

JWiTS 2015 病理診断部門の目標

- 報告書返送までの日数短縮
- 化学療法後の腫瘍の病理所見の評価をSIOPIに準じて継続して施行
- 腎芽腫blastemal predominant typeにつきデータをまとめる

JWiTS 2015 病理診断部門からのお願い

- 病理スライドの送付率目標→100%
- 正確なStageの把握もできる資料・スライド
- 化学療法後の腫瘍の病理スライドも必須

* 上記について引き続き宜しくお願い致します

Dome JS, et al. On behalf of the COG Renal Tumors Committee.
Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Renal tumors.
Pediatr Blood Cancer. 2012 Dec 19. doi: [10.1002/pbc.24419](https://doi.org/10.1002/pbc.24419).

JWiTS附随研究

シスタチンCによる晩期腎障害評価

京都府立医科大学大学院医学研究科 小児発達医学
家原知子、勝見良樹、大内一孝、細井 創

背景

- 小児腎腫瘍後の患者では腎機能低下を散見し定期的な腎機能の評価が必須である。一般的に腎機能評価には糸球体濾過率(GFR)の代用としてクレアチニンクリアランス(CCr)が使われることが多い。しかし、24時間CCrは時間と手間がかかり、小児では正確な蓄尿は必ずしも施行できず、GFRを反映するCCr以外の簡便なマーカーの存在が期待される。
- シスタチンCは全身の有核細胞から産生分泌され、分泌量は環境変化・性別・生理的な変動を受けない。上位尿管で再吸収されアミノ酸に代謝されるので血中シスタチンCは腎機能低下症例に対して3月に1回算定可能

長期生存患者の合併症

症例	年齢	罹患側	最終診断名	病期	化学療法	放射線療法 (Gy)	長期合併症			
							尿異常 血圧異常	血清Cre (mg/dl)	血清シスタチンC (mg/L)	予想GFR (ml/min)
1	1y	左	Nephroblastoma	I	なし					
2	3y	右	Nephroblastoma	II	NWTS-4K		血尿、蛋白尿 高血圧			
3	9y	右	Nephroblastoma	IV	NWTS-4J	10.8	蛋白尿			
4	5y	右	Nephroblastoma	III	NWTS-4		貧血	grade1	0.63	138.2
5	3y	左	Nephroblastoma	II	JWITS-1			grade2	0.7	121.5
6	2y	左	Nephroblastoma	I	JWITS-2		蛋白尿	grade1	0.97	81.5
7	2y	右	Nephroblastoma	II	JWITS-2					
8	11m	左	Nephroblastoma	I	JWITS-2					
9	3y	左	Nephroblastoma	I	JWITS-2				0.89	90.5
10	0m	左	Nephroblastoma	I	JWITS-2	塞栓術				
11	3m	左	Nephroblastoma	I	JWITS-2				0.72	117.4
12	4y	右	Nephroblastoma	I	JWITS-2					
14	2y	左	Nephroblastoma	I	JWITS-2				0.87	93.1
15	5m	両側	Nephroblastoma	V	JWITS-2		蛋白尿		0.98	80.4
16	11m	右	Nephroblastoma	II	JWITS-2				0.82	100.1
17	6y	右	Nephroblastoma	III	JWITS-2	10.8			1.15	66.1
18	2y	左	CCSK	II	NWTS-4	20.0	血尿		0.46	203.2
19	2y	左	CCSK	III	JWITS-2	10.8		grade1	0.87	93.1
20	1m	左	GMN	I	なし			grade2	1.12	68.3
26	11y	右	RCC	I	なし		血尿			

(gradeはCTCAE Ver4.1による)

<背景>

1. ウイルムス腫瘍に代表される小児腎腫瘍の治療成績は画期的に向上した。
2. 今後は、晩期合併症を見据えた対応が期待される。そのために、Childhood Cancer Survivor (CCS)の晩期合併症の発生率を把握するための体系的な予後調査を行うことが必要である。
3. 小児腎腫瘍後の患者はほとんどが片腎であり、腎障害の出現について特に注意が必要である。

<目的>

1. 体系的フォローを行うことで、小児腎腫瘍の治療後の腎障害を有する患者を正確に把握することを目的とする。
2. 血清シスタチンCを含めた複数の腎機能に関するマーカーを定期的・体系的に測定していくことで治療中および治療後の小児腎腫瘍患者の腎障害をより早期に検出できるかを検証する。

<対象>

JWITS登録の治療中、および治療後外来へ定期的に通院中の患者。

<期間>

本申請が承認(2012年2月)されてから、5年間の予定。
測定結果は1年に1度研究事務局からデータ提出の依頼を行う。

<評価項目>

送付先: FAX 03-5727-1267 (成育医療センター)
小児腎臓病患者の晩期腎障害評価 経過報告書

JWITS登録番号	
測定年月日	年 月 日
測定時の身長 (cm)	
測定時の体重 (kg)	
測定時の血圧 (mmHg)	/
測定時の治療	薬物療法・輸液療法・水分制限・その他 ()
測定時の投薬	有 () ・ 無
ヘモグロビン (Hb) (g/dl)	
ヘマトクリット (Ht) (%)	
BUN (mg/dl)	
Cre (mg/dl)	
血清シスチンC (mg/L)	
血清シスチンC測定業者 血清シスチンC測定法	測定業者 (SRIL・三菱化学・その他) 測定法 (金コロイド・ラテックス・ネフロメリー)
pH	
尿蛋白	- ・ ± ・ + ・ 2+ ・ 3+
尿潜血	- ・ ± ・ + ・ 2+ ・ 3+
尿中Cre (mg/dl)	
尿中NAG (U/L)	
尿中α1mG (mg/L)	
尿中β2mG (μg/L)	
24時間CCr (ml/min/1.73m ²)	未実施 ・ 実施 ()
MAG3Cl (ml/min/1.73m ²)	未実施 ・ 実施 ()

〈検討事項〉

1. 他の腎障害マーカーと比べて血清シスタチンC異常を示す症例数は有意に多いか？
2. 手術+化学療法治療群と手術+化学療法+放射線療法治療群間の血清シスタチンC異常を示す症例の比率の差は？
3. 血清シスタチンC値の異常を来した症例のその後の経過は？（複数回の調査によって推移を観察する）

Findings of Report in 2013

- 16施設, 101症例, シスタチンC 26症例

	Total	Cys C : 26/101 (26%)	
		normal	high
number of cases	101	12 (46%)	14 (54%)
Dagnosis			
Wilms	71	8	9
CCSK	7	1	3
RTK	4	0	0
CMN	4	0	1
Stage			
1	30	1	4
2	24	3	1
3	13	1	2
4	8	1	1
5	7	0	1
Ope			
extirpation	2	0	0
nephrectomy	81	6	12
chemo			
-	4	0	1
+	78	5	11
radiation			
-	55	2	6
+	25	3	6

Findings of Report in 2014

- 13施設, 33症例, シスタチンC 22症例

	Cys C : 22/33 (67%)	
	normal	high
number of cases	4 (18%)	18 (82%)
Diagnosis		
Wilms	3	13
CCSK	1	3
RTK	0	1
CMN	0	1
Stage		
1	2	6
2	1	6
3	1	2
4	0	2
5	0	2
Ope		
extirpation	0	1
nephrectomy	4	17
chemo		
-	0	1
+	4	17
radiation		
-	2	14
+	2	4

放射線治療の有無とシスタチンC

	Cyst. C in 2013		Cyst. C in 2014	
	normal	abnormal	normal	abnormal
ope + chemotherapy	2	5	2	13
ope + chemotherapy + radiation	3	6	2	4
計	5	11	4	17

放射線治療の有無とシスタチンCの異常に関連なし
(Fisher's exact probability test)

考察

- NWTSGの報告では、終末期腎不全発生率は0.6-12%である。
J Urol 2005; 174: 1972-5
- 本付随研究でのシスタチンCの異常率は54-82%と高率である。
- シスタチンC異常が終末期腎不全の早期予後因子となり得るのか、症例の蓄積と今後の長期予後調査の継続が必要である。
- 放射線治療の有無とシスタチンC異常には関連が認められなかったが、症例の集積による再検討が必要である。

年齢、身長、体重、血圧

<血液検査>

ヘモグロビン、ヘマトクリット、BUN、Cre、シスタチンC

<尿検査>

尿一般検査(尿pH, 尿蛋白, 尿潜血)、Cre、NAG、 α 1mG、 β 2mG

CCr (24時間蓄尿する機会のある患者のみ)

<画像検査>

^{99m}Tc -MAG3クリアランス (レノグラムを撮像する機会のある患者のみ)

本年のアンケートは締め切りとなっておりますが、

随時受け付けております。

ご協力をよろしくお願いいたします。

家原知子 iehara@koto.kpu-m.ac.jp

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

標準リスク肝芽腫に対するシスプラチン単剤療法による国際共同臨床試験
シスプラチンの副作用の聴力障害を軽減する薬剤デキサトールの有効性を検証する
国際共同ランダム化比較試験 JPLT-3—SIOPEL6
広島大学自然科学研究支援開発センター教授 檜山英三

標準リスク肝芽腫に対するシスプラチン単剤療法によるJPLT3-S臨床試験
帝京大学医学部附属溝口病院小児科教授 井田孔明
千葉県こども病院小児外科主任医長 菱木知郎
埼玉県立小児医療センター血液腫瘍科科長兼部長 康 勝好
神奈川県立こども医療センター臨床研究所・医療局病理診断科部長 田中祐吉
獨協医科大学越谷病院放射線科教授 野崎久美子
日本医科大学小児科教授 前田美穂

要旨

わが国における標準リスク肝芽腫患者を対象として、国際小児肝腫瘍戦略グループ（SIOPEL）とともにシスプラチンの内耳毒性軽減のためのチオ硫酸ナトリウム（デキサトール）の有効性を検討する国際共同ランダム化比較試験 JPLT-3—SIOPEL6 を施行し、予定登録数に達し、登録を終了した。また、これと平行して、このリスク群での標準的な治療となっているシスプラチン単剤療法の有効性と安全性を本邦症例にて検討する目的で、平成 25 年 3 月より JPLT3-S 臨床試験「初診時遠隔転移のない小児肝芽腫に対するリスク別多施設共同臨床第Ⅱ相試験」を開始した。平成 27 年 1 月の時点で 17 症例の患者登録があり、重篤な有害事象はなく臨床試験が進んでいる。

A. 研究目的

国際共同ランダム化比較試験 JPLT-3—

SIOPEL6：シスプラチンの内耳毒性軽減のためのチオ硫酸ナトリウム（デキサトール）の有効性を検討する。

JPLT3-S: 標準リスク肝芽腫患者に対するシスプラチン単剤療法の有効性と安全性を検討する。

B. 研究方法

標準リスク肝芽腫は、次のように定義している。
すなわち、組織学的に肝芽腫と診断され、

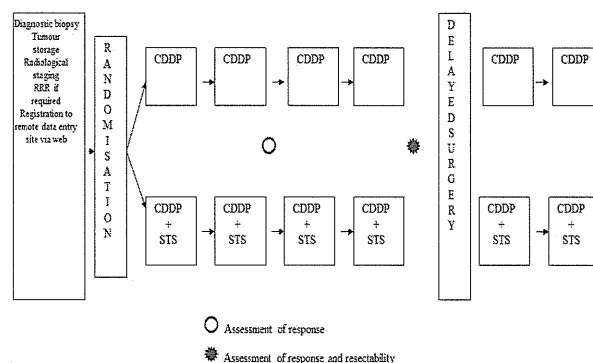


図 1. SIOPEL6-JPLT3 プロトコル概略図

CDDP: シスプラチン単剤を 2 週間隔で投与する。
STS: チオ硫酸ナトリウムの有効性は、上記 2 群間で 3.5 歳の聴力検査を行う。

PRETEXT 分類 I, II, III でかつ、PRETEXT の追加因子として、M1, P2, V3, E, H, N 因子のいずれもないもので、血清アルファフェトプロテインが 100 ng/ml 以上の症例としている。

国際共同ランダム化比較試験 JPLT-3—

SIOPEL6 は、日本小児肝癌スタディグループ (JPLT) に属し (JPLT 施設)、施設倫理委員会 (IRB) で本試験の承認を得た施設で行われる国際共同の多施設共同第 II 相臨床試験で、本邦からは 3 施設が参加した。標準リスクに属する肝芽腫症例で、シスプラチンの内耳障害予防のためにチオ硫酸ナトリウムの併用効果は無作為割付の 2 群で検討する試験である (図 1)。目的は、シスプラチン化学療法によって生じる難聴を軽減する STS の有効性の評価であり、これに関連して、二次的な目的として、

- STS のシスプラチンに対する反応や生存率への潜在的な影響の注意深いモニタリング
- STS とシスプラチンの併用の短期間と長期間の耐用性の評価
- 将来のリスクに適合した管理のために標準リスク肝芽腫の生物学的、画像診断、病理学的形態の評価と判定
- シスプラチン-DNA 化合物の形成に STS が及ぼす作用の検証
- 中毒性難聴および腎毒性の発生に関する潜在的な遺伝因子の分析のための患者の DNA 収集

があげられている。プライマリーエンドポイントは試験期間の終了時あるいは 3.5 才のどちらかの遅い時期での Brock grade 1 の聴力障害の頻度、セカンダリーエンドポイントは、術前化学療法への反応性、完全切除率、完全寛解率、無イベント生存期間(EFS)、全生存率(OS)、CTCAE v 3.0 によるグレード別毒性、長期の腎クリアランスである。目標症例数は年間 35 例で、3.8 年で 115

人 (評価可能 102 人) を予定して 2009 年から開始され、本邦は 2011 年末から参画した。

JPLT3-S 臨床試験は、JPLT に属した JPLT 施設で上記 SIOPEL6 試験を行わず、JPLT3-S 試験の施行について施設倫理委員会 (IRB) の承認を得た施設で行われる多施設共同第 II 相臨床試験である。肝芽腫のうち、遠隔転移がなく国際共通分類で標準リスクに分類される患者を対象とするシスプラチン単剤の単アームの臨床試験である (図 2)。本研究では、さらに年齢因子をリスクファクターと考え、3 歳未満の症例のみを適格とした。プライマリーエンドポイントは 3 年無増悪生存割合、セカンダリーエンドポイントは、シスプラチン単独療法のプロトコール完遂率、術前化学療法への反応性、完全切除率、手術合併症割合などである。目標症例数は年間 15 例で、登録期間 5 年、追跡期間 3 年の計 8 年間の研究予定である。各施設では、臨床試験を実施する前に、臨床試験に参加することで予想される利益と可能性のある不利益、個人情報保護、遺伝子解析とサンプルの保存などについて明記された同意説明文書 (またはアセント文書) を用いて、ご家族

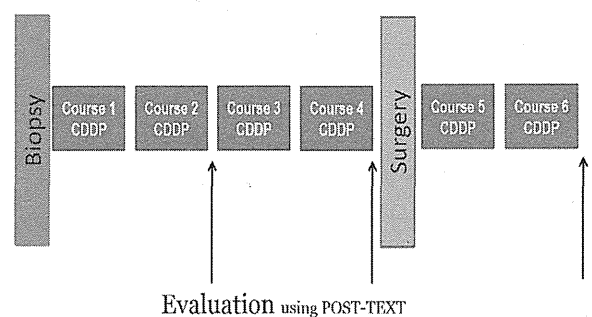


図 2: JPLT3-S プロトコール概略図

CDDP: シスプラチン単剤を 2 週間隔で投与する。PRETEXT1 の症例は、一期的切除を許容している。その場合は術後に 4 コース施行する。

2、4 コースと治療終了時が画像診断を行い、有施行を検証する。

(あるいは患者本人)の臨床研究への参加の同意(またはアセント)を取得する。臨床データは case report form (CRF) によってデータセンターに送られ集計している。

C. 研究結果

国際共同ランダム化比較試験 JPLT-3—SIOPEL6 は、予定よりやや遅れたものの平成 26 年 12 月にほぼ目的症例に到達したため、12 月末日をもって症例登録を終了した。本邦から、3 施設計 5 例が登録されたこととなり、ほぼ 5 例共に治療は終了し、現在経過観察中である。5 例共に、現時点では腫瘍なし生存で、1 例が 3 歳半に到達したために聴力検査を施行したところである。

JPLT3-S 試験は、平成 27 年 1 月の時点で、JPLT 施設 119 施設のうち IRB の承認が得られた施設は 34 施設であった。17 例の患者が登録された。年間約 15 例の登録例をも込んでいたがやや下回った登録数であった(図 3)。プロトコル治療中が 4 例、治療完了が 11 例、治療中止が 2 例であった。プロトコル中止の 2 例の内訳は、標準リスクで治療を開始したが中央画像診断で中間リスクと判定されたもの 1 例と、治療途中の画像診断で腫瘍の増悪が認められた 1 例であった。治療関連死や治療終了後 30 日以内の死亡、および CTCAE ver.4 における Grade4 の非血液

毒性などの重篤な有害事象は認められなかった。

D. 考察

従来、本邦 (JPLT)、欧州 (SIOPEL)、北米 (COG) がそれぞれ独自に多施設共同研究を行ってきたが、2009 年に 3 者が協同して今後の小児肝がんの臨床試験に取り組むためにデータベースを作成することで合意し、その結果に、共通のリスク分類が提唱されるに至った。このリスク分類に基づいて、標準リスクの肝芽腫に対して、初めて日本と欧州が協同で、国際共同ランダム化比較試験 JPLT-3—SIOPEL6 を行ったのはじめての試みである。日本が欧州のプロトコルに参画した形となったが、過去 10 年単位で臨床試験を行ってきた経緯を考えると、3 年少しでの症例登録の終了はかなり短縮できたといえる。今後は、日米欧の 3 極がお互いに連携し、効率良く成果を出し、患者に還元できる臨床試験体制の構築が望まれる中、有意義な第一歩となったと考えられた。

また、欧州の SIOPEL3 データを本邦で追従する形である JPLT3-S 試験は、患者登録数は予想よりも少なめであった。施設倫理委員会の承認数が 34 施設と少ないことがその原因と考えられた。治療はほぼプロトコルにしたがって行われおり、重篤な有害事象は発生していなかった。今後も患者登録を継続し、症例数を増やして解析を行うことが必要である。

E. 結論

SIOPEL6-JPLT3 の国際共同臨床試験は、終了がやや遅れたものの予定症例数に到達し、本年 12 月をもって登録終了とした。また、JPLT3-S 試験では登録患者数は少ないものの、JPLT3-S 臨床試験はおおむね順調に進んでいる。今後も臨床試験を継続する。

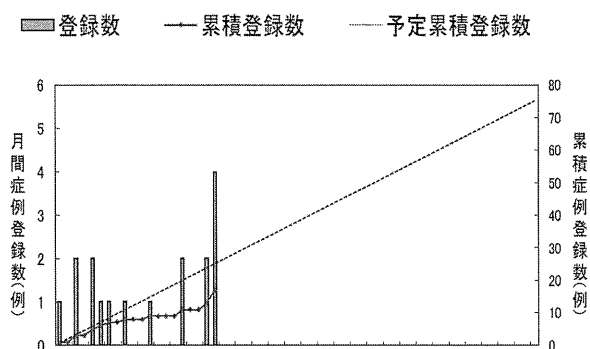


図 3 : JPLT3—S プロトコル症例登録状況

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiyama E. Pediatric Hepatoblastoma: diagnosis and treatment. *Translational Pediatrics*, in press

2) Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, Häberle B, Malogolowkin MH, Meyers RL.

Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy.

Curr Opin Pediatr. 2014 26:19-28. doi:

10.1097/MOP. 0000000000000046.

2. 学会報告等

1) JPLT3-S 臨床試験の進捗状況について、平

成 27 年 1 月 25 日に行われた JPLT 施設代表者会議で報告した。

2) Hiyama E. et al. OUTCOME AND MORBIDITY OF PRIMARY RESECTION OF HEPATOBLASTOMA IN JPLT-1 AND 2 PROTOCOLS. 46th Congress of the International Society of Pediatric Oncology (SIOP), Toronto, Canada, October 23. 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（ノン・ハイリスク群に対する臨床研究の実施）

新規臨床試験デザインの開発に関する研究

担当責任者 手良向 聡 京都府立医科大学 大学院医学研究科生物統計学 教授

研究要旨：小児がんなどの希少疾病に対する多くの臨床試験は2値エンドポイントを用いた単群試験である。この設定において、私たちはベイズ流適応的デザイン（予測標本サイズ選択デザイン、PSSD: predictive sample size selection design）およびその拡張版を提案した。このデザインは、無益性または安全性による試験の早期中止のための中間解析、標本サイズ選択を許容し、効率的かつ柔軟性の高いデザインとして特に探索的臨床試験において有用である。

A. 研究目的

本研究の目的は、2値エンドポイントを伴う探索的単群臨床試験において、効率的かつ柔軟性の高い臨床試験デザインを提供することである。

B. 研究方法

2種類の事前分布（デザイン事前分布、解析事前分布）を用いるベイズ流の方法により、試験開始前に標本サイズを決定する。その際、臨床的デザイン事前分布に加えて、懐疑的デザイン事前分布を用いて、2つの標本サイズ（NおよびNmax）を決定する。

試験開始後、中間モニタリングを行い、効果発現確率が低い場合は早期中止を行い、必要に応じて標本サイズの選択（NまたはNmax）を行う。中間モニタリングおよび標本サイズの選択には、解析事前分布に基づくベイズ流予測確率を用いる。また、有効性に加えて安全性を同時に（より頻回に）モニタリングすることも可能である。

C. 研究結果

シミュレーション研究により、頻度論的な動作特性を確認したところ、多くの状況において、第I種、第II種の過誤確率をそれほど増大させることなく、期待標本サイズを減少させることが示された。また、安全性モニタリングを加えた拡張版デザインでは、検出力を大きく低下させることなく、有効性の劣る、または安全性に問題のある治療を早期に中止させることが可能であった。

D. 考察

提案したデザインは、標本サイズ決定における不確実性を考慮して、試験途中で標本サイズを見直すという適応型デザインである。今まで提案されたデザインにはない特長を有しており、効率的かつ柔軟性の高いデザインとして有用と考える。

E. 結論

今後、本デザインを実際の臨床試験に適用

し、その有用性について実地で検証していく必要がある。また、本デザインを生存時間エンドポイントを用いた単群試験に拡張していく予定である。

G. 研究発表

1. 手良向聡. 臨床試験デザイン. 京都府立医科大学雑誌 2014;123:769-777.

該当なし

2. 学会発表

1. 手良向聡. ベイズ流標本サイズ設定. 医学統計研究会特定主題シンポジウム2015「臨床評価におけるBayes流接近法」(東京). 2015.2.7.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
（分担）研究報告

ノン・ハイリスク群小児悪性固形腫瘍の安全性と治療後QOLの向上への新たな標準治療法開発のための多施設共同臨床研究
ゲノム・病理・血清リスク分類による評価に関する研究

研究分担者 上條 岳彦 埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所長

研究要旨

今年度から埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所は、JNBSGの分子診断・検体センターとして解析をスタートした。2015年2月25日までにJNBSG32症例を受け付け、29例を解析した。分子診断のリスク分類として、MYCN qPCR, MYCN 2-color FISH, DNA含量解析を行い、さらに11qLOH解析を施行する体制を整備した。

A. 研究目的

JNBSGにおける低・中間リスク神経芽腫プロトコールは、現行のNB-02（中間）およびNB-03（低）プロトコールが進行中であり、次期低リスクプロトコールは「低リスク群神経芽腫に対する無治療経過観察」である。このリスク分類には分子診断としてMYCN qPCR, MYCN 2-color FISH, DNA含量解析、11qLOH解析が必要となる。本研究ではこの分子診断を円滑に推進し、余剰検体を適切に保管して、臨床研究・付随研究を支援することを目的とする。

B. 研究方法

1. MYCN qPCRはMYCN遺伝子を増幅し、FAM-TAMURAプローブでラベルして解析する。NAGK遺伝子をVIC-TAMURAプローブラベルで解析し、MYCN値をNAGK値で標準化する。
2. MYCN 2-color FISHはLLSI N-MYC (2p24)/CEP Dual color ProbeSetを使用し、蛍光顕微鏡で鏡検する。
3. DNA含量解析は、PI染色後にBD

FACSCalibur™を用いて解析する。

4. 11qLOH解析は、アジレント社のSureScanマイクロアレイスキャナを用いて解析する。

（倫理面への配慮）

全ての検体は臨床各施設において連結可能匿名化されて埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所に送付され、解析後に結果を匿名化番号にて報告している。研究者の説明に基づき自由意思により研究に参加する者のみを研究対象とする。本研究はヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省告示）」に従って実施する。

本研究計画遂行に当たっては「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日文科科学省・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）（平成20年12月1日

一部改正)」を遵守して実施する。また、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に該当する研究を包含する研究申請を行い、承認済みである。

C. 研究結果

2014年11月17日からJNBSGの分子診断・検体センターとして解析をスタートして、2015年2月25日までにJNBSG32症例を受け付け、29例を解析した。解析中が3例である。低・中間リスク該当症例は11/29症例であった。解析結果は、MYCN コピー数等倍 11例であった。DNA含量では diploidy 6 / 11例、Diploidy+Hyperdiploidy 4 / 11例、未検査 1 / 11例を示した。

D. 考察

2014年11月17日からJNBSGの分子診断・検体センターとして解析をスタートし、順調に分子診断を行っている。

次期の低リスクプロトコールは「低リスク群神経芽腫に対する無治療経過観察」であり、中間リスクプロトコールは現状のプロトコールの継続が検討されている。いずれにしても、リスク分類にINRG分類を用いて国際標準化を検討することから、11qLOH解析を円滑に行う必要があり、マイクロアレイを使用して他のゲノムリスクの判定と共に行っていくことを検討していく。

今後も神経芽腫低・中間リスク症例の円滑な臨床試験の推進を目指して、ゲノム・病理リスク分類における分子診断を順調に行っていくことを継続したい。

E. 結論

今年度から埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所は、JNBSGの分子診断・検体センターとして解析をスタートした。2015年2月25日までにJNBSG32症例を受け付け、29例を解析した。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T(corresponding author).

Novel 1p tumour suppressor

Dnmt1-associated protein 1 regulates

MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway.

Eur J Cancer. 2014, 50:1555-65.

1-2. Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y.

RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients.

Cancer Lett. 2014

2. 学会発表

第56回小児血液・がん学会 「多診療科医師合同シンポジウム 難治性固形腫瘍を考えるー基礎から臨床まで：神経芽腫」

神経芽腫の基礎生物学 Basic Biology of Neuroblastoma

上條岳彦

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記なし。

ノン・ハイリスク群小児悪性固形腫瘍の安全性と治療後QOLの向上への新たな標準治療法開発のための多施設
共同臨床研究

ゲノム・病理・血清リスク分類による評価

研究分担者 高木正稔（東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 講師）

研究要旨： ノンハイリスクの神経芽腫を同定するための方法について、ゲノム、病理学的観点から検討を行った。神経芽腫病理組織を検討し、ステージI、IIの腫瘍ではDNA損傷応答機構の活性化が起こっていることが明らかとなった。またステージIII、IVではDNA損傷応答機構の活性化が認められない症例が多く、DNA損傷応答機構のキープレーヤーであるATMの欠損が認められる症例があった。これは従来から報告されている神経芽腫における11q欠損例にあたった。MYCN増幅は神経芽腫の予後不良因子であるが、それを同定するための簡便な方法を確立した。

A. 研究目的

ノンハイリスクの神経芽腫を同定するための方法について、ゲノム、病理学的観点から検討を行う。で、ATMは毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (AT) の責任分子でDNA損傷応答において中心的な役割を持つ分子である。神経芽腫でしばしば欠失が報告されている染色体11qに位置する。神経芽腫のリスクとDNA損傷応答がどのような関係にあるか病理学的な検討を行う。またゲノムレベルでATMの異常について検討する。MYCN増幅は神経芽腫の予後不良因子であることが知られている。MYCN増幅はサザンブロット、FISH法などにより診断されるが、検出方法が煩雑であることが難点である。デジタルPCRをもちいてより簡便なMYCN増幅の検出方法を確立する。

B. 研究方法

神経芽腫病理組織を用い ATM のリン酸化を指標に DNA 損傷応答を免疫組織染色により検討した。

腫瘍 DNA を用いて、マイクロサテライト解析

により ATM の欠損を検討した。

デジタル PCR で Evergreen 色素を用いて MYCN増幅を検出した。

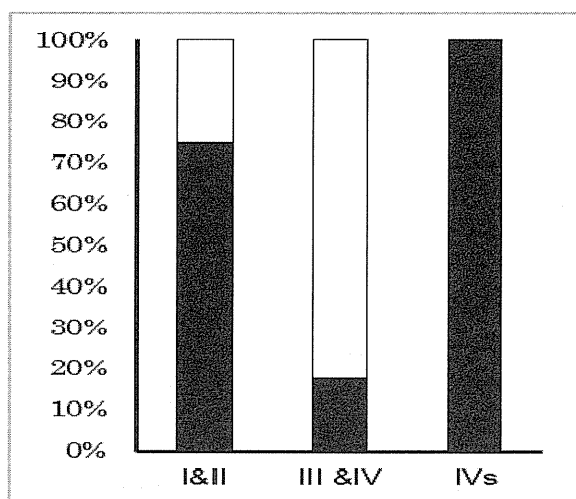
（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。

C. 研究結果

DNA損傷応答機構が起こると、ATMのリン酸化が起こることが知られている。このATMのリン酸化を指標に、DNA損傷応答の活性化をモニタリングすることができる。25例の神経芽腫由来組織をATMリン酸化特異抗体で免疫組織染色したところ、ステージI、IIの腫瘍ではATMのリン酸化が認められ、DNA損傷応答機構の活性化が起こっていることが明らかとなった。一方ステージIII、IVではATMのリン酸化の認められない例が多く、DNA損傷応答機構の活性化が起こっていない例が多いことが明らかとなった（図1）。また一部の症例でATMの発現量自体も減弱していた。

図1

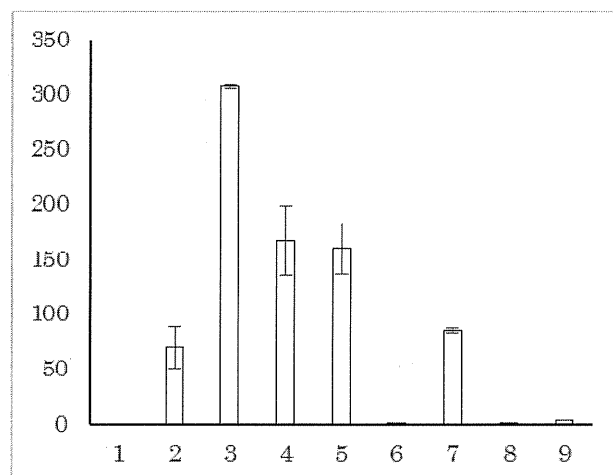


黒色のカラムはATMのリン酸化が起こっていた例の割合、白糸のカラムはATMのリン酸化が認められなかった例の割合

いくつか神経芽腫細胞株についてFISH法を用いてATM領域の欠失を検討したところ、NMB、SK-N-AS、NGP、SK-N-DZでATM領域の欠失があることが明らかとなった。また78例の神経芽腫検体について、マイクロサテライト解析を用いてATM領域の解析を行った。その結果、14.1%(11/78例)にATM領域の欠失がみられた。そのうち、予後不良とされているステージIII、IVにおいては22.2%(10/45例)と高い割合で欠失していることが明らかとなった。

デジタルPCRを用いて正常人末梢血由来DNAおよび、MYCN増幅が既知の神経芽腫細胞株IMR32、CHP134、SK-N-BE、NMB、SK-N-DZおよび、MYCN増幅のない既知の神経芽腫細胞株SK-N-AS、NB69、NBL由来DNAを用いてMYCN増幅を検討した。既報の結果と同様にMYCN増幅をデジタルPCRで検出することができた(図2)。

図2



1;正常、2; IMR32、3; CHP134、4;SK-N-BE、5;NMB、6;SK-N-AS、7;SK-N-DZ、8;NB69、9;NBL

D. 考察

11番染色体上のATM遺伝子が、神経芽腫の進行や予後を決定する上で重要な役割を担っていると考えられる。

神経芽腫の予後推定にはMYCN増幅を検出することが重要である。MYCN増幅はサザンブロット、FISH法などにより診断されるが、検出方法が煩雑であり、結果を得るまでに時間がかかることが難点である。デジタルPCRをもちいてより簡便なMYCN増幅の検出することができた。本方法であれば検体受領から12時間以内に解析結果を得ることができる。また費用も比較的安価で、技術的難な難易度も低い。本方法を発展させ予後不良因子として知られる11q欠損や17q増幅を同時に検出できれば、よりの確なノンハイリスク・ハイリスクの神経芽腫の分子診断が行えると考えられる。

E. 結論

ノンハイリスク神経芽腫でDNA損傷応答の活性化がみられた。

11q欠損のあるハイリスク神経芽腫でATMの

欠損が認められた。

MYCNの増幅がデジタルPCRで簡便に検出することができた。

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 根本佳乃, 玉一博之, 西井理菜, 土田里香, 宮本智史, 斎藤正博, 清水俊明, 花田良二, 金子英雄, 深尾敏幸, 小山高敏, 大平美紀, 中川原章, 水谷修紀, 高木正稔. 神経芽細胞腫におけるATMの機能喪失. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会 2014年11月28日-11月30日 岡山
2. 根本佳乃, 玉一博之, 西井理菜, 土田里香, 宮本智史, 斎藤正博, 清水俊明, 花田良二, 金子英雄, 深尾敏幸, 小山高敏, 大平美紀, 中川原章, 高木正稔, 水谷修紀. 神経芽腫におけるATMの機能喪失. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日-27日 横浜
3. 根本佳乃, 西井理菜, 土田里香, 花田良二, 大平美紀, 中川原章, 水谷修紀, 高木正稔. 神経芽細胞腫におけるATMの機能喪失. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日-27日 横浜
4. 西井理菜, 根本佳乃, 大平美紀, 中川原章, 水谷修紀, 高木正稔. 神経芽腫における神経分化に關与するC11orf65の機能解析. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日-27日 横浜
5. 西井理菜, 根本佳乃, 大平美紀, 中川原章, 水谷修紀, 高木正稔. 神経芽腫における神経分化に關与するC11orf65の機能解析. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日-27日 横浜

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告

ノンハイリスク神経芽腫の治療反応性関連因子に関する研究

滝田順子 東京大学大学院医学系研究科 小児科 准教授

研究要旨

ノンハイリスク神経芽腫の治療反応性関連因子を同定するために、442例の検体において、既知の神経芽腫関連遺伝子およびゲノムコピー数の情報をもとに genetic landscape の作成を試みた。その結果、MYCN、ALK の異常、はノンハイリスク群の治療の反応性不良と関連する因子である可能性が示された。

A. 研究目的

ノンハイリスク神経芽腫の治療反応性関連因子を同定するために日本神経芽腫研究グループに登録された症例を含む442例の大規模検体において神経芽腫関連遺伝子の target sequencing およびゲノムコピー数の網羅的解析を行う。

B. 研究方法

ターゲット遺伝子として、ALK、ATRX、RAS 関連遺伝子、PHOX2B、ARID1A/B の計10個を抽出し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq2000) を用いて、deep sequencing を施行した。網羅的ゲノムコピー数の解析には、SNP アレイ CNAG/AsCNAR を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、東京大学の倫理審査委員会にて審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (2003年3月)」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

C. 研究結果

366人では何らかのゲノム異常が検出され、このうち91例においては、いずれかの遺伝子変異が認められた。最も頻度の高い遺伝子変異はALK変異であり、約9%であった。ゲノム異常により6つのサブグループ (A: ALK+MYCN、B: Other mutation、C: MYCN+1p LOH、D: 11q LOH、E: Hyperplod、F: silent) が検出された。グループA、C、Dにはstage 4が有意に多く、またグループDは年長児が、グループEには年少児が多く含まれた。グループAに含まれるノンハイリスク群は、有意に予後不良であった。

D. 考察

従来の報告通り、MYCN、ALK および 1p LOH、11q LOH は協調して予後不良に関与していることが示されたが、特に、MYCN、ALK の異常は、ノンハイリスク群においても予後不良因子である可能性が示唆された。

E. 結論

ノンハイリスク群においてMYCN、ALKの異常は、治療反応不良を示す指標となる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし。

(委託業務成果報告(業務項目)には記入せず、委託業務成果報告(総括)にまとめて記入)

1. 論文発表

1) Hoshino A, Nomura K, Hamashima T, Isobe T, Seki M, Hiwatari M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Kanegane H. Aggressive transformation of anaplastic large cell lymphoma with increased number of ALK-translocated chromosomes. *Int J Hematol.* 101:198-202,2015

2) Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J, Yabe H, Goto H, Adachi S, Hayakawa A, Takeshita Y, Sawada A, Atsuta Y, Kato K. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for infant acute lymphoblastic leukaemia with KMT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the paediatric acute lymphoblastic leukaemia working group of the Japan Society for Haematopoietic Cell Transplantation. *Br J Haematol.* 168:564-70, 2015

3) Koh K, Tomizawa D, Moriya Saito A, Watanabe T, Miyamura T, Hirayama M, Takahashi Y, Ogawa A, Kato K, Sugita K, Sato T, Deguchi T, Hayashi Y, Takita J, Takeshita Y, Tsurusawa M, Horibe K, Mizutani S, Ishii E. Early use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with MLL gene-rearrangement-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 29:290-6, 2015

4) Yasudo H, Ando T, Takeuchi M, Nakano H, Itonaga T, Takehara H,

Isojima T, Miura K, Harita Y, Takita J, Oka A. Systemic lupus erythematosus complicated with liver cirrhosis in a patient with Papillon-Lefèvre syndrome. *Lupus.* 23:1523-7, 2014

5) Shiozawa Y, Takita J, Kato M, Sotomatsu M, Koh K, Ida K, Hayashi Y. Prognostic significance of leukopenia in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett.* 7:1169-1174, 2014

6) Hangai M, Watanabe K, Shiozawa R, Hiwatari M, Ida K, Takita J. Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia with Unusual Multiple Bone Invasions: A case report. *Oncol Lett.* 7:991-993, 2014

7) Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res.* 15:74:3790-801, 2014

8) Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, Kato M, Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma. *Cancer Res.* 74:2742-9, 2014

9) Fujishiro J, Sugiyama M, Ishimaru T, Uotani C, Tsuchida S, Takahashi N, Shiozawa R, Takita J, Iwanaka T. Cyclic fluctuation of blood pressure in neonatal neuroblastoma. *Pediatr Int.* 56:934-7,