

する。種々の理由により、外科療法が施行できなかった場合には、大量化学療法および造血幹細胞救済療法終了後の血球回復後に、小児腫瘍医と放射線治療担当医との協議の上で時期を決定する。術中照射の場合は、外科療法中に施行する。

- (2) 脊髄神経などの圧迫症状を取るための緊急照射は許容される。これは、golden time (72時間以上完全脊髄障害があれば回復の望みがない) を超えずに緊急照射を開始することにより不可逆的变化を来たさずにすむという報告によるものである。その際には、症状の緩和があっても予定された照射線量を全量投与することになる。
- (3) 骨転移に対する症状緩和目的の照射は姑息的治療として許容されるが、この際の照射線量は適宜決定してよい。

7.6.6 ターゲット線量

- (1) 規準点 (prescription point) : PTV の規準点は体積の中心または中心近辺である。集光照射 (multi convergent beams) での規準点は通常、線束軸のアイソセンターの交差点である。
- (2) 線量定義 (Dose Definition) : 吸収線量は水-Gy (Gy-to-water) とする。
組織不均質性 : 密度補正は必要ないが、volume-based (三次元) 治療計画にて可能であれば補正を行うこと ; ただし肺減衰による補正はすべきである。
- (3) 原発部位ならびにリンパ節に対する規準線量と分割法

肉眼的残存腫瘍が認められない場合には総線量は術後外照射では 19.8 Gy、照射はすべて 1日1回 1.80 Gy で週5回行なう。

領域リンパ節転移 (N1) がある患者はすべて、化学療法の反応や遅延一期的手術あるいは二期的手術の結果に関係なく初診時に認められていた範囲に対して放射線治療を受けなければならない。

肉眼的残存腫瘍が認められる場合ではブーストとして体外照射で 10.8 Gy 追加照射を行う。この肉眼的残存の GTV は手術時のマーキングあるいは術後 CT で確認できるものとし、CTV は GTV+0.5cm とする。

- (4) 転移巣に対する規準線量と分割法

骨転移巣は放射線治療を必要とする。化学療法開始以前の I-123 MIBG シンチグラフィ、単純写真、骨シンチグラフィ (骨シンチは MIBG で陰性の場合に初診時に必須で行う検査である。MIBG で陽性であれば骨シンチは省略できる) で陽性を呈している部位で、寛解導入化学療法後 (超大量化学療法前) の再評価 MIBG シンチグラフィにて陽性所見が認められている骨転移部位に行う。寛解導入化学療法後の再評価 MIBG シンチグラフィで陽性所見の残存する骨髄転移は骨転移と同様に局所照射の対象とする。この骨転移・骨髄転移における GTV は MIBG 陽性部位とし、CTV および PTV は原発巣と同様の考えを採用するが、骨転移・骨髄転移の進展形式を勘案し、軟部組織への側方進展が無い場合は骨膜までを CTV とすること。MIBG シンチグラフィで初診時陰性であった骨転移部へは、他の検査で得られた初診時転移部を GTV とする。5箇所以上の多発骨転移に照射する場合において、骨髄機能に影響

響を与えると心配された場合には放射線治療委員会に相談すること。

骨転移部位に対する総線量は、1回 1.80 Gy、合計 19.8 Gy とする。

(5) 線量の均質性

2D 治療計画では PTV 内の線量差は、規準点の+7%から-5%の範囲とする。Volume-based 治療計画ではすべての PTV は DVH により評価され、95%の等線量面で囲まれ、規準点の 110%を越える線量を照射される体積は等線量面内体積の 10%未満とする。

(6) 術中照射

術中照射では総線量 10.0Gy とし、電子線エネルギーは放射線腫瘍医が手術所見を勘案し、腫瘍背側が 95%領域に入るように決定する。顕微鏡的残存腫瘍では電子線エネルギー4~6 MeV を用いる。肉眼的残存腫瘍の場合は、残存部位に対してのみブーストとして 5.0Gy 追加とし、総線量 15.0Gy を肉眼的残存部へ照射する。その際の電子線エネルギーは 4~12MeV の幅で残存腫瘍の予想厚に応じた適切なものを用い、また脊髄神経への影響を勘案する必要がある。

なお、照射野には腸管、尿管などが含まれないようにし、必要なら鉛板で遮蔽する。

転移リンパ節領域が照射野外となった場合は、7.6.4(7)を参照のこと。

7.6.7 中断、変更および中止

- (1) 放射線治療の中断、変更および中止が必要とされる場合（血球減少や感染、毒性などによって）は照射録に何故中断・変更が生じたのかを記載すること。
- (2) 血球減少による放射線治療の修正：放射線治療中の血球減少は多くの場合は化学療法に起因するものである。普通は血球減少により放射線治療を中断および変更する必要はない。血球数に問題がある場合には、放射線治療が完遂するまで、小児腫瘍医の判断を尊重すべきである。
- (3) 総治療期間 40 日間以上にわたる延長、放射線治療による毒性の出現時には放射線治療を中止すべきである。

7.6.8 治療技術

- (1) CT を用いた volume-based（三次元）治療計画がこの研究では推奨される。正常組織を遮蔽する技術は意図された PTV の実現には必要不可欠である。
- (2) 患者の体位：背臥位、仰臥位、側臥位で治療する。適切な鎮静や頭頸部腫瘍に対してはシエル作成し、体幹部・骨盤腫瘍に対しても体位を固定する道具を使用することが望ましい。
- (3) 照射野の作成：照射野は最低 5HVL 厚のブロックを用いて作成すること。またはマルチリーフコリメーターを使用すること。

7.6.9 正常組織の遮蔽

可能であれば常に正常組織を遮蔽することが重要である。既知の腫瘍床に対する治療が不足する可能性よりも、こうした正常組織の遮蔽に重きを置くべきである。

諸臓器の上限線量は表 7-1 に示すごとくである。この上限値は、化学療法と併用した場合に毒性が増強することを考慮していない。今回のように、より強い化学療法が採用される場合に

は、小児腫瘍医と耐容線量を検討するべきである。しかし、眼レンズ（水晶体）の耐容線量を越えて治療を行わねばならない時は、白内障が発症しても手術的処置が可能であることより、その旨を小児腫瘍医とともに患者本人あるいは家族にインフォームド・コンセントを取ってある場合には、この限りではない。

骨格系においてガイドラインに示された放射線線量は成長障害を来す線量であり、軟部組織においても線維化を来し患者の変形をもたらす線量であることを患者および家族に説明しておく必要がある。

表 7-1 正常組織の耐容線量

リスク臓器—最大線量（処方線量でなく線量分布計算による線量）：リスク臓器に対する線量上限および、volume-based（三次元）治療計画でDVH が必要な正常組織について記載する。

照射野	組織	通常照射による上限	DVH
頭部	脳	全脳 3歳未満 23.4Gy	不要
		全脳 3歳以上 30.6Gy	不要
	左右網膜		不要
	左右視神経	46.8Gy	不要
	視神経交叉	46.8Gy	不要
	下垂体		不要
	角膜	41.4Gy	不要
	眼レンズ	14.4Gy	不要
	涙腺	41.4Gy	不要
	蝸牛		不要
頸部	甲状腺		不要
胸部	肺	両肺 14.4Gy	必要
	心臓	全心臓 30.6Gy	不要
腹部	肝臓	全肝 23.4Gy	必要
	腎臓	両腎 14.4Gy	必要
	消化管	一部 45.0Gy	不要
	全腹—骨盤	30.0Gy（1.5Gy／回）	不要
骨盤	膀胱		不要
	直腸		不要
脊髄	脊髄	45.0Gy	不要

注：この耐容線量は、化学療法と併用した場合に毒性が増強することを考慮しておらず、大量化学療法併用

時は耐容線量はさらに低いことが予想される。従って両側腎、全肝臓、両側肺、全脳、脊髄、全心臓への照射はさらに 5.0 Gy 程度低い線量を上限とすることが望ましい。

7.6.10 線量計算と記載

- (1) volume-based 治療計画法を用いる場合、三次元治療計画規準が必要である。
- (2) 規準点:規準点に対して処方線量を投与するために必要なモニターユニットや照射時間は、二次元治療および三次元治療では「外部放射線治療における線量の評価と統一」(日本放射線腫瘍学会研究調査委員会編 1995 年 9 月)に準拠して計算される必要がある。
- (3) 線量の均一性:標的体積に対する最大・最小線量は計算され、二次元治療、原体治療では各施設で使用している照射録用紙を用いて報告する。これらは isodose diagrams から抽出されるか、計算されるか、DVH から導かれる。
- (4) 決定臓器 (Critical Organ): 表 1 に示された決定臓器への毎日の照射線量は、照射野に含まれるときは常に計算されるべきである。必要に応じて照射線量が委員会から要求されることがある。
- (5) 等線量分布:一門照射(電子線や光子)や線量比を変えない対向二門照射では等線量分布図は必要としない。その他の場合では計画標的体積の中心横断面の線量分布図を提示すること。規準点ならびに計画標的体積と決定臓器を表示すること。当線量値は明確に表示すること。遮蔽ブロックの効果も記載すること。不均質補正はしないこと。

Volume-based 治療計画の場合、PTV のアイソセンターの横断面、矢状断面、冠状断面の等線量分布が表示されていなければならない。矢状断面・冠状断面を表示出来ない場合は、横断面 5 枚でもかまわない(中心軸と 2 枚の上方面、2 枚の下方面)。これらの等線量分布には以下のものが含まれなければならない。

- ① 等線量分布図では、十分な数の当線量輪郭線が放射線治療ガイドラインにのっとり表示されていなければならない。
- ② これらの等線量は治療計画 CT 像または治療計画 MRI 像に重ねて表示すること。ただし、標的体積と重要正常臓器に関して線量分布を確認する上で十分な輪郭線が描ければ、グレースケール画像なしでプロットしてもかまわない。つまり、dose volume histogram のための情報を含むこと。

7.6.11 精度保証に関する記載

- (1) 放射線治療開始後 3 日以内に、以下のデータを準備し、委員会からの問い合わせに答えられるようにしなければならない。なお、不明な点に関しては問い合わせ先へ連絡して頂きたい。
- (2) 標的体積を決定するために使用したすべての診断材料と手術記録。初期(治療前)画像も必要である。
- (3) シミュレーションフィルムまたはそれぞれの照射野のデジタル再構成画像(DRR)
- (4) それぞれの照射野の確認写真(リニアックグラフィ)(体軸断でない照射野では不可能な

ことがある)

- (5) それぞれの標的体積における等線量分布図
- (6) 処方線量 (prescribed dose) を投与するためのモニター設定の計算を行った各施設で使用している照射録用紙
- (7) 線量分布が設定内であることを証明する等線量分布図。標的体積と規準点が明確に示されていること。
- (8) Volume-based 治療計画では以下のデータも加えて準備すること：処方線量の 10% を越える線量を受けた正常組織の全治療に対する Dose Volume Histogram (DVH)。どの DVH のデータが考慮されるかについては表 7-1 に列挙されている。

7.6.12 放射線治療終了後 2 週間以内に提出すべきデータ

〔「10.1 記録用紙の種類と提出期限」を参照のこと〕

- (1) 大きな照射の修正を行った場合を含む治療を行った位置決め写真や照射野写真(リニアックグラフィあるいはポータルイメージ)のコピー〔個人情報をマスクする事〕。
- (2) 放射線治療報告用紙
- (3) 必要な部位及び規準点における投与線量、毎日の線量、累積線量を含む患者の放射線治療記録(各施設で使用している照射録用紙)のコピー〔個人情報をマスクする事〕。

7.13 治療に関する相談

治療に関する疑問点がある場合には、以下の研究事務局に問い合わせること。

研究事務局

(プロトコル全般、寛解導入化学療法、大量化学療法・自家造血幹細胞採取)

七野浩之 (しちの ひろゆき)

日本大学医学部小児科

住所：〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1

電話：03-3972-8111 (8964 院内 PHS)

FAX：03-3957-6186

e-mail：shichino@palette.plala.or.jp

hshichno@med.nihon-u.ac.jp

外科療法研究事務局 (外科療法)

金子道夫 (かねこ みちお)

筑波大学臨床医学系小児外科

住所：〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

電話：029-853-3086

FAX : 029-853-3149

e-mail : mkaneko@md.tsukuba.ac.jp

放射線療法研究事務局（放射線療法）

正木 英一（まさき ひでかず）

国立成育医療センター放射線診療部

住所：〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1

電話：03-5494-7149

FAX : 03-5494-8269

e-mail : masaki-h@ncchd.go.jp

線量分布や物理学的疑問の問い合わせ先

國枝 悦夫（くにえだ えつお）

慶応義塾放射線科学教室

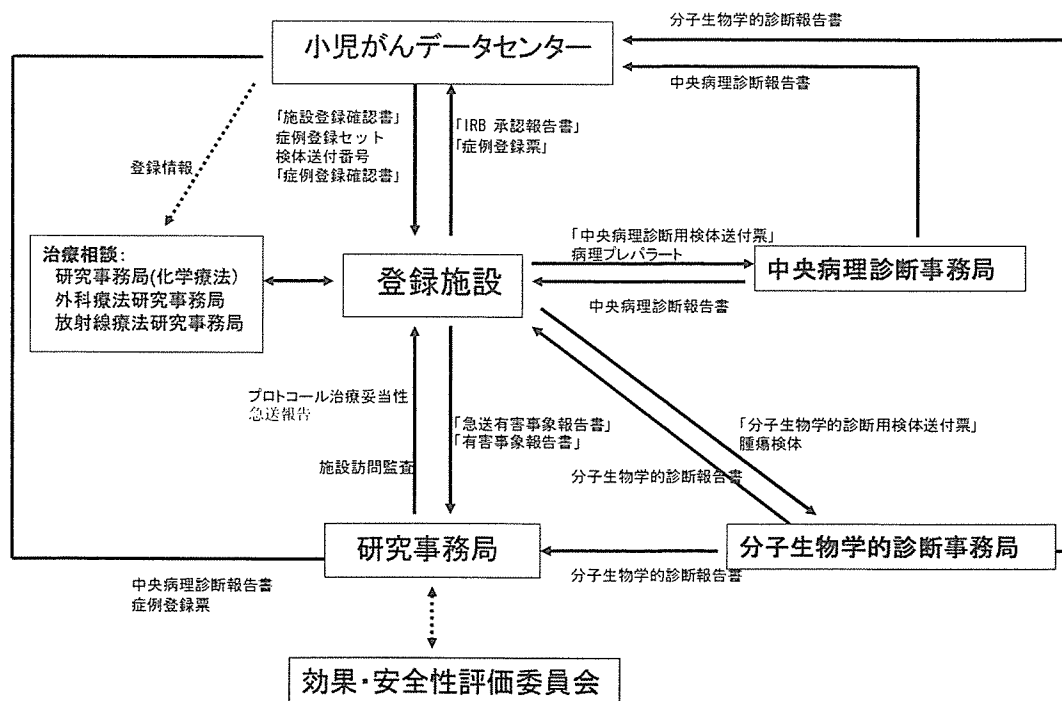
住所：〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

電話：03-3353-1211

FAX : 03-3359-7425

e-mail : kunieda@sc.itc.keio.ac.jp

早期第II相臨床試験 症例登録とデータの流れ



進行神経芽腫に対する標準的治療法の確立および新規治療法開発のための研究

進行神経芽腫に対するセンダイウィルスを用いた樹状細胞療法についての研究

分担研究者 田尻達郎 九州大学病院 小児外科助教授

研究要旨

小児固形悪性腫瘍は、集学的治療により、近年の治療成績は次第に向上しつつあるものの、進行症例の予後は未だ不良である。現在でも初診時に転移を有する進行神経芽腫の長期生存率は40%に満たない状況であり、新たな治療法が望まれている。我々は様々な固形悪性腫瘍に対して行われている樹状細胞療法に注目した。樹状細胞(DC)は強力な抗原提示能を持ち、抗原を捕捉し活性化した後にT細胞に抗原を提示、T細胞の増殖、分化を促すことにより、強い抗腫瘍効果を発揮する。しかし、小児を含めた、悪性腫瘍に対する樹状細胞療法のclinical responseは2.6%と十分な結果ではなかった。これには1) 樹状細胞(DC)の活性化が不十分、(2) 細胞障害性T細胞(CTL)の増殖・維持が不十分、(3) 腫瘍側の要因によりCTLなどに認識され難い、などが想定されている。神経芽腫はT細胞が認識するMHC class Iの発現が低く、また樹状細胞の移動に必要とされるケモカインやIL-12の産生抑制、ガングリオシドの産生などにより樹状細胞の機能が抑制されていることが報告されている。上記の問題点を打破するため、樹状細胞の機能を増強させる手段として樹状細胞への遺伝子導入が研究されている。しかしながら樹状細胞は一般に遺伝子導入に対して抵抗性であり、唯一高効率遺伝子導入が可能であるアデノウイルスベクターについては、ベクタータイターを上げるにつれてCTLの活性が抑制される現象が報告されており、明確に樹状細胞の機能強化を成し得るベクターは存在しなかった。このような状況の中、国産新規遺伝子治療ベクターであるセンダイウィルスベクター(SeV)はDCに高効率に感染し、高い遺伝子導入効率を示し、更にDCを強力に活性化することが報告された。今回我々はこのSeVを感染させたDCの神経芽腫に対する有効性について研究した。またSeVに導入する遺伝子として、MHC class I発現増強、DCの活性化作用があるとされるIFN- β を用いることとした。

研究協力者

竜田 恭介 九州大学病院小児外科講師

A. 研究目的

神経芽腫に対するIFN β によるMHC class Iの発現、細胞毒性の評価、tsSeV または tsSeV-IFN β によって活性化したDCを用いた免疫遺伝子療法の有効性、さらにはtsSeV/DCと放射線照射の併用療

法による有効性を検討する。

B. 研究方法

1) IFN- β による細胞毒性、MHC class I発現の増強についての検討

IFN- β を0- 1×10^4 U/mlの濃度で培養上清液に加えた状態で腫瘍細胞(マウス神経芽腫細胞株C1300、ヒト神経芽腫細胞株IMR32、SK-N-SH)を48時間培養し、Cell count kitにより細胞毒性を、

FACS analysisによりMHC class I 発現の評価を行う。

2) 皮下担癌マウスの作成

マウス神経芽腫細胞株(C1300:A/J マウス由来)を 1×10^7 /ml に調節し、100ul (1×10^6)を鼠径部近くの腹部に接種する。また放射線照射と DC 療法の併用療法では、右大腿部に腫瘍を接種した。

3) 樹状細胞の作成

A/J マウスの大腿骨、脛骨より採取した骨髓前駆細胞を IL-4 (12.5u/ml), GM-CSF (25u/ml) 存在下に 6 日間培養することにより immature DCs へと分化させる。

4) センダイウイルスベクター

SeV は治療として用いるために非伝播型である必要がある。このため細胞膜との融合とに必要な F 蛋白を欠失した ts-SeV または ts-SeV IFN β を用いた。

5) 樹状細胞の活性化

immature DC に、ts-SeV (MOI 100)、ts-SeVIFN β (MOI 100)、LPS で DC を培養し、活性化させた。感染効率をみるために SeV-GFP を DC に感染させ、GFP 陽性率を FACS analysis で測定した。また活性化の評価を樹状細胞の表面マーカーである CD40、CD80、CD86、MHC class II を FACS analysis にて評価した。

6) in-vivo における局所腫瘍に対する DC 療法有効性の検討

作成した DC を腫瘍接種日より 3, 10, 17 日目または 10, 17, 24 日目に 1×10^6 /100ul/head で腫瘍内及び周囲に接種し、それぞれのグループの腫瘍体積を測定し、腫瘍増殖抑制効果を判定した。(図 3)

7) 放射線照射と DC 療法との併用における局所腫瘍に対する有効性の検討

右大腿部に腫瘍接種後、7, 8, 9 日目に 4Gy/day の放射線を照射し、10, 17, 24 日目に 1×10^6 /100ul/head の DC を腫瘍及び周囲に接種した。それぞれのグループの腫瘍体積を測定し、腫瘍増殖抑制効果を判定した。(図 7)

C. 研究結果

1) IFN- β によるMHC class I 発現の増強、細胞毒性についての検討

IFN- β の濃度依存性に細胞毒性を認めた。(図 1) また MHC class I 発現もマウス及びヒト神経芽腫細胞株において IFN- β の濃度依存性に増強を認めた。(図 2)

2) 樹状細胞の活性化、感染効率

コントロール DC、LPS、SeV で活性化させた DC の表面マーカーを FACS analysis で評価した。SeV で活性化させた DC は LPS で活性化させた DC とほぼ同等の活性化を示した。また GFP の DC への導入率は 90%以上であった。(図 4)

3) in-vivo における局所腫瘍に対する DC 療法有効性の検討

マウス皮下に腫瘍を接種した後、3, 10, 17 日目、または 10, 17, 24 日目に DC を投与し、その腫瘍体積を計測した。どちらの結果においてもコントロールと比較し、SeV/DC では有意に腫瘍増殖抑制効果を認め、SeV-IFN β /DC では更に強い腫瘍増殖抑制効果を認めた。(図 5, 6)

4) 放射線照射と DC 療法との併用における局所腫瘍に対する有効性の検討

放射線照射単独ではコントロールとの有意差は認めなかった。Ts-SeV/DC 療法単独、併用療法の

群においてはコントロールと比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を示し、さらに併用療法の群では、ts-SeV/DC よりも有意な抑制効果を認めた。(図8)

D. 考察

SeV は DC に感染するだけで、強力な活性化を引き起こす。さらに IFN- β を搭載することにより、腫瘍細胞の MHC class1 発現を増強させ、T 細胞による腫瘍の認識が行われやすくなると考えられる。これらの機序により ts-SeV/DC、ts-SeV/DC が強い腫瘍増殖抑制効果を示したと考えられる。また放射線照射はそれのみでも細胞障害を認めるが、腫瘍の MHC class1 の発現を増強させることが近年報告された。放射線照射と DC 療法との組み合わせはこのため強力な腫瘍増殖抑制効果を認めることができたと考えられる。

E. 結論

SeV を用いた免疫遺伝子治療はマウスの神経芽腫モデルに対して有効であった。センダイウイルスは安全性の高いウイルスベクターであり、現在九州大学消化器・総合外科において重症虚血肢に対する FGF-2 搭載 SeV による臨床試験が行われている。我々もこれらの結果をもとに臨床へ応用することを考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

腫 Solid and pseudopapillary tumor の 3 例
小児がん 43(1):26-31, 2006

2. 学会発表

① 第 21 回日本小児がん学会

センダイウイルスにより活性化された樹状細胞による抗腫瘍免疫遺伝子治療の開発

竜田恭介、田尻達郎、田口智章、他

② 第 42 回小児外科学会

センダイウイルスにより活性化された樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫遺伝子治療の開発

竜田恭介、田尻達郎、田口智章

③ 第 22 回日本小児がん学会

小児腎細胞癌に対する樹状細胞による免疫治療の経験

竜田恭介、田尻達郎、田口智章、他

難治性小児固形悪性腫瘍に対する新規ベクターを用いた免疫遺伝子治療の開発

竜田恭介、田尻達郎、田口智章、他

④ 第 43 回小児外科学会

センダイウイルスにより活性化された樹状細胞による抗腫瘍免疫遺伝子治療の開発(続報)

竜田恭介、田尻達郎、田口智章、他

⑤ 第 106 回日本外科学会

センダイウイルスにより活性化された樹状細胞による抗腫瘍免疫治療の開発

竜田恭介、田尻達郎、田口智章、他

④ 第 65 回日本癌学会

小児腎細胞癌に対する樹状細胞による免疫治療の経験

竜田恭介、田尻達郎、田口智章、他

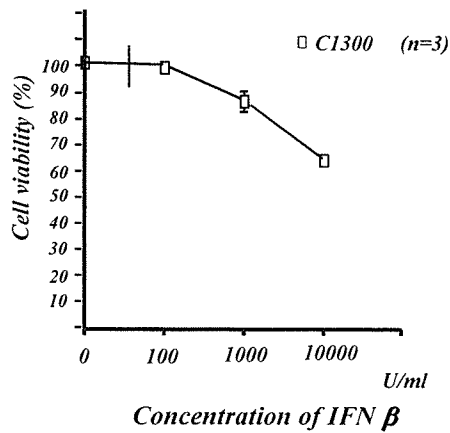
⑤ Advanced in neuroblastoma research 2006

Immunotherapy for neuroblastoma using dendritic cell stimulated by Sendai Virus Vector

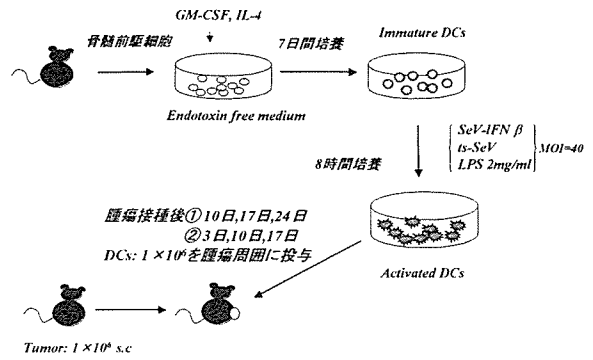
K Tatsuta, T Tajiri, T Taguchi

☒ 1

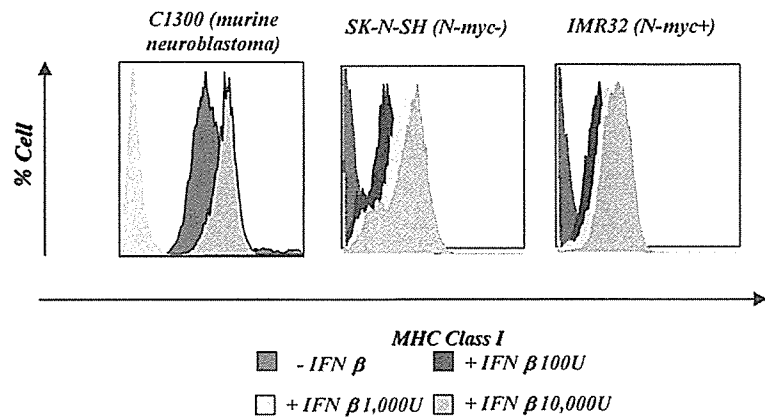
In vitroにおけるIFN β の細胞毒性試験



☒ 3



☒ 2



☒ 4

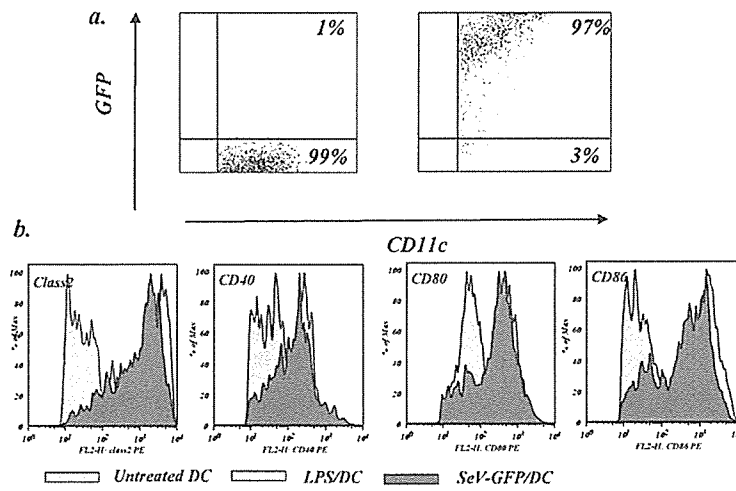


図 5

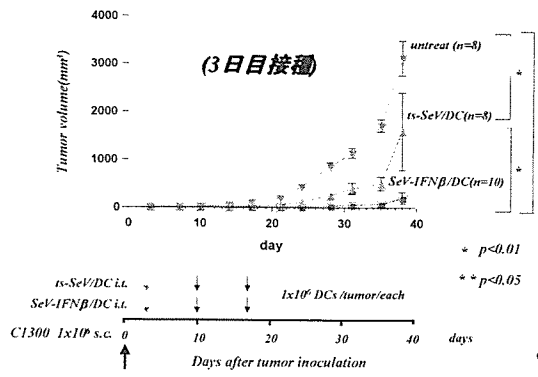


図 6

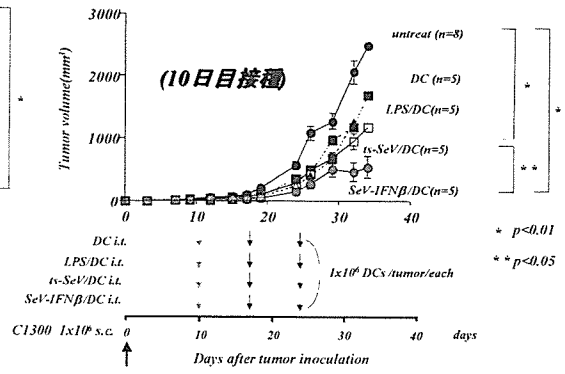


図 7

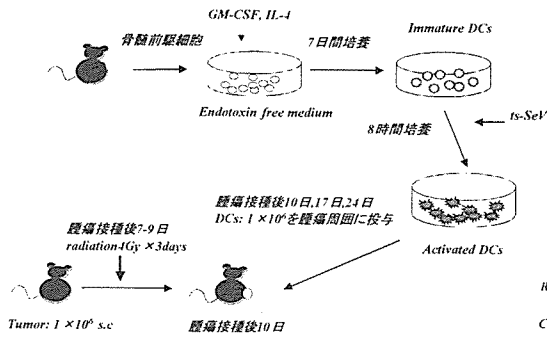
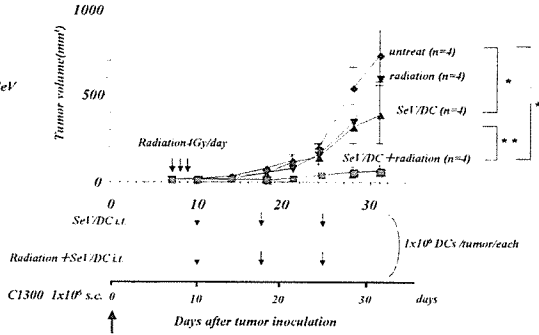


図 8



進行神経芽腫に対する標準的治療法の確立および新規治療法開発のための研究

分担研究 「リスク層別化と病態解明のためのトランスレーショナル研究」

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所長

研究要旨 近年、小児がんの治癒率は著しく向上したにもかかわらず、神経芽腫の約60%を占める進行神経芽腫の予後は未だ極めて不良である。この状況を打破するために、我々は平成16年度より遺伝子発現の異常を網羅的に解析することによって、マイクロアレイを用いた新しいリスク層別化システムを開発し、難治性神経芽腫の個別化医療の確立を目指すこととした。その結果、(1) 神経芽腫組織から抽出した5,300 cDNAを搭載したin-house cDNAマイクロアレイを用いて、136例の神経芽腫の遺伝子発現解析を行い、約90%の効率で予後を予測できる系を確立した。(2) その結果に基づき、トップランクの200 cDNAを搭載した神経芽腫予後予測用実用化ミニチップを作製した。(3) これまでに80例の神経芽腫を対象にミニチップ検査を行い、期待どおりの結果を得た。(4) 平成18年度に正式に発足した日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)が実働しだし、その検体センターとしての整備と新しい検査体制を確立した。これらの研究により、JNBSGの分子診断によるリスク層別化の具体的基盤が確立され、次世代トランスレーショナルへの展開を可能にした。

A. 研究目的

近年の治療法の進歩により小児悪性腫瘍の治癒率は著しく改善したが、小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度の高い神経芽腫は発見時に既に進行したものが多く、その治癒率は今なお約30%に止まっている。わが国で約20年間施行されてきた生後6ヶ月時のマスキングが休止となり、神経芽腫の約60%を占める進行例に対する治療戦略は益々緊急の課題となってきた。したがって、より適切な治療法を選択するための新しいリスク分類に基づく個別化医療が必要になっている。そこで、ポストゲノム時代に入って初めて可能となってきた網羅的なゲノムおよび遺伝子解析の手法を用いて、神経芽腫の新しいリスク分類を確立するために、我々が作製した神経芽腫cDNAライブラリーから5,300個のcDNAを抽出

し、それらを搭載したin-house cDNAマイクロアレイを用いて神経芽腫の遺伝子発現解析を行い、個々の神経芽腫患者の予後を予測できる実用的なカスタムアレイを開発することを目的とした。さらに、平成18年に新しく発足した日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)の遺伝子診断および中央検体センターとしての機能およびシステムの確立をも目的とした。

B. 研究方法

- 1) cDNAマイクロアレイの作製：異なるサブセットの神経芽腫組織よりoligo-capping cDNAライブラリーを作り、5,300個のcDNAを採取した。次に、これらを搭載したin-house cDNAマイクロアレイを作製した。
- 2) 神経芽腫予後予測用cDNAマイクロアレイ

(ミニチップ)のカスタム化と臨床評価系

DNA チップ解析に用いるサンプルとして凍結腫瘍組織から total RNA を調製し、アジレントバイオアナライザーによる RNA クオリティの確認を行った。ハイブリダイゼーションには、5-10ug のサンプルおよびコントロール（神経芽腫細胞株 4 種類の混合物）の total RNA を用い、それぞれ Cy3、Cy5 で標識したものを等量混合し用いた。上記の網羅的解析用マイクロアレイを基に、これまでに抽出した神経芽腫の予後に強く関わる遺伝子の上位 200 個を搭載した cDNA マイクロアレイ（ミニチップ）を作製し、大手臨床検査会社である（株）SRL へ全技術を移管し、カスタム化を行った。その結果、本検査は SRL での受託検査として行うことが可能になった。予後の予測は Posterior 値を基準とし、1.0 を極めて予後良好、0 を極めて予後不良とした。

3) JNBSG 検体センターおよび遺伝子診断センターとしてのシステム確立

インフォームドコンセント取得後に全国の JNBSG 登録施設および非登録施設から送られてくる神経芽腫検体（凍結組織、生組織、血液）を受け入れ、DNA ploidy (FACScan) および MYCN コピー数測定 (FISH 法、real-time PCR 法) のシステムを改良した。また、検体送付用の検体ボックスを新規に調整した。

<倫理面の配慮> 遺伝子発現解析に用いる神経芽腫サンプルは、全て組織供与施設においてインフォームドコンセントを得、匿名化された後に当研究室に供与されたものを用いた。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って行い、研究実施にあたっては、千葉県がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) 神経芽腫に特化した cDNA マイクロアレイを用いた予後予測の試み

136 例の神経芽腫を対象に、in-house cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、患者の予後と強く相関する遺伝子の抽出とそれを用いた予後予測アルゴリズムの構築を行った。その結果、遺伝子発現プロファイリングによるがんの層別化が可能となり、とくに、予後予測の困難な中間型神経芽腫の予後を高い確率で予測できるようになった。そこで、上位遺伝子 200 個を抽出し、それらを搭載した実用的なミニチップを作製し、その技術を（株）SRL に技術移管し、臨床評価を展開した。

2) 神経芽腫予後予測用カスタム化マイクロアレイを用いたリスク分類の試みとその臨床評価

全国統一の日本神経芽腫スタディグループ

(JNBSG) の遺伝子解析部門の充実を図り、将来の新しいリスク分類法を開発するため、我々が開発した神経芽腫予後予測用 DNA ミニチップを用いた臨床評価を展開した。その結果、（株）SRL でのミニチップ検査はすでに 80 例に達し、そのうちの最初から 39 例を対象に臨床評価を行った。病期 1, 2 の 8 例では Posterior 値が 0.5 以上を示した症例は 6 例であった。1 例は Posterior 値が 0.473 で中間の値を示し、残る 1 例は、マスキングで発見された症例であるが腫瘍は増大し、その Posterior 値は 0.341 であった。3 期の 12 例中 6 例は Posterior 値 0.8 以上、2 例は 0.635 と 0.616 で、これらはすべて MYCN single copy であった。残る 4 例は 0.35 以下であったが、うち 3 例は MYCN が増幅していた。4 期 11 例では、0.74 以上の値は 2 例しかなく、4 例は中間 (0.45-0.70) で、いずれも MYCN は single であった。また、5 例は 0.10 以下で、うち 4 例では MYCN 増幅が見られた。さらに、その約 6 割で自然

退縮が起こると言われている 4s 期腫瘍 8 例では、3 例が 0.70 以上値で自然退縮傾向の強いものであった。しかし、MYCN が増幅していた 2 例では 0.30 以下の値を示し、0.215 と 0.333 を示した 2 例は骨転移を起し死亡していた。したがって、個々の症例の長期フォローアップ調査が必要ではあるものの、標準的な病期別予後とほぼ一致する結果が得られた。

3) JNBSG 検体センターの確立および遺伝子診断システムの改良

JNBSG の正式な検体センターに指定されたことを受け、従来のシステムをさらに改良した。まず、検体の送付に伴うトラブルを無くすために、共通した冷凍用および冷蔵用検体ボックスを購入し、全国の施設に配布した。また、遺伝子診断は当面 DNA ploidy と MYCN コピー数測定としたが、後者については、迅速性と精度を上げるために、従来の Southern blot 法から FISH 法と real-time PCR の併用システムに切り替えた、さらに、結果報告をパスワードで開くオンラインシステムに変更した。

D. 考察

神経芽腫の個別化医療を目的とした DNA ミニチップの開発は、当初の予想を凌ぐ成果を挙げた。このチップに搭載されている遺伝子には、神経芽腫の予後を左右する重要遺伝子がほとんど含まれている。DNA チップによるがんの予後診断に関しては、論文として発表されているものは多いが、その実用化に至った例は極めて少ない。わが国においても、我々が開発した神経芽腫予後予測用 DNA ミニチップがカスタム化に成功した唯一のものである。JNBSG との連携し、すでに 80 例を対象にミニチップ検査を行ったが、臨床的評価を行った 39 例の解析結果では、極めて良好な結果が

得られた。今後さらに症例数を増やして臨床的評価を行って行く予定である。この予後予測系は、将来の新しい神経芽腫リスク分類の確立に極めて有用になるものと期待される。さらに、この解析を積み上げることにより、薬剤感受性あるいは薬剤耐性獲得に関連した遺伝子セットが抽出できる可能性が期待される。また、JNBSG の中央検体センターおよび遺伝子診断部門にあらためて指定され、診断システムの改良、検体ボックスの配布、オンライン報告の樹立など、画期的な整備を進めた。これらにより、国際的な標準化に耐え、国際的な連携の中で難治性神経芽腫の診断および治療法の開発へ向かってより一層強固な基盤が確立された。

E. 結論

独自に開発した in-house 神経芽腫予後予測用 DNA チップのカスタム化に成功し、その臨床評価を開始した。現時点では、良好な結果が得られている。また、JNBSG の検体センターおよび中央遺伝子診断部門としてシステム的大幅な改良を行い、わが国における神経芽腫中央遺伝子診断センターとしての基盤が確立された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene* 25:917-928, 2006
2. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months

- of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* 46:285-291, 2006
3. Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* 580:627-632, 2006
 4. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Mol. Cell. Biol.* 26:2758-2771, 2006
 5. Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCC1*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* 25:1931-1942, 2006
 6. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* 25:5046-5055, 2006.
 7. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 15:1281-1285, 2006
 8. Sang M, Li Y, Ozaki T, Ono S, Ando K, Yamamoto H, Koda T, Geng C, Nakagawara A. p73-dependent induction of 14-3-3 σ increases the chemo-sensitivity of drug-resistant human breast cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347:327-333, 2006
 9. Hayashi S, Ozaki T, Yoshida K, Hosoda M, Todo S, Akiyama S, Nakagawara A. p73 and MDM2 confer the resistance of epidermoid carcinoma to cisplatin by blocking p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347:60-66, 2006
 10. Abe M, Westermann F, Nakagawara A, Takato T, Schwab M, Ushijima T. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett.* (in press)
 11. Ozaki T, Li Y, Kikuchi H, Tomita T, Iwatsubo T, Nakagawara A. The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351:57-63, 2006
 12. Kikuchi H, Ozaki T, Furuya K, Hanamoto T, Nakanishi M, Yamamoto H, Yoshida K, Todo S, Nakagawara A. NF-kB regulates the stability and activity of p73 by inducing its proteolytic degradation through a ubiquitin-dependent proteasome pathway. *Oncogene* 25:7608-7617, 2006
 13. Okahara F, Itoh K, Nakagawara A, Murakami M, Kanaho Y, Maehara T. Critical role of PICT1, a tumor suppressor candidate, in phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate signals and tumorigenic transformation. *Mol. Biol. Cell* 17:4888-4895, 2006
 14. Tomizawa M, Horie H, Yamamoto H, Matsunaga T, Sasaki F, Hashizume K, Hiyama E, Kaneko

- M, Suita S, Ando H, Hayashi Y, Ohnuma N, Nakagawara A. Reciprocal expression of CCAAT/enhancer binding proteins α and β in hepatoblastomas and its prognostic significance. *Oncol. Rep.* 17:341-344, 2007
15. Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, Nakagawara A, Kaneko M. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133:185-192, 2007
 16. Yamamoto H, Ozaki T, Nakanishi M, Kikuchi H, Yoshida K, Horie H, Kuwano H, Nakagawara A. Oxidative stress induces p53-dependent apoptosis in hepatoblastoma cell through its nuclear translocation. *Genes to Cells* (in press)
 17. Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press)
 18. Takahashi M, Ozaki T, Takahashi A, Miyauchi M, Ono S, Takada N, Koda T, Todo S, Kamijo T, Nakagawara A. DFF45/ICAD restores cisplatin-induced nuclear fragmentation but not DNA cleavage in DFF45-deficient neuroblastoma cells. *Oncogene* (in press)
 19. Nakagawara A. Chapter 5. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg, pp41-53.
 20. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
 21. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
 22. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* 228:5-11, 2005
 23. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A, Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* 24:3385-3396, 2005
 24. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* 228:29-35, 2005
 25. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* 7:337-350, 2005
 26. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit beta as a

- novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* 280:16665-16675, 2005
27. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR. *J. Clin. Oncol.* 23: 5205-5210, 2005
28. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 167:213-222, 2005
29. Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.* 65:4587-4597, 2005
30. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of *FBN2* correlates with progression of human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 50:43-49, 2005
31. Nakagawara A, Sawada T, Brodeur GM, Matthay KK. Professor Yoshiaki Tsuchida, MD, PhD (1936-2005). *Pediatr. Blood Cancer.* 45:609-610, 2005
32. Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 96:653-660, 2005
33. Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 96:729-737, 2005
34. Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene* 24:7156-7169, 2005
35. Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. In *NGF and Related Molecules in Health and Disease*, Ed. By Luigi Aloe and Laura Calza, Progress in Brain Research Vol. 146, 2004, Elsevier Science Publisher, pp233-242.
36. Nakagawara A, Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In *Special Issue: Neural development and cancer.* *Cancer Lett.* 204:23-224, 2004.
37. Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 11327-11335, 2004.
38. Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. 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.* 24:1457-1466, 2004
39. Ohtori S, Isogai E, Hasue F, Ozaki T, Nakamura Y, Nakagawara A, Koseki H, Yuasa S, Hanaoka E, Shinbo J, Yamamoto T, Chiba H, Yamazaki M,

- Moriya H, Sakiyama S. Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene abrrative in neuroblastoma. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:504-514, 2004.
40. Wang YQ, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Takenaga K, Shishikura T, Nakagawara A, Sakiyama S, Tagawa M and O-Wang J. Elevated expression of DNA polymerase k in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.* 25:161-165, 2004.
41. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:25549-25561. 2004.
42. Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A, Ohnuma N, Yokoyama T. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 91:972-979, 2004.
43. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. 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.
44. Takahashi M, Ozaki T, Todo S, Nakagawara A. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene ING1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncol Rep.* 12:811-816, 2004.
45. Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int. J. Cancer* 112:365-375, 2004.

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究）
平成16－18年度分担研究報告書
進行神経芽腫に対する標準的治療法の確立および新規治療法開発のための研究

分担研究 「中央病理診断と検体二次利用システムの確立」

分担研究者 秦 順一 国立成育医療研究センター 総長

研究要旨 神経芽腫の治療改善のためには大規模な多施設臨床試験をおこなう必要がある。そのための基盤整備のうち症例登録、中央病理診断、遺伝子解析など治療選択に必須なシステムの構築について検討を行った。また、INPC 病理分類とともに、予後判定にインパクトが高い MYCN をホルマリン固定パラフィン切片を用いた FISH 法で同定する方法にも言及した。

A. 研究目的

小児がんの中で極めて難治性である進行神経芽腫の治療成績向上には大規模な多施設臨床試験（以下 JNBSG）の推進が必須である。このような臨床試験の遂行にはまず、その根拠となる腫瘍診断の標準化が必須であり、臨床試験参加施設はそのための検体の提供が必要要件となる。一方、臨床試験の実施機関はそれらの検体を用いて症例毎に正確な診断を参加施設に提供する必要がある。さらに、これらの余剰検体を新たな診断や治療開発のためのトランスレーショナルリサーチに再利用することも重要である。本研究は、神経芽腫の多施設臨床試験における中央病理診断体制の確立のため、予後予測が可能な神経芽腫の病理組織分類を定め、且つこれら診断の標準化のためのシステム構築とその運用について追究した。

B. 研究方法

中央病理診断の体制に関して以下の検討を行った。

1) 客観的で再現性の高い病理診断と同時に腫瘍病態を反映する遺伝子解析の結果を臨

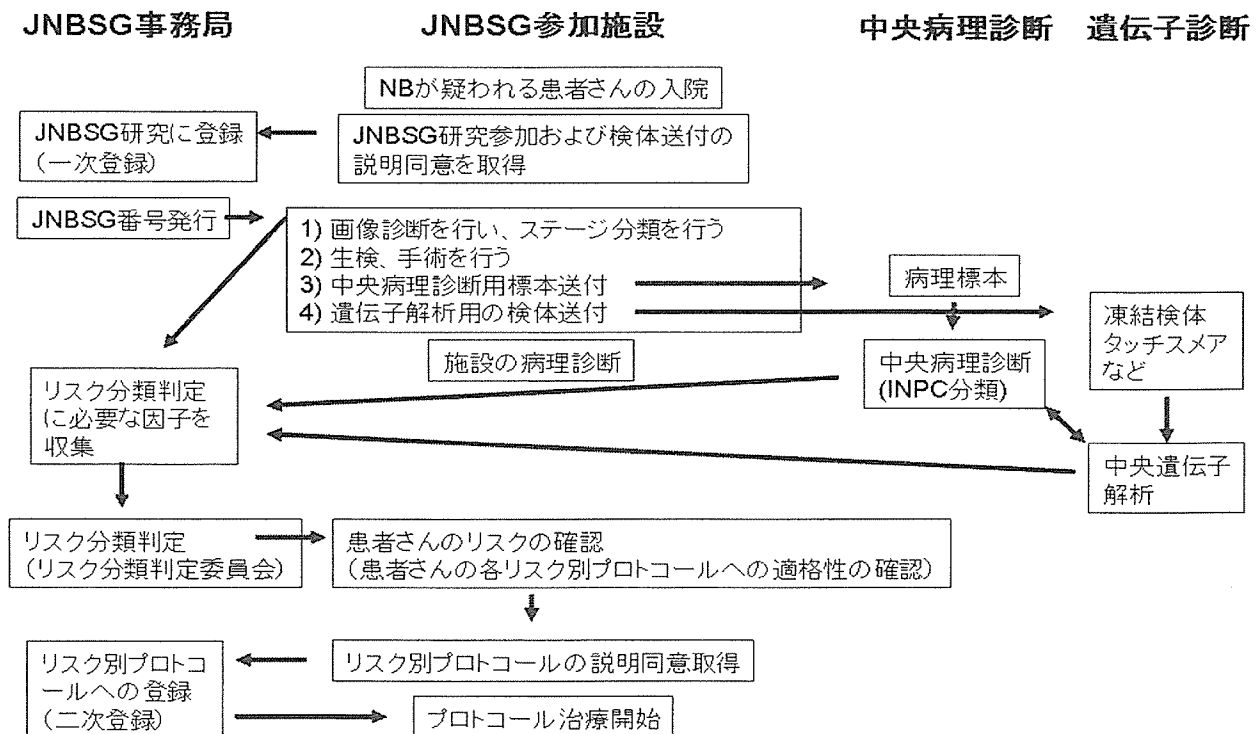
床試験の実施機関と関連部門（リスク分類委員会、データセンターなど）伝達する方法を確立するために必要な症例登録の仕組みを検討した。

2) 本臨床試験で用いる国際神経芽腫組織分類（International Neuroblastoma Pathology Committee Classification, INPC）に加えて、リスク分類や予後に強いインパクトがある MYCN 遺伝子の組織切片上での検出法を確立し、組織像と併せて報告することができるよう体制を確立する。

C. 研究結果 および D. 考察

(1) JNBSG の症例登録から病理診断結果および遺伝子解析の結果を関連各所に伝達する方法について。

JNBSG参加施設の患者登録手順と検体送付手順略図



①JNBSG の症例登録から病理診断結果および遺伝子解析の結果を関連各所に伝達する概要は上図に示した。

このシステムの特徴は個人情報を JNBSG 番号に置き換えることによって、個人情報の保護を目的とすると同時に、治療選択に必要なリスク分類を中央病理診断および遺伝子解析を総合的に判断して行うことができることにある。リスク分類は国際分類 (International Neuroblastoma Risk Group (INRG) に準じて行う。

②神経芽腫新国際分類 INPC の概要は以下の通りである。

A) INPC組織学的分類の方針と病理組織分類

1) Neuroblastoma/subgroup

a) undifferentiated

b) poorly differentiated

c) differentiating

2) Ganglioneuroblastoma, intermixed

3) Ganglioneuroma/subgroup

a) maturing

b) mature

4) Ganglioneuroblastoma, nodular

C) 発生年齢と組織分類から判断 (推定) される神経芽腫の予後 (Prognostic risk grouping)

i) High MKI を示す腫瘍は、腫瘍細胞の分化度、年齢に拘わらず常に予後不良グループ

ii) Undifferentiated NB は年齢に関連なく予後不良グループ

iii) 1.5 歳以上の Poorly differentiated