

小児固形悪性腫瘍におけるトランスレーショナルリサーチ

田尻, 達郎
九州大学大学院医学研究院小児外科学分野

<https://doi.org/10.15017/14670>

出版情報：福岡醫學雜誌. 100 (3), pp.75-80, 2009-03-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

小児固形悪性腫瘍におけるトランスレーショナルリサーチ

九州大学大学院医学研究院 小児外科学分野

田 尻 達 郎

はじめに

小児固形悪性腫瘍は、神経芽腫をはじめとして症例毎にその腫瘍の悪性度が様々であることから、その治療にあたっては、まず腫瘍の生物学的悪性度を判定することは必要不可欠である。小児固形悪性腫瘍にとっては、このような悪性度解析がいわゆるトランスレーショナルリサーチと言われる研究の主役であると考えられるが、主に分子生物学的手法を使ったこのトランスレーショナルリサーチを実際に小児固形悪性腫瘍の治療を主に行う小児外科医、小児科医自身が携わることは、症例毎の高度なテーラーメイド型治療につながると思われる。本稿においては、当教室においてトランスレーショナルリサーチとして神経芽腫を中心とした悪性度を判定する予後因子解析を従来から行ってきたので、その内容を紹介し、また、最近、難治性小児固形悪性腫瘍に対する新規治療法の開発を目指して樹状細胞を用いた免疫遺伝子治療の開発を行っているのを併せて紹介する。

1. 神経芽腫予後関連遺伝子の数的変化の高感度解析

神経芽腫は神経堤由来の細胞が腫瘍化したもので副腎髄質、交感神経幹に多く発生する。神経芽腫の生物学的特性は多岐にわたり、予後と関連した臨床的あるいは分子生物学的因子の研究が盛んになされてきた。悪性度の程度に合わせた至適治療を行うため、分子生物学的手法を用いて予後と関連した遺伝学的異常を迅速かつ正確に同定することが重要である。

神経芽腫の臨床的予後因子としては、年齢（1才未満は予後良好）、臨床病期、原発部位（副腎原発は、その他の部位に比較して予後不良）、組織分類（Shimada 分類）などがあげられる。生物学的予後因子には、MYCN 遺伝子増幅、DNA ploidy, 1p LOH, 11q LOH, 17q gain などがあげられるが、その中でも最も強力な予後関連遺伝子として、その数的変化の測定が悪性度判定に必要不可欠であったものが MYCN 遺伝子の増幅である¹⁾。1991 年以降、日本の進行神経芽腫のスタディーグループでは MYCN 増幅の有無（MYCN 増幅が 10 コピー以上か否か）にもとづき、2つの化学療法のレジメが用いられてきた²⁾。そのため、MYCN 増幅の状況を迅速かつ正確に判定することが治療上求められる。その解析法は、従来、サザンブロット法による解析が一般的であり、10 コピーを境界として悪性度の判定を行っていた。これは腫瘍組織全体の解析法であり、腫瘍内の heterogeneity は評価できない。一方、FISH 法（fluorescence in situ hybridization）は個々の神経芽腫細胞の MYCN 増幅の状況を評価できるが定量性に欠く。また、定量的 PCR は、FISH 法のように個々の細胞における評価はできないが、組織全体における遺伝子数量の測定に関しては、サザンブロット法より簡便に短時間で施行可能で感度が高い手法と言われている³⁾。我々は、以前より FISH 法のように in situ で個々の細胞を検索できる手法を併用することにより、腫瘍組織内における MYCN 増幅細胞を高感度に把握することができることを報告してきたが⁴⁾、神経芽腫における定量的 PCR 法による MYCN 増幅解析の臨床的意義を確定させるために、さらに多数の神経芽腫検体において本法による解析を行い、サザンブロット法、及び FISH 法による解析結果と比較検討した。

その結果、サザンブロットにて MYCN が single copy であった 54 例中内 46 例は MYCN gene dosage (MYCN/p53) は 2.0 未満だった。2.0 以上を示したのは 8 例ですべて stage 3,4 症例、そのうち 3 例は腫

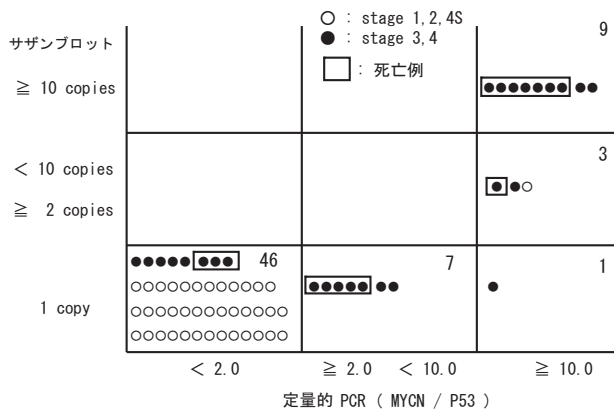


図1 サザンブロットと定量的PCRによるMYCN増幅判定の比較
神経芽腫66検体を用いた解析において、サザンブロットにてMYCNがsingle copyであった54例中46例はMYCN gene dosage (MYCN / p53)は2.0未満。2.0以上を示したのは8例ですべてstage 3,4症例、そのうち5例は腫瘍死。

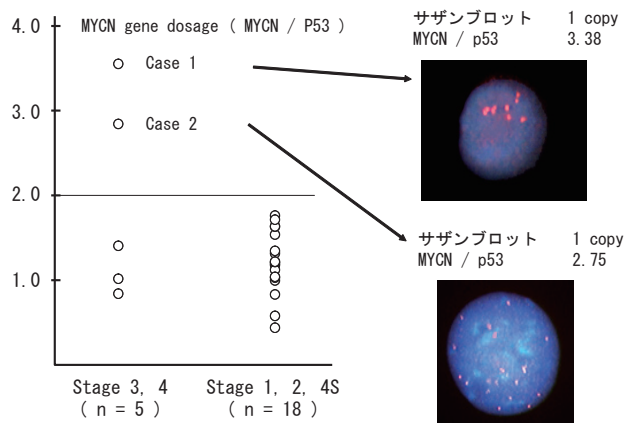


図2 MYCN 1 copy (サザンブロット) 23症例における定量的PCRとFISH法によるMYCN遺伝子増幅
stage 3,4症例の5例のうち2例が定量的PCRにて2.0コピー以上の値を示し、その2症例のみがFISH法にてMYCNが明らかに増幅した細胞が検体に存在。

瘍死している。また、サザンブロットでMYCNが2コピー以上の12例において定量的PCRでのMYCN gene dosageの値は全て10.0以上で、そのほとんどが、サザンブロットの値より高値を示した(図1)。サザンブロットにてsingle copyであった症例で、FISHを用いてMYCN増幅を検索できた23例のMYCN gene dosageをclinical stage別に見ると、非進行症例(stage 1,2,4S)は18例、進行症例(stage 3,4)は5例で、gene dosageが2.0以上を示したものは進行症例の2例のみで、その2例だけがFISHにてMYCN増幅細胞を検体中に認めた。Case 1は、検体中の有核細胞の15%、Case 2は29%にそれぞれMYCN増幅細胞を認め、腫瘍内のheterogeneityが疑われた(図2)。これらの結果から、MYCN増幅解析は、定量的PCRとFISH法の組み合わせが最も高感度であり、治療方針の選択に最も有用であると考えられた^{5)~7)}。現在、国際的にもこの組み合わせによる判定法が標準的とされている。

また、さらに最近の研究成果として、検体中にMYCN増幅細胞が部分的に存在する(腫瘍内heterogeneity)症例を検討するために、定量的PCRは微量なsampleからでも解析可能であるため、マイクロダイゼクション法を用いて顕微鏡下に腫瘍組織の多数の部分から腫瘍細胞を採取し、定量的PCRにて解析した。その結果、腫瘍組織全体から抽出したDNAによる定量的PCRにてMYCN遺伝子量の微量増加した症例の中に数か所のMYCN遺伝子量の増幅した細胞集塊とMYCN遺伝子量が正常の細胞集塊を認めるような症例も存在していた⁸⁾。今後、検体中にMYCN増幅細胞が部分的に存在するような症例に対して、どの程度の治療法を選択すべきかを検討するためにさらにマイクロダイゼクションによる解析数を増やす必要があると思われる。

2. 発現量変化による神経芽腫新規予後関連遺伝子の検討

発現量が神経芽腫の予後に関与する遺伝子としては、神経成長因子受容体ファミリーのTrkA (Tropomyosin-Related Kinase A) 遺伝子が最も知られているが、我々は新規予後関連遺伝子の検討として、c-MYC蛋白に結合してアポトーシスを誘導する蛋白として同定されていたBIN1 (Bridging integrator 1) 遺伝子の神経芽腫における役割に注目した。BIN1は神経組織において高発現しており、c-MYCのBIN1結合部位(MB1)は、MYCNと100%のホモロジーがあり、また、MYCNが増幅した神経芽腫細胞株において発現が低下していることがわかっていた。これらの背景から、神経芽腫においてBIN1蛋白はMYCN蛋白と協調してアポトーシスを誘導していると予想されたので、我々は、まず、神経芽腫56検体におけるBIN1遺伝子発現を定量的PCRにて解析した。その結果、BIN1遺伝子発現は、神経芽腫の既知の複数の予後良好因子群において有意に高発現であり(図3)、神経芽腫細胞株における強制発現の結果、MYCN蛋白と協調してアポトーシスを誘導することが明らかになった⁹⁾。

次に、我々は、マイクロアレイシステムを用いて新規予後関連遺伝子の検討を行った。既知の予後因子が全て予後良好である神経芽腫検体3検体と全て予後不良である神経芽腫検体3検体からそれぞれ、mRNAをプールし、cDNAマイクロアレイにて両群間の遺伝子発現差異を解析した。その結果、予後不良群に優位に発現している遺伝子群を約400抽出し、また、予後良好群に優位に発現している遺伝子を約40抽出した(表1)。その中で、胎生期の脳神経系に特異的に発現しているNeuronatin(Nnat)遺伝子に注目した。Nnatは1994年にはじめて哺乳動物の新生児の脳からクローンされた。哺乳動物種で高度に保存されており、発生途上の哺乳類の神経系で認められる。マウスを用いた研究にて、Nnatの発現はまず胎生8.5日に後脳に認められ、その後、中枢神経から末梢神経へと広がっていき、出生後に徐々に消失する。交感神経系、副腎にも、マウスの胎生15日目に認められている。この遺伝子は20番染色体長腕11.2-12に存在しており、3973鎖長である。3つのエキソンと2つのイントロンを含み、スプライシングバリエーションとして2つの発現型Nnat α , β がある。 α フォームは3つのすべてのエキソンを含み、 β フォームは α フォームの中央のエキソンを除く2つのエキソンを含む。神経発生におけるNnatの機能はまだ明らかではない。神経芽腫70検体にてその発現量を定量的PCRにて測定した結果、Nnat α , β のいずれのアイソフォームにおいても、BIN1遺伝子と同様に既知の複数の予後良好因子群において高発現であり、特にNnat β は、既知の予後良好因子群、全てにおいて有意に高発現であった(表2)。これらの結果から神経芽腫における新規予後関連遺伝子の可能性が示唆された¹⁰⁾。Neuronatin遺伝子の神経芽腫における機能は、まだ、不明であるが、神経芽腫細胞株(IMR32)において強制発現させると神経突起の延長が認められることから、神経芽腫の成熟・分化に関与していることが予想され、今後、その機能についてさらなる解析を行う予定である。

3. 神経芽腫予後関連遺伝子解析の組み合わせによる悪性度判定システム

FISH法と定量的PCRを用いた遺伝子数的解析(MYCN増幅)と、定量的RT-PCRを用いた遺伝子発現量解析(既知予後因子のTrkA, 新規予後因子のBIN1, Neuronatin β (Nnat β))を組み合わせること

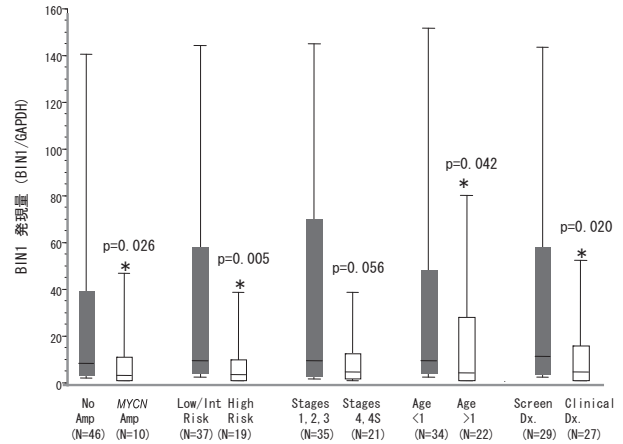


図3 BIN1発現量と予後因子の関係
神経芽腫56検体における定量的PCRによるBIN1遺伝子発現量と予後因子との相関解析において、それぞれ予後良好因子を持つ群において予後不良因子をもつ群に比較して高発現。
Low/Int Risk High Risk : COGリスク分類(年齢, stage, MYCN増幅, DNA ploidy, 組織分類によるリスク分類)

表1 予後良好神経芽腫群で優位な発現を示した遺伝子群

Gene	favorable/unfavorable
ral guanine nucleotide dissociation stimulator	3.75
neuronatin	2.97
ATPase, H + transporting, lysosomal	2.85
cyclin D1	2.61
tubulin, alpha, brain-specific	2.37
transcription factor AP-2 beta	2.37
secretary granule, neuroendocrine protein 1	2.35
growth associated protein 43	2.34
neural cell adhesion molecule 1	2.05

表2 70神経芽腫検体におけるNnat β 発現量と予後因子

分類	Nnat β /18s rRNA (%TILE 50%)	P value (Mann-Whitney U test)
年齢	1才未満	1.72
	1才以上	0.36
病期	stage 1,2,4S	1.11
	stage 3,4	0.36
DNA ploidy	aneuploid	0.96
	diploid	0.33
Shimada 分類	Favorable	1.79
	Unfavorable	0.14
MYCN 増幅	なし	1.01
	あり	0.06
転帰	生存	1.01
	死亡	0.37

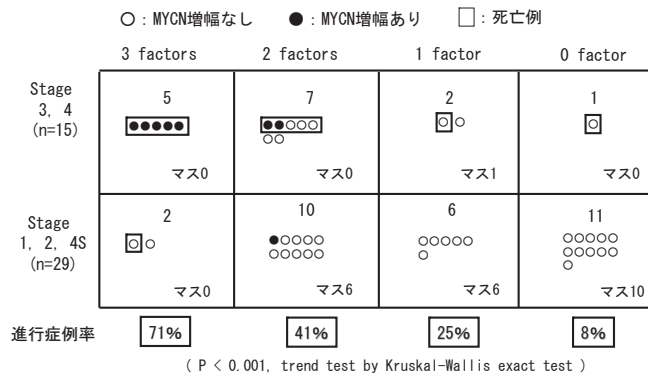


図4 3つの予後不良因子の保有数と臨床病期 (TrkA 低発現, BIN1 低発現, Nnat β 低発現)
予後不良因子を全く持たないグループは12例あり, 1例のみが, 進行症例, 1ファクターを有する症例は8例あり, 2例が進行症例, 2ファクターを有する17症例中7例が進行症例, 3ファクターを有する7例中5例が進行症例. これら4群における進行症例率は8%から71%に予後不良因子保有数の段階順に有意に増加 (P < 0.001, trend test by Kruskal-Wallis exact test).

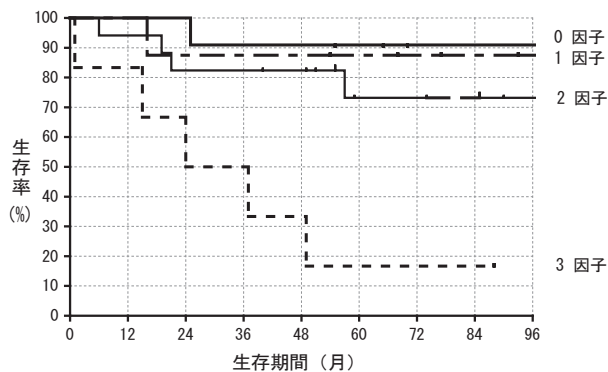


図5 3つの予後不良因子 (TrkA 低発現, BIN1 低発現, Nnat β 低発現) の保有数と生存率曲線

表3 4つの予後不良因子 (MYCN 増幅, TrkA 低発現, BIN1 低発現, Nnat β 低発現) の保有数と5年生存率

	4 factors	3 factors	2 factors	1 factor	0 factor
Risk 分類	Extremely High	Secondly High	Intermediate	Low 1	Low 0
5年 生存率	0%	40.1%	78.2%	88.3%	92.2%

(P < 0.001, trend test by Kruskal-Wallis exact test)

た (図7). SeV-IFN β /DC を用いた場合, 早期治療群では半数の個体で腫瘍の完全消失を認め, 後期治療群においても抗腫瘍効果の増強を認めた.

臨床試験に向かう前に腫瘍が十分, 生着, 増大した後期治療群におけるさらなる抗腫瘍効果を得るために SeV/DC 投与を行う3日前から, 3日間 (7, 8, 9日目), 4 Gy/day の X 線を腫瘍局所的に前照射を行う実験を行った (図8). その結果, コントロール, 放射線照射単独, SeV/DC 単独治療と比較して, 放射線照射と SeV/DC の併用療法において有意に腫瘍増殖を抑制することができ, 8頭中5頭において腫瘍が完全に消失した (図9)¹³⁾. いずれの実験においても, 抗腫瘍効果を認めたマウスにおいて腫瘍特異的な CTL の誘導を認めた. また, 腫瘍が完全消失したマウスに神経芽腫細胞を再接種したところ腫瘍の生着は拒絶されたことから, 本療法は, 長期メモリーを成立させることが示唆された.

による悪性度判定システムの確立を検討した. その結果, TrkA, BIN1, Nnat β 発現量の3因子の組み合わせと臨床病期及び転帰との解析の結果, 3不良因子は神経芽腫の悪性度と有意に相関していた (図4) (図5)¹¹⁾¹²⁾. さらにこの3因子に MYCN 増幅の高感度解析を加えた4因子の組み合わせ解析の結果, 不良因子を0-4個有する症例のそれぞれの5年生存率は, 92%, 88%, 78%, 40%, 0% (P < 0.001, trend test by Kruskal-Wallis exact test) であり, この分類にて神経芽腫悪性度に関して5群の層別化が可能であった (表3). このシステムにおける Extremely high risk 群 (4不良因子) には新規治療法の開発が望まれ, Secondly high risk 群 (3不良因子) には, 現行の強力な集学的治療法の適正な遂行, その他の群には, 治療合併症を極力避けた臨床プロトコルの確立と遂行が望ましいと考えられた.

4. 難治性小児固形悪性腫瘍に対する樹状細胞を用いた免疫遺伝子治療の開発

神経芽腫は, ガングリオシドの産生, ケモカインの産生抑制, MHC class 1 発現抑制などによって宿主免疫より逃れていると考えられる. 新規治療法の開発として我々は, 樹状細胞による免疫治療に注目し, センダイウイルスベクター (SeV) によって活性化された樹状細胞 (SeV/DC) を用いた免疫遺伝子治療を臨床応用することを目的としたマウスにおける前臨床試験を行っている.

A/J マウスにマウス神経芽細胞腫 C-1300 を106個皮下接種し, 生着後, 骨髄由来 DC を SeV にて活性化し治療に用いた (図6). 腫瘍生着後3日目より治療開始する群を早期治療群, 10日目より治療開始する群を後期治療群とし

さらに、大動物における安全性試験として、カニクイザルによる急性毒性試験においては、SeV/DCの毒性は低いものと判断され、活性化DCによると考えられる細網内皮系の活性化を示唆する所見を得た。今後、臨床応用を考えた際にさらにSeVの安全性が問題となってくるが、SeVは細胞質内において、遺伝子発現、蛋白合成を行うため宿主染色体への影響はなく、またヒトへの病原性は報告されていないため安全性は高いと考えられる。さらに九州大学消化器総合外科学において、重症虚血肢に対してFGF-2搭載SeVによる遺伝子治療が開始されており、その安全性が確認されている。

現在、外科療法に併用した臨床試験のプロトコルを作成中であり、今後、学内のIRB審査の承認後に厚生労働審議会に提出し、承認後の早期の臨床応用を予定している。

おわりに

小児がんは、最近の集学的治療の進歩により、飛躍的に治療成績が向上したが、今後は、もっと、患者毎の20年後のQOLを重視した治療が期待され、腫瘍毎の予後関連遺伝子発現やゲノム異常の詳細な解析による悪性度診断がさらに必要になってくる。また、難治性や再発した小児がんに対しては、免疫治療などの新規治療法の開発も必要である。今後も、このような小児悪性腫瘍に対するトランスレーショナルリサーチに積極的に取り組んでいくことが、小児がん全体のQOLを考慮した治療成績の向上につながる近道と考える。

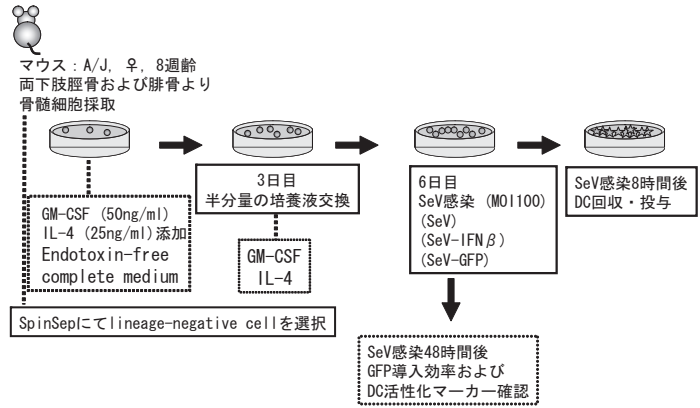


図6 SeV/DC療法の前臨床試験におけるマウス骨髄由来DCの採取方法 A/Jマウスの大腿骨および頸骨より骨髄細胞を採取し、negative selectionにて樹状細胞の前駆細胞を回収。GM-CSF、IL-4存在下に6日間培養した後、SeVをMOI100にて感染させ、8時間後に回収した樹状細胞を治療に使用。
SeV：組換えセンダイウイルスベクター
SeV-IFNβ：インターフェロンβを導入した組換えセンダイウイルスベクター
SeV-GFP：GFPを導入した組換えセンダイウイルスベクター

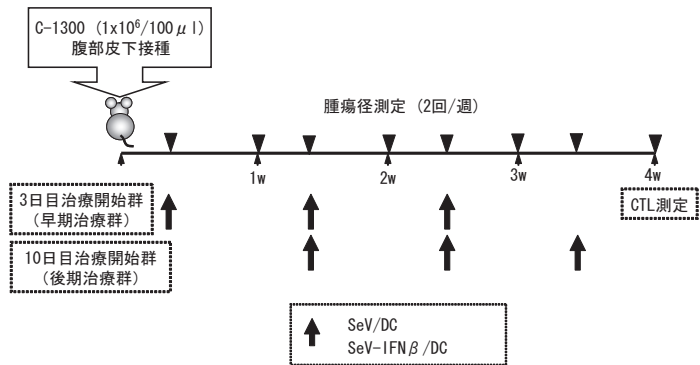


図7 SeV/DC療法の前臨床試験における治療プロトコル 1x10⁶個のc1300をマウスの腹壁皮下に接種。治療は1週間に1回の頻度で合計3回施行し、腫瘍接種後3日目より治療を開始する群を早期治療群、腫瘍接種後10日目より治療を開始する群を後期治療群とした。1回の治療に使用する樹状細胞の数は1x10⁶。
SeV/DC：組換えセンダイウイルスベクターを感染させた樹状細胞
SeV-IFNβ/DC：インターフェロンβを導入した組換えセンダイウイルスベクターを感染させた樹状細胞

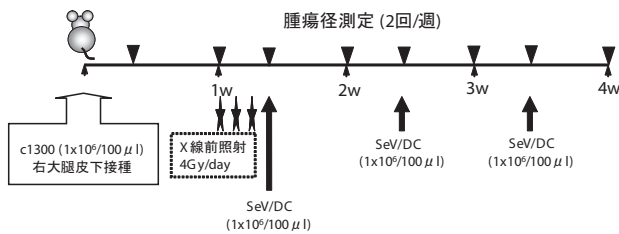


図8 SeV/DC療法の前臨床試験における放射線前照射併用治療プロトコル マウスの右大腿部の皮下にc1300を1x10⁶個接種し、1週間後より1日4G、3日間腫瘍局所に放射線を照射。その翌日よりセンダイウイルスベクターにて活性化した樹状細胞を1週間に1回、合計3回腫瘍内投与。

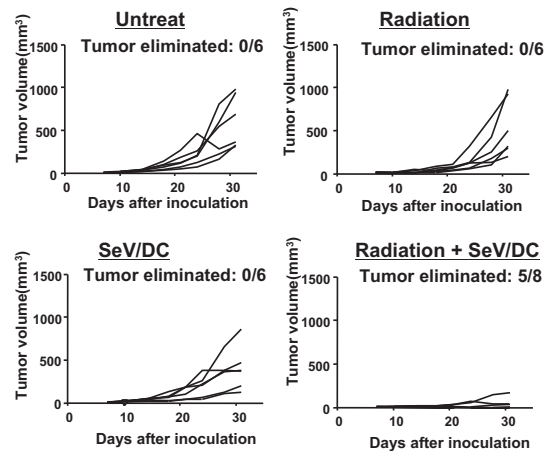


図9 放射線前照射併用SeV/DC療法による抗腫瘍効果 放射線を前照射することにより、後期治療群における8頭中5頭において腫瘍が完全に消失。

共同研究者

宗崎良太, 東 真弓, 田中 桜, 竜田恭介, 孝橋賢一, 木下義晶, 田中真司, 田口智章 (九州大学大学院小児外科), 米満吉和 (千葉大学大学院遺伝子治療学)

参 考 文 献

- 1) Brodeur GM, Seeger RC and Schwab M : Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage. *Science* 224 : 1121-1124, 1984.
- 2) Kaneko M, Nishihira H and Mugishima H : Stratification of treatment of stage 4 neuroblastoma patients based on N-myc amplification status. *Med Pediatr Oncol* 31 : 1-7, 1998.
- 3) Raggi CC, Bagnoni ML and Tonini GP : Real-time quantitative PCR for the measurement of MYCN amplification in human neuroblastoma with the TaqMan detection system. *Clin Chem* 45 : 1918-1924, 1999
- 4) Tajiri T, Shono K, Fujii Y, Noguchi S, Kinoshita Y, Tsuneyoshi M and Suita S : Highly sensitive analysis for N-myc amplification in neuroblastoma based on fluorescence in situ hybridization. *J Pediatr Surg* 34 : 1615-1619, 1999.
- 5) Tajiri T, Tanaka S, Shono K, Kinoshita Y, Fujii Y, Suita S, Ihara K and Hara T : Quick quantitative analysis of gene dosages associated with prognosis in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 166 : 89-94, 2001.
- 6) Tajiri T, Shono K, Tanaka S, Suita S: Evaluation of genetic heterogeneity in neuroblastoma. *Surgery* 131 : 283-287, 2002.
- 7) Tanaka S, Tajiri T, Noguchi S, Shono K, Ihara K, Hara T and Suita S : 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.
- 8) Souzaki R, Tajiri T, Higashi M, Kinoshita Y, Tanaka S, Kohashi K, Tsuneyoshi M and Taguchi T : Clinical implications of a slight increase in the gene dosage of MYCN in neuroblastoma determined using quantitative PCR. *Pediatr Surg Int* 24 : 1095-1100, 2008.
- 9) Tajiri T, Liu X, Tanaka S, Suita S and Hogarty DM : Expression of a MYCN-interacting isoform of the tumor suppressor BIN1 is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res* 9 : 3345-3355, 2003.
- 10) Higashi M, Tajiri T, Kinoshita Y, Tatsuta K, Souzaki R, Maehara Y, Suita S and Taguchi T : High expressions of neuronatin isoforms in favorable neuroblastoma. *J Pediatr Hematol/Oncol* 29 : 551-556, 2007.
- 11) Tajiri T, Tanaka S, Higashi M, Kinoshita Y, Takahashi Y, Tatsuta K and Suita S: Biological diagnosis for neuroblastoma using a highly sensitive analysis of prognostic factors. *J Pediatr Surg* 41 : 560-566, 2006.
- 12) Tajiri T, Higashi M, Souzaki R, Tatsuta K, Kinoshita Y and Taguchi T : Classification of neuroblastomas based on an analysis of the expression of genes related to the prognosis. *J Pediatr Surg* 42 : 2046-2049, 2007.
- 13) Tatsuta K, Tanaka S, Tajiri T, Shibata S, Komaru A, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, Suita S, Sueishi K, Taguchi T and Yonemitsu Y : Complete Elimination of Established Neuroblastoma by Synergistic Action of g-Irradiation and DCs Treated with rSeV expressing Interferon- β Gene. *Gene Ther* (in press), 2009.

プロフィール

田尻 達郎 (たじり たつろう)

九州大学准教授 (大学院医学研究院小児外科学専攻). 医博

◆**略歴** : 1963年長崎県に生る。1988年九州大学医学部卒業。1995年同大学院医学研究科博士課程修了。1998年九州大学大学院医学研究院助手。2001年米国フィラデルフィアこども病院研究員。2003年九州大学大学院医学研究院講師。2006年九州大学大学院医学研究院助教授。2007年より現職。

◆**研究テーマと抱負** : 分子生物学的手法を用いた小児固形悪性腫瘍の発生, 進展のメカニズムの解明, 及び, 新規治療法の開発。小児がんを中心とした小児外科患者さんに対する20年のQOLを重視したテーラーメイド型治療の推進, 実行を目指しています。

◆**趣味** : スポーツ鑑賞, 映画鑑賞