

生存割合、有害事象発生割合、局所療法前における奏効割合

## B 方法

### 1. 化学療法

CPA/VCR/THP/CDDP からなる寛解導入化学療法を計 5 コース行い、その後に自家造血幹細胞移植を併用した L-PAM/VP-16 /CBDCA からなる骨髄破壊的大量化学療法を行い、さらにその後に外科療法及び放射線療法を行う。

#### 1.1 プロトコール治療と取り決め

##### プロトコール治療の概要

以下の(1)～(6)の順序で行う一連の治療をプロトコール治療と規定する。

- (1) 寛解導入化学療法として 05A1 療法を 1 コース施行する。
- (2) 引き続いて寛解導入化学療法として 05A3 療法を 4 コース繰り返す。
- (3) 寛解導入化学療法第 3～4 コース目が終了した後の骨髄回復期に自家末梢血幹細胞採取を施行する。
- (4) 寛解導入療法終了後、大量化学療法 (MEC 療法) + 自家造血幹細胞移植療法 (自家 SCT) を施行する。
- (5) 大量化学療法後に状態が安定した後、外科療法を施行する。
- (6) 術中放射線照射または外科療法後に局所放射線療法を施行する。

#### 1.2 寛解導入化学療法 (05A1 療法と 05A3 療法)

以下の薬剤投与計画を 05A1 療法、05A3 療法と名づける寛解導入療法を行う。

4 週 (28 日) ごとに定期的に繰り返す。初回第 0 週は 05A1 療法を、その後の 4 回 (第 4 週、第 8 週、第 12 週、第 16 週に

それぞれ開始する) は 05A3 療法を繰り返す。

##### 《05A1 療法》

シクロホスファミド (CPA) 1, 200 mg/m<sup>2</sup>/日 第 1 日 点滴静注  
ビンクリスチン (VCR) 1.5 mg/m<sup>2</sup>/日 第 1 日 静注 (緩徐に静注)  
ピラルビシン (THP) 40 mg/m<sup>2</sup>/日 第 3 日 静注 (点滴静注 or 緩徐静注)  
シスプラチン (CDDP) 20 mg/m<sup>2</sup>/日 第 1-5 日 24 時間持続点滴静注

##### 《05A3 療法》

シクロホスファミド (CPA) 1, 200 mg/m<sup>2</sup>/日 第 1, 2 日 点滴静注  
ビンクリスチン (VCR) 1.5 mg/m<sup>2</sup>/日 第 1 日 静注 (緩徐に静注)  
ピラルビシン (THP) 40 mg/m<sup>2</sup>/日 第 3 日 静注 (点滴静注 or 緩徐静注)  
シスプラチン (CDDP) 20 mg/m<sup>2</sup>/日 第 1-5 日 24 時間持続点滴静注

末梢血幹細胞または自家骨髄の採取  
採取時期と末梢血幹細胞動員

上記寛解導入化学療法第 3 コースめまたは第 4 コースめなどの化学療法終了後または好中球減少期から、造血幹細胞の末梢血中への動員のための用法用量で規定された方法で G-CSF (レノグラスチム: 10 μg/kg/日またはフィルグラスチム: 400 μg/m<sup>2</sup>/日) の連日皮下注射 (乳幼児または出血傾向のため皮下注射が困難な場合、静脈注射も可) により末梢血幹細胞動員を行い、血球回復期に末梢血幹細胞採取を行う。

末梢血幹細胞採取が不十分な場合の対応  
末梢血幹細胞採取にて、CD34 陽性細胞数が  $2 \times 10^6$ /kg 患者体重に満たない場合は、さらに 05A3 療法 1 コースを施行後に同様に末梢血幹細胞の動員を行い採取する。CD34 陽性細胞数の合計が  $2 \times 10^6$ /kg 患者体重に満たない場合は、第 20 週までに自家骨髄を追加採取して併用するか、あるいは自家骨髄単独に切り替えるなど、試験担当医師の判断と施設の状況によって最も適切と思われる方法で対処を行う。

### 1.3 大量化学療法および自家造血幹細胞救援療法

#### MEC 療法と造血幹細胞輸注

以下の薬剤投与計画を 09MEC 療法 と名づける。詳細な投与量と投与方法は「7.4.3 薬剤の投与量・投与方法」を参照すること。このレジメンで骨髄破壊的大量化学療法を行った後の day 0 に、既に採取・凍結保存しておいた自家造血幹細胞を用いて救援療法を施行する。幹細胞輸注手技及びその後の支持療法に関しては、施設の取り決めに従って施行する。

#### 《09MEC 療法》

メルファラン (L-PAM) 100mg/m<sup>2</sup>/日  
第-9、-8 の 2 日 静注 or 点滴静注  
エトポシド (VP-16) 200mg/m<sup>2</sup>/日  
第-7~-4 の 4 日 点滴静注  
カルボプラチン (CBDCA) 400 mg/m<sup>2</sup>/日  
第-7~-4 の 4 日 24 時間持続点滴静注

### 2. 原発巣の摘出

大量化学療法後の原発巣摘出手術を安全に施行するためには、外科療法開始基準を満たすまで患児の全身状態が改善していることが重要である。加えて、患児

の全身状態を慎重に評価し、安全な外科治療を心がけることが必要である。

また、大量化学療法後の外科治療は、小児腫瘍手術に精通した外科医が、外科チームのリーダーシップをとって手術および周術期管理を行うことが望ましい。

原発部位に関わらず、原則として周囲臓器をできるだけ温存して原発巣を全摘出する。原発巣と一塊になったリンパ節は原発巣とともに切除を目指す。腫瘍切除範囲に関して判断に迷う場合は外科治療委員会にコンサルトする必要がある。

このため外科療法ガイドラインを作成した。

### 3. 放射線療法ガイドライン

放射線療法を標準的に行うためにガイドラインを作成した。

### 4. 治療に関する相談

治療に関する疑問点がある場合には、以下の研究事務局への問い合わせ体制を強化した。

#### 研究事務局

(プロトコール全般、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 日本大学医学部小児科  
外科療法研究事務局 (外科療法)

田尻 達郎 九州大学病院小児外科  
放射線療法研究事務局 (放射線療法)

正木 英一 国立成育医療センター放射線診療部

線量分布や物理学的疑問の問い合わせ先  
國枝 悦夫 慶応義塾放射線科学教室

### C. 研究結果

## 1. 計画立案、施設参加、IRB 承認、登録開始

全国 J N B S G 参加施設に対し周知を行い、臨床試験への参加を要請した。その結果現在までに 43 施設で I R B 承認が得られ、登録が開始された。

## 2. 登録進捗状況

平成 25 年 1 月現在での登録例は予定登録数の 53.0% (35 例) が登録された。

進行神経芽腫は、発見時すでに症状が相当に重篤な症例が少ないため、臨床試験には登録できず、救命を優先して臨床実践を行わざるを得なかった症例が少なからず認められた。また、I R B 未承認のために臨床試験に登録できない症例も少なからずみられたため、データセンターと研究事務局が協力し、参加施設に I R B の承認作業を進めるように依頼した。その結果現時点では登録の進捗状況は予定どおりの順調な登録がなされている。

## 3. データセンターによる臨床試験運営作業およびモニタリング作業内容

データセンターにおいて実際の症例登録を初めとした臨床試験の運営運用を行った。臨床試験事務局はデータセンターと協力し、個々の問題となる案件について適宜判断を行なった。

データセンターにおける業務

- ① モニタリング毎の追跡調査
- ② CRF の回収状況チェック
- ③ 未回収 CRF についての問い合わせ
- ④ マニュアルチェック
- ⑤ CRF 不明点・未記入の問い合わせ

## ⑥ データ入力

## ⑦ 集計

上記のようにデータセンターと参加施設の努力により遅滞無く CRF が回収されている。研究事務局は CRF レビューを 24 年度は 2 回行なった。

## 4. 治療経過

臨床試験が継続中であり、治療経過についてはまだ公表される状況ではない。登録 35 例中臨床試験治療中が 19 例、治療完了が 10 例、治療中止が 6 例である。

## 5. プロトコール逸脱について

### ① 治療期間に関するもの

【寛解導入化学療法】該当例なし

【大量化学療法】1 例。開始予定気管内に急性副鼻腔炎となり治療開始を延期した。安全性を優先した適切な判断と評価する。

【外科療法】1 例。外科療法開始が大量化学療法後の有害事象からの回復を待ち遅延した。安全性を優先した適切な判断と評価する。

【放射線療法】1 例。放射線療法開始が大量化学療法後の有害事象からの回復を待ち遅延した。安全性を優先した適切な判断と評価する。

### ② 投与開始規準の不遵守

該当例なし

### ③ 投与日の不遵守

3 例。感染症および有害事象からの回復を待ち遅延した。適切な判断である。

### ④ 投与量および投与量変更規準の不遵守

15 件。詳細は省略する。

## ⑤検査と評価項目に関する不遵守

46件認められたがいずれも注意喚起と判断した。今後周知を行う。

## 6. 安全性の評価

### 1. 重篤な有害事象

治療関連死はない。治療期間中または治療終了30日以内の死亡例もない。

Grade4の非血液毒性には、1例でGrade4の血清アミラーゼ上昇を認めたが、L-PAMによるものであり、予期されたものに含める。低ナトリウム血症1例、低カリウム血症1例、低カルシウム血症1例、AST/ALT上昇1例、敗血症2例、出血性膀胱炎1例、急性腎不全1例、HUS1例、腫瘍崩壊症候群1例を認めたが、いずれも適切な処置で回復している。

それ以外のGrade4の有害事象は好中球減少症・白血球減少症・血小板減少症だけであり、これは化学療法の投与量から想定内と判断する。その他は特に問題ない。

## D. 考察

本臨床試験の開始は、日本における進行神経芽腫に対する新規治療の開発を目指すものであり、その意義は以下の4つである。

1)1985年以来、我が国の地域標準として行われてきた化学療法レジメンを基本としながら、既に分かっている毒性のプロファイルを基に修正を施した05A1及び05A3レジメンの安全性評価を行い、寛解導入療法の最適化を図る。

2)局所遅延療法という新たな概念を適用する事によって、化学療法の治療強度を上げるという戦略の有効性を評価する事を目指す。

3)外科療法および放射線療法などの治療方針を可能な限り統一したガイドラインを設定し、施設間の手技格差によるバイアスを最小化するとともに、従来、臨床試験に慣れていなかった当該分野の専門医師の意識を高め、今後の臨床試験の礎とする。

4)欧米諸国と同等レベルの整備された臨床研究体制の確立を行う。

現在まだ臨床試験の登録期間中であり、有効性については結論を出す段階ではない。

安全性についてのモニタリング・情報伝達・解析は逐次実施されており、順調に体制整備がなされていると考えられる。

## E. 結論

臨床試験の運営は順調に行え、有害事象などの問題点発生時にも順当に運営が行えた。

## F. 健康危険情報

施設からの有害事象報告で得られた情報は、これまでのところ全て臨床試験企画段階から予期された範囲内のものであり、いずれも効果安全性評価委員会の判断でも、臨床試験継続に問題なしと結論されている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) Hiroyuki Shichino, Hideo Mugishima\*, Akira Kikuchi, Yoshiyuki Kosaka, Shigeru Tsuchiya, Keiko Asami, Tomoko Iehara, Michio Kaneko, Tetsuya

Takimoto, Atsushi Makimoto,  
Hideto Takahashi, Atsuko Nakazawa,  
Junichi Hata, Tatsuro Tajiri,  
Hidekazu Masaki, Akira Nakagawara,  
Takashi Fukushima, Junichi Hara,  
Hitoshi Ikeda: The Japan  
Neuroblastoma Study Group :  
FEASIBILITY OF DELAYED LOCAL  
CONTROL TREATMENT IN PATIENTS WITH  
HIGH RISK NEUROBLASTOMA: REPORT OF  
A PILOT STUDY FROM THE JAPAN  
NEUROBLASTOMA STUDY GROUP (JNBSG)  
7th SIOP ASIA, YOGYAKARTA  
INDONESIA 2012. 4. 22~24

2) 大熊啓嗣、七野浩之、西川恵英里、平井麻衣子、下澤克宜、加藤麻衣子、谷ヶ崎博、金丸浩、唐沢賢祐、鮎沢衛、陳基明、能登信孝、住友直方、麦島秀雄:小児がん長期生存者に認められた心室中隔壁の異常運動について. 第 115 回日本小児科学会学術集会、福岡、2012. 4.

3 ) Katsuyoshi Shimozawa, Hiroyuki Shichino, Hiroshi Yagasaki, Maiko Hirai, Maiko Kato, Kiminobu Sugito, Tsugumichi Koshinaga, Tsutomu Saito, Motoaki Chin, Hideo Mugishima : A TRIAL TREATMENT OF LONG-TERM MAINTENANCE CHEMOTHERAPY FOR REFRACTORY NEUROBLASTOMA : A SINGLE INSTITUTION EXPERIENCE IN 7 PATIENTS . Advanced in Neuroblastoma 2012 TRONTO, 2012. 6.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）  
分担研究報告書

神経芽腫における標準治療の確立と新規治療の開発に関する研究

研究分担者 家原 知子 京都府立医科大学大学院大学小児発達医学

研究要旨：低・中間リスク神経芽腫に対して、低リスク群標準治療観察研究と中間リスク群標準治療第Ⅱ相臨床試験を開始し、登録を行っている。また、高リスクに対する治療反応性の評価として微少残存病変の検出に関する付随研究を提案した。

A. 研究目的

低・中間リスク神経芽腫に対する副作用を最小限に抑えた標準治療を確立することを目的とする。また、高リスクに対する治療反応性の評価として微少残存病変の検出に関する付随研究を提案した。

B. 研究方法

IDRF（Image Defined Risk Factors）に基づいた低リスク群標準治療観察研究（通称；低リスクプロトコール）と IDRF に基づいた中間リスク群標準治療第Ⅱ相臨床試験（通称；中間リスクプロトコール）を作成した。

C. 研究結果

低リスク；初期手術は摘出か生検を行うのかを画像所見から手術リスクを推定し、判定するための評価項目 Image Defined Risk Factors（IDRF）に基づいて初期手術の適応を判定することを推奨とした。化学療法は、初期手術摘出不能例に対してのみ行い、低用量の抗がん剤を使用する。上記治療法で本邦における低リスク群の治療成績と有害事象の発生割合を見ることを目的とする観察研究を計画した。

予定登録数:60例、研究期間:6年間、登録期間:3年、追跡期間:3年。

主要評価項目：3年全生存割合。

副次的評価項目：有害事象発生割合・手術関連合併症の発生割合・3年無増悪生存割合。

2012年12月31日現在で46例の登録があり、2013年度中に試験登録が終了する予定である。現在のところ重篤な副作用の報告はない。

中間リスク；限局例と遠隔転移を持つ症例に分類

され、生検後に化学療法にて腫瘍の縮小を図り、その後原発巣の二期的摘出を試みる。限局例に関しては、年長児の症例が入ることなどから、低リスク群治療よりも治療強度を上げてVCR+CPA+CBDCA（LI-C）の治療を初期治療に用いることとした。治療反応性によりCPAの増量とTHP、CDDPを併用したVCR+CPM+THP+CDDP（LI-D）を行い、治療強度を上げて治療成績向上を図ることとした。また、遠隔転移例に対しては、生検後にLI-Dレジメンを総計5ないし6クルールの治療を行う中で遠隔転移が制御され、摘出可能となった時期に手術摘出を行う方針とした。反応が不良である場合には高リスク群治療の寛解導入レジメンと同様のLI-E治療を行う。中間リスク群については第二相臨床試験とする。

予定登録数：73例、登録期間5年

観察期間3年、研究期間8年。

主要評価項目：3年累積無増悪生存率

副次的評価項目：3年累積全生存率、臨床的奏効割合、組織学的奏効率

2012年12月31日現在13例登録され、現在のところ重篤な有害事象は生じていない。

また、「高リスク神経芽腫患者における、血液中・骨髄中・自己末梢血幹細胞採取液中の微小残存病変の経時的評価」の付随研究申請を行い、現在倫理診査委員会にて審査中である。2013年に試験開始予定である。

D. 考察

低リスク群においては、IDRFを諸外国に先駆けて導入することにより、手術による治療合併症を最小限に抑えた治療法で良好な成績が得られるものと期待される。

中間リスク群においては、低用量または中等量

の抗がん剤の組み合わせで導入化学療法を施行し、治療効果を上げる手法をとることにより、重篤な副作用の発生を抑えた標準治療の確立ができるものとする。現在 IRB の承認を各施設に依頼し、登録率の向上をめざしている。

#### E. 結論

低リスク群標準治療観察研究と中間リスク群標準治療第Ⅱ相臨床試験の臨床研究を行っている。高リスク神経芽腫に対する微小残存病変の検出に関する研究を提案した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Fujiki A, Imamura T, Furutani A, Hatano W, Asai D, Hirashima Y, Miyachi M, Tamura S, Tsuchiya K, Iehara T, Ishida H, Yoshihara T, Hosoi H. Quantitative RT-PCR analysis of the MOZ-CBP fusion transcript in therapy-related acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13). *J Pediatr Hematol Oncol.* 34(5): 402-405, 2012

Iehara T, Hiyama E, Tajiri T, Yoneda A, Hamazaki M, Fukuzawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Sawada T. Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12 months of age and older really excellent? *Eur J Cancer.* 48(11): 1707-1712, 2012

Iehara T, Hamazaki M, Tajiri T, Kawano Y, Kaneko M, Ikeda H, Hosoi H, Sugimoto T, Sawada T; Japanese Infantile Neuroblastoma Cooperative Study Group. Successful treatment of infants with localized neuroblastoma based on their MYCN status. *Int J Clin Oncol.* [Epub ahead of print](2012)

Sano Y, Okuyama C, Iehara T, Matsushima S, Yamada K, Hosoi H, Nishimura T. New semi-quantitative 123I-MIBG estimation method compared with scoring system in follow-up of advanced neuroblastoma: utility of total MIBG retention ratio versus scoring method. *Ann Nucl Med.* 462-70. 2012

Tajiri T, Kimura O, Fumino S, Furukawa T, Iehara T, Souzaki R, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Hishiki T, Hosoi H, Hiyama E, Taguchi T. Surgical strategies for unresectable hepatoblastomas. *J Pediatr Surg.* 2194-2198. 2012

Sugimoto T, Gotoh T, Yagyū S, Kuroda H, Iehara T, Hosoi H, Ohta S, Ohira M, Nakagawara A. A MYCN-amplified cell line derived from a long-term event-free survivor among our sixteen established

neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett.* S0304-3835[Epub ahead of print] (2012)

##### 2. 学会発表

Iehara T, Yagyū S, Ouchi K, Sakamoto K, Miyachi M, Gotoh T, Shiota M, Nakagawara A, Sugimoto T, Hosoi H. Prospective evaluation of MYCN gene amplification status using serum DNA of neuroblastoma patients. *Advances in Neuroblastoma Research 2012.* Toronto, Canada (2012)

Tuji K, Iehara T, Yagyū S, Katsumi Y, Tamura S, Sugimoto T, Hosoi H. The expression of retinoic acid related genes in neuroblastoma can predict the patients' prognosis. *Advances in Neuroblastoma Research 2012.* Toronto, Canada (2012)

Tanaka T, Hayashi K, Iehara T, Hosoi H, Sugimoto T, Hamasaki M, Kaneko M, Sawada T. The prospective risk can stratified in various neuroblastoma groups: statistical analysis on the data over than 3 decades in Japan. *Advances in Neuroblastoma Research 2012.* Toronto, Canada (2012)

Yoneda A, Tajiri T, Hishiki T, Maeda K, Iehara T, Hiyama E. Changes in clinical feature of neuroblastoma after the cessation of the mass screening in Japan. *Advances in Neuroblastoma Research 2012.* Toronto, Canada (2012)

Yagyū S, Iehara T, Sakamoto K, Tsuchiya K, Hosoi H. Genomic evaluation in relapsed neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research 2012.* Toronto, Canada (2012)

Katsumi Y, Iehara T, Tsuchiya K, Kuwahara Y, Yagyū S, Imamura T, Hosoi H. The utility of cystatin C for evaluation of renal function in pediatric cancer patients. 44th Congress of the International Society of Pediatric Oncology, London, United Kingdom (2012)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）  
平成24年度分担研究報告書

神経芽腫における標準治療の確立と新規治療の開発に関する研究

分担研究者 上條岳彦 千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部長

### 研究要旨

神経芽腫におけるがん幹細胞を規定するマーカーは未だに知られておらず、無血清・bFGF/EGF培地でのTumor sphere細胞が非常に少数でのマウス移植腫瘍形成を可能であるTumor Initiating Cellsであることが知られている（Hansford et al., Cancer Res. 2007）。我々はこの神経芽腫Tumor sphereの培養法を確立した。幹細胞性に重要な意義を持つCD133は、神経芽腫の分化を抑制している（Takenobu H et al., ONCOGENE, 2011）。我々は神経芽腫Tumor sphereにおけるCD133の意義を検討した。複数の神経芽腫Tumor sphereにおいて、CD133過剰発現でSphere形成が顕著に促進された。CD133の神経芽腫がん幹細胞での役割が示唆された。

#### A. 研究目的

小児の代表的な固形腫瘍である神経芽腫において、再発は臨床上の大きな問題である。神経芽腫での5年生存率はStage III, IVの進行例では30~50%と未だに小児腫瘍としては難治であり、その主な原因は再発にある。がん幹細胞は1. 自己複製、2. 分化能、3. 高い造腫瘍能、4. 薬剤耐性などの性質を持ち、がん幹細胞の存在が再発・難治化に深く関わっていると考えられている。

神経芽腫におけるTumor sphere形成とはがん細胞の初代培養を無血清DMEM:F12 (1:1) 培地にEGF, FGFなどを添加した培養系で行うものである。培養細胞は細胞集塊を形成して増殖し、神経芽腫で高い腫瘍形成能を示すTumor initiating cells; がん幹細胞を得ることが可能になる。このSphere形成によって自己複製能・分化能・造腫瘍能が亢進した細胞が得られる分子機構は

未解明であり、神経芽腫でのSphere細胞での特有の表面マーカーも同定されていない。

我々は神経芽腫におけるTumor sphere培養の確立を本研究で行い、その分子機構を明らかにし、新たな治療法開発に役立てることを目的とした。

#### B. 研究方法

1. 神経芽腫細胞におけるTumor sphereアッセイ：初代培養神経芽腫細胞および細胞株をDMEM / F12 (1:1); F12 supplement (1 x, Gibco); EGF (20 ng/ml, Sigma); bFGF (20 ng/ml, Sigma)を用いて培養した。

2. 神経芽腫細胞株に対する遺伝子過剰発現：CD133遺伝子過剰発現はレンチウイルスベクター系pHRおよびpCDHを用いて行った。遺伝子発現は半定量的RT-PCR, qPCR, およびウェスタンブロッティングで確認した。

(倫理面への配慮) 本研究計画は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が定めるB群試料等に相当する腫瘍組織を用いるため、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」(科学技術会議生命倫理委員会)を十分に理解し、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省共同告示第1号)(平成16年12月28日全部改正)(平成17年6月29日一部改正)」を遵守して実施する。千葉県がんセンター倫理審査委員会において課題番号18-13として承認を受けている。

動物実験は動物委員会の定める動物実験倫理規定に従って、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をとまなう実験への十分な配慮のもとに、慎重に進めている。

### C. 研究結果

#### 1. 神経芽腫Tumor sphereの形成

MYCN増幅神経芽腫細胞2株および神経芽腫細胞株からTumor Sphereを形成した。この神経芽腫Tumor sphere細胞は、接着細胞に比べて高い造腫瘍能を持つことが明らかになった。

#### 2. がん幹細胞マーカーCD133のTumor sphere形成に対する影響

がん幹細胞マーカーCD133は多くの神経芽腫細胞株で発現していることがRNAレベルで見出され、またSphere形成でCD133転写が促進されることが明らかになった

(Takenobu H et al., ONCOGENE)。CD133をレンチウイルス系によるCD133過剰発現では、Tumor sphere形成は促進された

( $p < 0.05$ )。特に径が $300 \mu\text{m}$ より大きいsphereでは、形成sphereが2倍以上に増加した( $p < 0.0001$ )。このsphere形成の促進は、

sphere中の細胞の生存がCD133過剰発現細胞で有意に増加していることがその原因の一つであると推測された。

### 3. JNBSG登録検体に対する検査

千葉県がんセンター神経芽腫検体センターには約17年間で、全国の小児がん治療病院から総計3000検体が寄せられ、国際的にも優れたバイオバンクとなっている。

また、JNBSGは2006年に発足したが、千葉県がんセンターでの2012年までのJNBSG登録検体数は431検体、うち平成24年(H24 1月~H24 12月)の受付け検体数は114検体であった。

### D. 考察

次の課題として、神経芽腫SphereでのCD133の発現促進の分子機構を明らかにすることが重要と考えられた。

### E. 結論

神経芽腫でTumor sphereの培養法を確立し、脳腫瘍、白血病、神経芽腫などの多くのがんで幹細胞性に重要な意義を持つがん幹細胞マーカーCD133による神経芽腫Tumor sphere形成促進が明らかになった。

### F. 健康危険情報 (特記なし)

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表(2012年度)

1. Kamiyo T. Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatric Res.* 2012 Apr;71(4 Pt 2):511-5. doi: 10.1038/pr.2011.54. Epub 2012 Feb 1. PMID:22430387

2. Kamiyo T., Nakagawara A. Molecular and genetic bases of neuroblastoma.

Int J Clin Oncol. 2012 Jun;17(3):190-5.  
Epub 2012 May 16PMID:22588778

3. Hossain S, Takatori A, Nakamura Y, Suenaga Y, Kamiyo T, Nakagawara A. NLRR1 Enhances EGF-Mediated MYCN Induction in Neuroblastoma and Accelerates Tumor Growth In Vivo. Cancer Res. 2012 Sep 1;72(17):4587-96. Epub 2012 Jul 19.

4. Oonishi K, Cui X, Hirakawa H, Fujimori A, Kamiyo T, Yamada S, Yokosuka O, Kamada T. Different effects of carbon ion beams and X-rays on clonogenic survival and DNA repair in human pancreatic cancer stem-like cells. Radiother Oncol. 2012 2012 Nov;105(2):258-65.

## 2. 書籍

1. Takehiko Kamiyo, Neuroblastoma: Role of MYCN/Bmi1 Pathway in Neuroblastoma. Pediatric Cancer, Volume 1, Neuroblastoma, Springer Science+Business Media B.V. 2012

## 3. 学会発表 (国際学会のみ) (AACR2012)

1. Shintaro Iwata, Miki Ohira, Takehiko Kamiyo, Tsukasa Yonemoto, Takeshi Ishii, Shin-ichiro Tatezaki, Akira Nakagawara. Chemosensitivity prediction in

osteosarcoma Chiba Cancer Center, Chiba, Japan  
(SIOP Asia2012)

1. Hidemasa Ochiai, Hisanori Takenobu, Yohko Yamaguchi, Nobuhiro Akita, Takehiko Kamiyo, MYCN-DEPENDENT ONCOGENIC BMI1 INDUCTION IN NEUROBLASTOMA AND FIBROBLASTS

(2012Advances of Neuroblastoma Research)

1. Yohko Yamaguchi, Hisanori Takenobu, Sayaka Yoshida, Nobuhiro Akita, Miki Ohira, Atsuko Nakazawa, Akira Nakagawara and Takehiko Kamiyo Functional analysis of a novel lp tumor suppressor DMAP1.

2. Hisanori Takenobu, Osamu Shimozato, Nobuhiro Akita, Yohko Yamaguchi, Haruka Uehara, Miyuki Waraya, Sayaka Yoshida, Akira Nakagawara, Takehiko Kamiyo Tumor sphere specific CD133 regulation in neuroblastoma

3. Nobuhiro Akita, Hisanori Takenobu, Atsuko Nakazawa, Hidemasa Ochiai, Akira Nakagawara, Takehiko Kamiyo BMI1 regulates neuroblastoma apoptotic cell death and differentiation

(Japan-China Symposium on Cancer Research2012)

1. Takehiko Kamiyo, The role of Cancer Stem Cell marker CD133 in tumorigenesis

2. Yohko Yamaguchi, Hisanori Takenobu,  
Sayaka Yoshida, Nobuhiro Akita, Miki  
Ohira, Akira Nakagawara and Takehiko  
Kamijo

Functional analysis of a novel lp tumor  
suppressor DMAP1

(SIOP2012London)

1. Yohko Yamaguchi, Hisanori Takenobu,  
Nobuhiro Akita, Takehiko Kamijo ANALYSIS  
OF MYCN-DEPENDENT APOPTOTIC CELL DEATH  
PATHWAY

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 出願済み1件
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)  
分担研究報告書

神経芽腫における標準治療の確立と新規治療の開発に関する研究

研究分担者 林泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨 神経芽腫の1歳以上の進展例は近年の強力な集学的治療にもかかわらず予後不良である。近年チロシンキナーゼの活性化が予後と相関することが白血病や成人の固形腫瘍で報告されており、我々はこれまでにチロシンキナーゼの KIT、PDGFR、FLT3、RET、TRKA、ALK、EGFR と MET につき、発現と予後の関係を検討し報告した。今年度はNB細胞株と新鮮腫瘍で Affymetrix 社の Gene チップ 500k array を用いて腫瘍ゲノムに生じたコピー数の変化および uniparental disomy (UPD) の解析を行い、*MYEOV* と *NEGR1* 遺伝子は 11q31 増幅と 1p31 減少の標的遺伝子と思われ、*NEGR1* 遺伝子の発現は予後因子になりうると思われた。また、神経芽腫細胞株より ALK の短縮型をみい出してその機能解析を行い、短縮型 ALK は新たな活性型変異であることを明らかにした。

#### A. 研究目的

神経芽腫の1歳以上の進展例は近年の強力な集学的治療にもかかわらず、予後不良であり、予後因子として *MYCN* や 1p欠失、14q欠失が報告されている。近年チロシンキナーゼの活性化が予後と相関することが白血病や成人の固形腫瘍で報告されており、昨年度はチロシンキナーゼの ALK、EGFR、MET と癌抑制遺伝子の DCC につき、免疫染色法による蛋白の発現と予後の関係を当センターの神経芽腫症例で検討して報告した。また神経芽腫の細胞株と新鮮腫瘍で Affymetrix 社の Gene チップ 500k array を用いて腫瘍ゲノムに生じたコピー数の変化および uniparental disomy (UPD) の解析を行い、2p の *MYCN* の近傍にみい出した増幅領域は、*ALK* 遺伝子であり、215 例中 13 例 (6.1%) で *ALK* の変異をみいだし報告した。

今年度は神経芽腫の UPD の検索で 11q13 領域に増幅 (gain) を、1p31 領域に減少 (loss) を認め、これらの領域から新規候補遺伝子をみい出し、これらの遺伝子の多数例での解析を行い神

経芽腫における役割を検討した。

また、神経芽腫細胞株より ALK の短縮型をみい出したので、その機能解析を行った。

これらの解析により、神経芽腫の病態を明らかにし、新規分子標的薬をみい出す基盤を確立するのが目的である。

#### B. 研究方法

##### < *MYEOV* と *NEGR1* 遺伝子の抽出と解析 >

神経芽腫細胞株 25 株と新鮮腫瘍 30 例で、Affymetrix 社の Gene チップ 500k array を用いて腫瘍ゲノムに生じたコピー数の変化および UPD の解析を行った。

抽出された新規 *MYEOV* と *NEGR1* 遺伝子の発現は RT-PCR 法を用い、knockdown は siRNA 法を用いて行った。変異の解析は *MYEOV* と *NEGR1* 遺伝子を PCR で増幅してサンガー法により sequencing を行った。

##### < 短縮型 ALK の解析 >

神経芽腫細胞株 30 株を用いて、ウエスタンブロット法による ALK の発現解析を行ったところ、

NB-1 細胞株で 208KDa の短縮型 ALK を見出した。この変異蛋白に関して、機能解析を行った。

### C. 研究結果

#### <MYEOVとNEGR1 遺伝子の抽出と解析>

神経芽腫の UPD の検索で、11q13 増幅領域から MYEOV 遺伝子をみい出した。MYEOV の発現は 25 細胞株中 11 株 (44%) に、20 新鮮腫瘍中 7 腫瘍 (35%) にみられた。NB-19 株における MYEOV 遺伝子の siRNA 法による knockdown では、細胞増殖の著明な抑制がみられた。サンガー法による解析では変異はみられなかった。

1p31 領域から NEGR1 遺伝子をみい出した。この遺伝子は、進展例では著明な発現の低下がみられた。また外からの強制発現をさせると、著明な増殖の抑制がみられ、この遺伝子の発現は予後因子になりうると思われた。サンガー法による解析ではこの遺伝子の変異はみられなかった。

これらの結果より MYEOV と NEGR1 遺伝子は 11q31 増幅と 1p31 減少の標的遺伝子と思われた。

#### <神経芽腫細胞株 NB-1 における短縮型 ALK の検出>

NB-1 細胞株よりゲノム DNA を抽出し、SNP アレイを用いて ALK 領域のゲノム構造の解析を行ったところ、ALK 領域の高度増幅が検出された。増幅領域の中の ALK intron 1 から 4 に位置する連続する SNP (Chr2: 29, 911, 541 to 29, 912, 210) のシグナル低下が見出され、この領域内に切断点を有する欠失アレルが優位に増幅していることが推測された。また RT-PCR 解析およびサンガーシーケンスの結果 exon 2, 3 の in-frame deletion が確認された。これらの結果から、ALK intron 1 から 4 のゲノム上の欠失により exon 2, 3 の in-frame deletion が生じることが短縮型 ALK の要因である可能性が示唆された。

新鮮腫瘍 70 例における短縮型 ALK のスクリーニングでは、同様の転写産物は検出されなかった。ALK intron 1 から 4 のゲノム上の欠失を検証するために、exon 1 ~ 4 にプローブを設定し、サザンブロット解析を行った。その結果、NB-1 では exon 2 と 3 のバンドシグナルが exon 1 と 4 のシグナルに比べて低下していることが判明したが、正常コントロールではいずれのシグナルも同等の強度であった。またリアルタイム PCR を用いて、ゲノムの定量を行ったところ、intron 1 から 4 領域のゲノム量が exon 1 および 4 領域に比べて低下していた。以上より、ALK intron 1 から 4 のゲノム上の欠失が存在すると思われた。

#### <短縮型 ALK の機能解析>

短縮型 ALK を強制発現させた NIH3T3 細胞では、野生型 ALK と比べて強い自己リン酸化が検出された。下流分子の活性化の検討では、ERK および AKT のリン酸化は検出されなかったものの、STAT3 のリン酸化が検出された。またコロニーアッセイでは、野生型 ALK を発現する細胞と比べて短縮型 ALK を発現する細胞において有意なコロニー形成能が観察された。また、短縮型 ALK を発現する NIH3T3 細胞を移植したヌードマウスでは 21 日後に 100% の腫瘍形成がみられたが、野生型 ALK を発現する細胞を移植したマウスでは腫瘍は形成されなかった。ALK1174 変異陽性細胞を陽性コントロールとしたが、短縮型 ALK 発現細胞を移植した場合と腫瘍の大きさに有意差はみられなかった。5 匹のうち 3 匹のマウスでは肝臓、腎臓などに多発転移巣を形成していることが判明した。

### D. 考察

今回の解析により神経芽腫 NB-1 株で見出された短縮型 ALK は、新鮮腫瘍での頻度は少ないが、点突然変異や増幅に加えて神経芽腫における新たな活性型変異であることが明らかとなった。短縮型 ALK では exon 2 と 3 が欠失してい

るが、この領域は細胞外ドメインであり、リガンド結合部位に近接している。従って、exon 2と3の欠失によるリガンド結合部位周辺の構造異常が生じ、リガンドの結合を阻害している可能性が考えられた。ALKと同じ膜貫通型のチロシンキナーゼであるEGFR、RONおよびMETでも細胞外ドメインの欠失が報告されており、これらの短縮型キナーゼはリガンド非依存的に活性化されていることが判明している。EGFRやRONは、リガンド非依存的に二量体を形成し、下流のアダプター蛋白の活性化を促すことが報告されている。短縮型ALKの活性化のメカニズムは解明されていないものの、短縮型EGFRやRONと同様のメカニズムを有する可能性が示唆された。

#### E. 結論

これらの結果よりMYEOVとNEGR1遺伝子は11q31増幅と1p31減少の標的遺伝子と思われる、NEGR1遺伝子の発現は予後因子になりうると思われた。また、短縮型ALKは新たな活性型変異であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene*. 31 : 4667-4676, 2012
2. Gruber TA, Larson Gedman A, Zhang J, Koss CS, Marada S, Ta HQ, Chen SC, Su X, Ogden SK, Dang J, Wu G, Gupta V, Andersson AK, Pounds S, Shi L, Easton J, Barbato MI, Mulder HL, Manne J, Wang J,

Rusch M, Ranade S, Ganti R, Parker M, Ma J, Radtke I, Ding L, Cazzaniga G, Biondi A, Kornblau SM, Ravandi F, Kantarjian H, Nimer SD, Döhner K, Döhner H, Ley TJ, Ballerini P, Shurtleff S, Tomizawa D, Adachi S, Hayashi Y, Tawa A, Shih LY, Liang DC, Rubnitz JE, Pui CH, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR. An Inv(16)(p13.3q24.3)-Encoded CBFA2T3-GLIS2 Fusion Protein Defines an Aggressive Subtype of Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 22 : 683-697, 2012

3. Shimada A, Taki T, Koga D, Tabuchi K, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Adachi S, Kojima S, Hayashi Y. High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and FLT3-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol*. 96 : 469-476, 2012
4. Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 120 : 1485-1488, 2012
5. Kawashima N, Shimada A, Taketani T, Hayashi Y, Yoshida N, Matsumoto K, Takahashi Y, Kojima S, Kato K. Childhood acute myeloid leukemia with bone marrow eosinophilia caused by t(16;21)(q24;q22). *Int J Hematol*. 95 : 577-580, 2012
6. Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park

- MJ, Sotomatsu M, Tabuchi K, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 95 : 509-515, 2012
7. Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 26 : 1879-1898, 2012
  8. Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanezaki R, Park MJ, Kanno Y, Takahara T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. *Blood* 119 : 2608-2611, 2012
  9. Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia. *Blood* 119 : 2612-2614, 2012
  10. Inukai T, Kiyokawa N, Campana D, Coustan-Smith E, Kikuchi A, Kobayashi M, Takahashi H, Koh K, Manabe A, Kumagai M, Ikuta K, Hayashi Y, Tsuchida M, Sugita K, Ohara A. Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Brit J Haematol* 156 : 358-365, 2012
  11. Shiba N, Taki T, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 413-414, 2012
  12. Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 672-674, 2012
2. 学会発表
1. 滝田順子, 西村 力, 大久保純, 吉田健一, 星野諭子, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 先端的ゲノムスクリーニングを用いた難治性小児固形腫瘍における標的分子の探索. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
  2. 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 大久保純, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いた神経芽腫のエクソーム解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
  3. 大久保純, 滝田順子, 西村 力, 星野諭子, 吉田健一, 白石友一, 林 泰秀, 宮野悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いた Ewing 肉腫のエクソーム解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
  4. 柴 徳生, 市川 仁, 滝 智彦, 朴 明子, 嶋田 明, 田渕 健, 荒川浩一, 足立壮一, 堀部敬三, 林 泰秀. 発現アレイを用いた小児急性骨髄性白血病における、*NUP98-NSD1* 融合遺伝子の解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21

5. 大木健太郎, 大喜多肇, 清河信敬, 朴明子, 康勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地 陽, 小原 明, 林 泰秀. TCCSG の小児B前駆細胞型急性リンパ性白血病におけるCRLF2とIKZF1、JAK 遺伝子解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
6. 大木健太郎, 奥野はるな, 柴 徳生, 金澤崇, 朴 明子, 外松 学, 神谷尚宏, 小川千登世, 林 泰秀. 第2再発時に初めてMLL-AF4陽性となったB前駆型急性リンパ性白血病1例におけるクローン構造の検討. 第8回来た関東小児がんセミナー, 高崎, 2012.5.19
7. 土岐文彰, 山本英輝, 西 明, 鈴木則夫, 平戸純子, 畠山信逸, 新井 心, 大木健太郎, 朴 明子, 外松 学, 林 泰秀. 治療に難渋し救命し得なかった乳児進行神経芽腫の1例. 第23回群馬小児がん研究会, 前橋, 2012.8.24
8. 三谷幸代, 城 青衣, 嶋田 明, 柴 徳生, 林 泰秀, 市川 仁. 2 遺伝子の発現に基づく高リスク小児急性骨髄性白血病の同定. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.19
9. 倉田盛人, 後飯塚僚, 北村大介, 滝田順子, 林 泰秀, 北川正伸, 中村卓郎. BLNK欠損preB-ALLとB細胞分化におけるC/Ebpbの働き. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20
10. 星野諭子, 西村 力, 奥野友介, 樋渡光輝, 永田安伸, 吉田健一, 真田 昌, 白石友一, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫におけるエピジェネティック関連遺伝子の網羅的ゲノム解析, 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20
11. 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 田中洋子, 永田安伸, 滝田順子, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 真田 昌, 宮野 悟, 小川誠司, 林 泰秀. 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定, 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
12. 関 正史, 西村 力, 奥野友介, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 吉田健一, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーによる再発肺芽腫のエクソーム解析. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
13. 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 千葉健一, 田中洋子, 佐藤悠佑, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. SNP アレイをエクソーム解析を用いた横紋筋肉腫の初発・再発/転移巣のクローン比較. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
14. 樋渡光輝, 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 大久保淳, 永田安伸, 五十嵐隆, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いたユーズング肉腫発生の分子生物学的検討. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
15. Kiyokawa N, Matsumoto K, Iijima K, Hasegawa D, Oboki K, Kobayashi K, Okita H, Takada S, Asahara H, Mori T, Fukushima T, Saito M, Koh K, Hanada R, Tsuchida M, Manage A, Kikuchi A, Saito H, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Fusion gene-specific signature of microRNA expression in childhood ALL. 第74回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
16. Iijima K, Hasegawa D, Kiyokawa N, Kobayashi K, Okita H, Miharuru M, Mori, T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Gene expression profile related to prognosis of childhood ALL without fusion genes. 第

- 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
17. Park MJ, Oda M, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. IL-7R gene mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
  18. Oki K, Okita H, Kobayashi K, Shiba N, Park MJ, Sotomatsu M, Fukushima T, Koh K, Hanada R, Manabe A, Kikuchi A, Tsuchida M, Ohara A, Kiyokawa N, Hayashi Y. Analysis of CRLF2 and IKZF1, JAK, IL7R genes in pediatric B-precursor ALL treated on TCCSG protocol. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
  19. Shimada A, Olfat I, Xu Y, Goto A, Nagai T, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada Y, Hayashi Y, Ogawa S. JAK2 V617F mutation in pediatric myeloproliferative neoplasm. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
  20. Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Nagata Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole exome resequencing reveals novel gene mutations in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
  21. Okuno Y, Shiba N, Shiraishi Y, Yoshida K, Nagata Y, Sato Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Kanazawa T, Kudo K, Chiba K, Tanaka H, Ito E, Takita J, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Ogawa S. Clonal architecture and evolution of pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
  22. Takahashi H, Koh K, Kato M, Fukushima T, Inukai T, Kiyokawa N, Taki T, Saito M, Kajiwara M, Ogawa C, Maeda M, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Hanada R, Tsuchida M, Ohara A. Characteristics and prognostic impacts of structural chromosomal abnormalities in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21
  23. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 related gene expression signature is associated with a poor prognosis in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21
  24. 大木健太郎, 柴 徳生, 新井 心, 朴 明子, 外松 学, 清河信敬, 林 泰秀. 小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における clonal evolution の解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
  25. 関水匡大, 角南勝介, 中澤温子, 林 泰秀, 沖本由理, 齋藤明子, 堀部敬三, 鶴澤正仁, 森 鉄也. 進行期 T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫の染色体異常解析—JPLSG からの報告. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
  26. 関 正史, 西村 力, 星野倫子, 奥野友介, 白石友一, 吉田健一, 千葉健一, 田中陽子, 真田 昌, 加藤啓輔, 土田昌宏, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 先端のゲノム解析技術を用いた胸膜肺芽腫における発症分子機構の解明. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
  27. 朴 明子, 大木健太郎, 新井 心, 外松 学, 清河信敬, 小田 慈, 堀部敬三, 林 泰秀. MLPA 法を用いた T-ALL 遺伝子異常についての解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
  28. 西 眞範, 磯村直子, 野村優子, 柳井文男, 犬飼岳史, 渡辺 新, 林 泰秀.

t(17;19)(q22;p13.3)を含む染色体異常を呈したT細胞性急性リンパ性白血病の1例. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30

29. 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 加藤元博, 大木健太郎, 朴 明子, 金澤崇, 工藤寿子, 滝田順子, 加藤啓輔, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 花田良二, 真田 昌, 小川誠司, 林 泰秀. 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.1
30. 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 市川 仁, 足立壮一, 外松 学, 荒川浩一, 田淵 健, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病におけるGATA2遺伝子変異同定. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.1
31. 黒岩 実, 柴田祐充子, 岩崎維和夫, 林 泰秀, 鈴木則夫, 小原 明. 悪性胚細胞(奇形腫群腫瘍)の治療成績と問題点. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

神経芽腫における標準治療の確立と新規治療の開発に関する研究

分担研究；放射線療法の確立

研究分担者 副島俊典 兵庫県立がんセンター放射線部長

研究要旨

JNBSG HR07試験の放射線治療の品質管理を行った。その結果、概ねプロトコールに準じた治療法で治療されていることが確認された。治療法としても問題ないと考えられ、今後も同様の方針で放射線治療を行う妥当性を確認した。

A. 研究目的

高リスク神経芽腫の加療にあたって放射線治療は重要な治療法である。しかし、小児がんのひとつである神経芽腫は希少疾患であるがゆえに各施設の経験症例数が少なく、治療を適切に行えるかどうかは問題である。海外においてもInternational Society of Paediatric Oncology (Europe) Neuroblastoma Group (SIOPEN) の検討で、48%の症例で適切な放射線治療が行われていなかったという報告もあり、放射線治療を適切に行うことは治療成績を向上させる上で重要である。日本神経芽腫研究グループ (Japan Neuroblastoma Study Group; JNBSG) では多施設共同試験を行い、放射線治療に関しては登録症例の放射線治療データを提出していただき、放射線治療に関する品質管理を行なっている。この神経芽腫における標準治療の確立と新規治療の開発に関する研究においては、登録の終了したJNBSG HR07試験の放射線治療の品質保証を行うとともに、今後の放射線治療プロトコールについて検討した。

B. 研究方法

JNBSG HR07試験は高リスク神経芽腫に対して、寛解導入化学療法3-4コース後、手術を施行し、その後寛解導入化学療法2-1コース施行し、自家造血幹細胞移植を伴う大量化学療法を行った後に放射線療法を行うものである。放射線治療は原発巣へはGTVは導入化学療法後（大量化学療法前）の病巣体積とし、CTV=GTV+15mmとした。リンパ節転移のない症例では予防照射を行わず、照射線量は19.8 Gy/11回とし、肉眼的残存腫瘍または手術不能例に対しては、10.8 Gy を追加（合計30.6Gy）した。転移巣に関しては化学療法開始以前のI-123 MIBG シンチ、単純写真、骨シンチで陽性で、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の骨転移および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に対して19.8Gy/11回の放射線治療を行うものである。

JNBSGに登録された症例は50例で、このうち、死亡（3例）、PD（4例）、合併症（2例）、種々の理由での治療方法の変更（15例）などの理由で中止した24例、および放射線治療未施行4例を除いた22例を対象にPer Protocol Basedに検討した。

（倫理面への配慮）

JNBSGにおける臨床試験に関してはJNBSGにて倫理審査を実施し、各参加施設においては倫

理委員会もしくは治験審査委員会の承認を受けている。また、放射線治療に関する資料の提出にあたってはID、氏名などの個人情報情報はマスクして提出してもらった。

C. 研究結果

全例において放射線治療は臨床試験のプロトコールに準じた治療をこなしていると判断された。

今回の症例において再発は11例に認められた（骨5例、骨髄3例、中枢神経系2例、リンパ節2例、後腹膜1例）。転移巣への放射線治療が行われた症例で再発した症例は5例あった。初回照射部位と再発部位は、眼窩に照射した症例の再発部位が骨髄、L5-S1に照射した症例の再発部位が中枢神経系、縦隔リンパ節に照射した症例の再発部位が中枢神経系、鎖骨前頭部側頭部に照射した症例の再発部位が鼠径リンパ節脛骨骨髄、リンパ節に照射した症例の再発部位が鼠径リンパ節、脛骨、骨髄であった。初回治療時の照射部位への再発症例はなかった

D. 考察

現時点での評価では原発部位の再発はなく、原発巣への照射線量は、残存病変の無い症例が19.8Gy、残存病変のある症例が30.6Gyの照射線量は有効と考えられた。また、転移再発の有無に影響を与える因子を特定できず、転移巣への適応決定および照射線量も問題無いと考えられた。今回の検討では放射線治療に関して概ねプロトコールに準じた治療を行なっていると判断した。

しかし、JNBSG HR07試験のプロトコールは2次元の放射線治療計画も許容した記載方法であった。現在大部分の放射線治療施設では3次元の放射線治療が施行されており、今後3次元治療計画による記載にすべきと考えられる。また、プロトコール逸脱についての記載がなかった。そのためプロトコールに逸脱しているかどうかの評価が科学的に行うことができなかった。今後プロトコール逸脱の記載を明記すべきと考えられた

また、再発部位などの各施設からの報告が正確であるかどうかの検討がなされていなかった。今後データのクリーニングなどをどのように行うか検討すべきである。以上の問題があるものの、放射線治療の方針としては変更点がなく、次期のプロトコールも同じ照射線量、転移巣の照射部位決定で行う方針である。

E. 結論

JNBSG HR07試験のプロトコールを放射線治療の

品質管理を行った結果、種々の問題が明らかになった。今後次期プロトコールに改善していく予定である。

F. 健康危険情報

分担研究報告書につき不記載

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし