA発現を確認した。PAX3-FKHR陰性RMS細胞株ではCNR1 mRNAの発現を認めなかった。PAX3-FKHR陽性腫瘍組織4例中4例でCNR1 mRNAの発現を確認した。横紋筋肉腫細胞株において、合成カンナビノイド(WIN55,212-2)、内因性カンナビノイド(Anandamide)は増殖促進効果を示さなかった。横紋筋肉腫細胞株においてWIN55,212-2はmigration誘導能を示さなかった。横紋筋肉腫細胞株においてカンナビノイドレセプター発現の有無にかかわらずWIN55,212-2: $1\sim 10\mu\text{M}$ 、Anandamide: $10\sim 50\mu\text{M}$ で著明な増殖抑制を示した。その機序にアポ

トーシスが示唆された。

#2. aRMS 細胞株 3 株全てで、mRNA 及び蛋白レベルで c-Met の高発現を確認した。eRMS 細胞株 3 株では低発現もしくは発現を認めなかった。HGF 刺激で aRMS, eRMS 両細胞株の細胞数の増加は認めなかった。また、Rh30, Rh28, RM2 の運動能は亢進したが、RD, CT-11, KHBm では変化がなかった。Rh30, Rh28, RM2 の運動能は、mTOR 阻害剤 Rapamycin では抑制されず、MEK1 阻害剤 PD98059 では部分的に、MEK1/2 阻害剤 U0126 で強く抑制された。HGF/c-Met は aRMS の運動能に関与し、その下流の主要なシグナル路は Ras-Raf-ERK1/2 経路で、特に ERK2 のリン酸化が重要な役割を担うことが示唆された。

②RMS細胞株7株と新鮮腫瘍30例ではc-METの変異は検出されなかったが、p16^{NK4A}のmissense変異(Gly67Ser)を新鮮腫瘍の一例で検出した。神経芽腫、Ewing肉腫、骨肉腫の細胞株、新鮮腫瘍ではc-METの変異は検出されなかった。Real-time PCR解析の結果、c-METは細胞株全株と新鮮腫瘍の75%で高発現が認められ、細胞株とstage III、IVの発現量はstage I、IIより高い傾向がみられた。胞巣型の発現も胎児型の発現より高い傾向がみられ、c-METの高発現は予後と相関していた(p=0.05)。p16^{NK4A}およびp14^{ARF}の低発現または発現消失は細胞株57.1%と新鮮腫瘍43.8%に認められたが、病期別、病理組織別、予後についての有意差は認められなかった。細胞株1株(24.3%)と新鮮腫瘍4例(25%)ではc-METの高発現とp16^{NK4A}およびp14^{ARF}の低発現または発現消失が検出された。RT-PCR解析でc-METの高発現が認められた細胞株の蛋白レベルの発現をウエスタンブロット法で確認したところ、蛋白レベルでも同様に高発現していることが判明した。またRT-PCRおよびウエスタンブロット法でc-METの高発現が確認された細胞株のリン酸化を検討したところ、強いリン酸が検出されたため、c-METの恒常的な活性化が推測された。本研究においてRMSでc-METの高発現とp16^{NK4A}およびp14^{ARF}の低発現または発現欠失が認められたことから、これらの遺伝子は一部のヒトRMSの発生や進展に関与する可能性が示唆された。更に、RMSの胞巣型や予後不良群でc-METの高発現が認められたことから、この遺伝子の活性化がRMSの悪性度に関与している可能性が示唆された。

③本年度は(I)タンパク質発現パターンの違いによって種々の組織型の軟部肉腫を正確に分類可能か、(II)横紋筋肉腫臨床検体において同様の解析が可能か、について基礎的検討を行なった。

軟部肉腫 80 例(Pleomorphic MFH 18, Synovial sarcoma 12, Leiomyosarcoma 10, Myxofibrosarcoma 10, Myxoid liposarcoma 10, GIST 9, Clear cell sarcoma 6, MPNST 5)よりタンパク質を抽出し、各腫瘍に特徴的なタンパク質の発現プロファイルを作成した。サポートベクターマシンを用いた機械学習法、主成分分析、クラスター解析などの統計学的手法を用いて、判別に必要なタンパク質の絞り込みを行なった結果、最終的に 67 タンパク質の発現パターンによって軟部肉腫の各組織型を正確に分類することが可能であった。

次いで横紋筋肉腫凍結臨床検体 19 例よりタンパク質を抽出し、同様の方法で解析を行なった。その結果、未だ preliminary な段階ではあるが、10 タンパク質の発現プロファイルによって胎児型横紋筋肉腫と胞巣型横紋筋肉腫の判別が可能であった。

4 倫理面への配慮

臨床試験における倫理面への配慮については、被験者に対して試験参加および腫瘍臨床検体保存について、同意説明文に基づいた説明のうえ、同意を得て行っている。また、症例登録は施設IRBの承認を得た施設のみから受け付けている。基礎研究については、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針(13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成15年厚生労働省告示第255号)に則って行われ、既に施設倫理委員会に研究の申請を行い、施設長の承認を取得して行われている。また、共同研究において、検体の提供を依頼する施設についても、施設に提出した研究計画書に基づいた申請を行い、各施設の設置する倫理委員会の承認を得て検体の収集が行われる。研究への参加についてのインフォームドコンセントの取得に際しては、プライバシーの保護や安全の確保を含め被験者の人権を最大限に尊重する。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Shimojima N, Nakaki T, Morikawa Y, et al. : Imatinib blocks spontaneous mechanical activities in the adult mouse small intestine: possible inhibition of c-Kit signaling. Pharmacology. 2005 May;74(2):95-9. Epub 2005 Feb 17.

2. Kanekiyo T, Hara J, Matsuda-Hashii Y, Fujisaki H, Tokimasa S, Sawada A, Kubota K, Shimono K, Imai K, Ozono K. Tacrolimus-related encephalopathy following allogeneic stem cell transplantation in children. *Int J Hematol.* 81:264-8, 2005.
3. Mayer DK, Parsons SK, Terrin N, Tighiouart H, Jeruss S, Nakagawa K, Iwata Y, Hara J, Saiki-Craighill S. School re-entry after a cancer diagnosis: physician attitudes about truth telling and information sharing. *Child Care Health Dev.* 31:355-63, 2005.
4. Chen YY, Takita J, Hiwatari M, Igarashi T, Hanada R, Kikuchi A, Hongo T, Taki T, Ogasawara M, Shimada A, Hayashi Y. Mutations of the *PTPN11* and *RAS* Genes in Rhabdomyosarcoma and Pediatric Hematological Malignancies. *Genes Chromosomes Cancer.* (in press)
5. Lee SY, Takita J, et al., Mutations of the Notch1 gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: analysis in adults and children. *Leukemia.* 19(10): 1841-1843, 2005 Oct.
6. Chen YY, Takita J, et al., Aberrations of the *CHK2* gene are rare in pediatric solid tumors. *Int J Mol Med.* 16(1): 85-91, 2005 Jul.
7. Kawaguchi H, Takita J, et al., In vitro drug resistance to imatinib and mutation of *ABL* gene in childhood Philadelphia chromosome-positive Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma.* 46(2): 273-276, 2005 Feb.
8. Okamura K, Yamamoto H, Ishimaru Y, Takayasu H, Otani Y, Yamagishi J, Nagashima K, Takahashi A, Kuwano H, Ikeda H. Clinical characteristics and surgical treatment of perianal and perineal rhabdomyosarcoma: Analysis of Japanese patients and comparison with IRSG reports. *Pediatr Surg Int* 22:129-134, 2006.
9. Kawai, A., et al., Alternating sequential chemotherapy with high-dose ifosfamide and doxorubicin / cyclophosphamide for adult non-small round cell soft tissue sarcomas. *J Orthop Sci,* 10: 258-263, 2005.
10. Sato, O., Kawai, A., et al., Expression of Epidermal Growth Factor Receptor, ERBB2 and KIT in Adult Soft Tissue Sarcomas. A Clinicopathologic Study of 281 Cases. *Cancer,* 103: 1881-1890, 2005.
11. Kawai, A., et al., Blood loss and transfusion associated with musculoskeletal tumor surgery. *J Surg Oncol,* 92: 52-58, 2005.
12. Sakuraba M., Kawai, A., et al., Pelvic Ring Reconstruction with the Double-Barreled Vascularized Fibular Free Flap. *Plast Reconstr Surg,* 116: 1340-1345. 2005.
13. Takahashi D, Nagatoshi Y, Saito Y, Inagaki J, Nagayama J, Shinkoda Y, Fujita K, Okamura J. Unrelated bone marrow transplantation using a reduced intensity-conditioning regimen in leukocyte adhesion deficiency. *Bone Marrow Transplant,* Epub ahead of print, 2006.
14. Nishi J, Kaji T, Tokuda K, Shinkoda Y, Okawa T, Noguchi H, Takamatsu H, Yoshinaga M. A case of adrenal and cephalhematoma abscesses caused by *Escherichia coli* after forceps delivery. *Pediatr Int,* 47:480-482, 2005.

日本語論文

1. 土田嘉昭, 森川康英, 秦順一, 細井創, 原純一, 太田茂, 池田均, 正木英一, 岸本誠司, 熊谷昌明, 川口智義: 横紋筋肉腫の集学的治療に関する研究 小児がん 42 巻 1号 Page11-17(2005.05)
2. 森川康英: 横紋筋肉腫 日本外科学会雑誌 106 巻 7号 Page431-436(2005.07)
3. 森川康英, 細井創, 大浜和憲: 小児横紋筋肉腫 小児がん 42 巻 2号 Page342-349(2005.10)
4. 池田均: 小児の癌: 小児の悪性固形腫瘍. 獨協医学雑誌 32:255-263, 2005.
5. 池田均, 山本英輝, 岡邨香織: 横紋筋肉腫の組織分類と病態. 小児外科(in press)
6. 原純一: 進行神経芽腫の治療成績と問題点 小児科 46:1961-9, 2005
7. 菊地顕, 細井創, 小田部修, 土屋邦彦, 杉本徹. 胞巣型横紋筋肉腫におけるカンナビノイドレセプター1発現の特異性とその意義. 日本小児がん学会雑誌 (0913-8706) 19巻5号 Page319 (2005.10).
4. 小田部修, 細井創, 桑原康通, 大曾根真也, 土屋邦彦, 冢原知子, 杉本徹. ヒト胞巣型横紋筋肉腫細胞の運動能における肝細胞増殖因子 (HGF) 受容体シグナル路の役割. 日本小児がん学会雑誌(0913-8706)19 巻 5号 Page319(2005.10)

9. 中山ロバート、川井章、乳癌長管骨骨転移に対する診断と治療、整形・災害外科 48: 295-301, 2005.

10. 川井章、整形外科疾患登録をよりよいものにするためには？骨・関節・靭帯 18: 283-291, 2005.

11. 川井章、患肢機能評価法、NEW MOOK整形外科 18:159-166, 2005.

12. 川井章、他、下肢悪性骨・軟部腫瘍切除後の歩行能力、関節外科 24(7): 21-27, 2005