

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

難治性小児がんの臨床的特性の分子情報と
その理論を応用した診断・治療法の開発

(H16・3次がん・一般・009)

平成18年度 総合・総括研究報告書

主任研究者 秦 順 一

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総括研究報告

難治性小児がんの臨床的特性の分子情報とその理論を応用した診断・治療法の開発

秦 順一

- - - - 1

II. 分担研究報告

1. 研究総括および小児腫瘍の中央診断・検体保存システム構築

秦 順一

- - - - 11

2. 白血病再発例の特異性解明と早期予知法の確立

藤本純一郎

- - - - 14

3. 難治性小児固形腫瘍の臨床特性と新規診断・治療法開発

大喜多 肇

- - - - 17

4. 小児がん発症における臓器形成関連遺伝子の関与

宮下俊之

- - - - 21

5. ゲノム刷り込み機構の解明

副島英伸

- - - - 24

6. キメラ遺伝子に対する分子標的治療法の開発

黒田雅彦

- - - - 27

7. ゲノム情報からみた小児がんの臨床特性の解明に関する研究

太平美紀

- - - - 30

8. 難治性小児がんの特定とその治癒率向上に有用な臨床および生物学的情報の検討

熊谷昌明

- - - - 33

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- - - - 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷

- - - - 43

V. 総合研究報告書

- - - - 59

V. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)
総合研究報告書(平成16年度—平成18年度)

難治性小児がんの臨床的特性の分子情報とその理論を応用した診断・治療法の開発

主任研究者 秦 順一 国立成育医療センター 総長

研究要旨:本研究はウイルス腫瘍をはじめとする胎児性腫瘍を合併する腫瘍・奇形症候群(Beckwith-Wiedemann症候群やGorlin症候群等)、Ewing肉腫、横紋筋肉腫、白血病など小児がんの主たる病型および難治性再発例の特徴を含めた病態の特性を表す遺伝子変異の解析、網羅的分子発現プロファイリング、キメラ遺伝子や表面分子を明らかにし、それらを標的とした新規治療モデルを開発することを目的とする。

Beckwith-Wiedemann症候群におけるエピジェネティックな遺伝子修飾や遺伝子変異についてわが国の44例での解析が終了した。その結果、本邦例ではH19-DMR高メチル化が有意に低く、染色体異常や原因不明が高い傾向にあり、人種での差異が明確になった。一方、散発性ウイルス腫瘍ではWTV、11p11.5のインプリンティング遺伝子のメチル化異常など複数の遺伝子変化が認められることが明らかとなった。Golin症候群については、そのスプライス異常を検出できるマイクロアレイを開発し、診断に役立てている。小児がんの病態を層別化するために神経芽腫、肝芽腫、ALLで遺伝子異常の網羅的な解析を行ったところ、有用な指標を得た。極めて難治性であるEwing肉腫の発生母地をあきらかにするためヒト骨髄間葉系細胞に、本腫瘍に特異的なキメラ遺伝子を導入する系を確立した。その結果、本腫瘍に特異的な形質が認められるようになった。本腫瘍の発生母地とキメラ遺伝子の機能について示唆的な所見である。小児がんのキメラ遺伝子を標的にした新規治療法を開発するため、粘液細胞型脂肪肉腫に特異的なTLS-CHOP遺伝子のsiRNAを作成し腫瘍に導入したが、*in vivo*では縮小効果は認められなかった。小児がん研究推進に必須の中央診断と検体保存のシステムが完成し、本格的な運用が始まった。

藤本純一郎	国立成育医療センター研究所 副所長
大喜多 肇	国立成育医療センター研究所 室長
宮下俊之	国立成育医療センター研究所 室長
副島英伸	佐賀大学医学部助手
黒田雅彦	東京医科大学講師
大平美紀	千葉県がんセンター研究員
熊谷昌明	国立成育医療センター医長

通じて各種難治性小児がんの臨床的特性を明らかにし、分子情報に基づいた新規診断法を開発し、新規治療法に寄与することを目的とした。さらに、形態学的所見および分子情報に基づいた中央診断システムを確立しつつ、希少疾患である小児がんの検体保存システムの構築を通じて基礎研究、臨床研究を推進することを目的とした。

発症機序の解明に役立つ遺伝子異常が各種の難治性小児がんで見られ、正確な診断に応用されつつある。しかしながら、これらの成果は治療法の開発には十分結びついておらず、一部の小児がんは依然として治療成績が不良で予後の改善が得られていない。また、治療成

A. 研究目的

本研究は、遺伝子構造異常、遺伝子修飾様式および各種の分子発現様式の詳細な解析を

績が向上した腫瘍でも、再発例では根治の困難な病型がある。このような小児がんをめぐる現状を抜本的に克服するためには、従来同一と認識されている腫瘍の中でも生物学的差異に基づいた病型の新たな鑑別法の確立と治療戦略の構築が焦眉の課題である。現在、各種の難治性小児がんに対する多施設共同臨床試験が進みつつあるが、その基盤となる正確な診断システムの構築も速やかに達成すべき課題である。

一方、小児がんでは臓器の形成異常を伴うことが多く、器官形成の破綻として発症するという側面を有する。これらの中には変異遺伝子の機能以外にゲノム刷り込みなどによるエピジェネティックな変化も加わって発症する可能性も示唆されており、臓器形成過程に遡るアプローチも必要である。本研究では以上の点を鑑み、Ewing肉腫など難治性小児肉腫、腫瘍・奇形症候群ならびに再発白血病等を対象として、1) 遺伝子構造異常の詳細解析とそれらの遺伝子を標的とした治療モデルの開発、2) 小児がんの臨床的特性にかかわるエピジェネティックな遺伝子修飾や臓器形成関連遺伝子機能の解析、3) 小児がんの病態を早期に層別化する指標の確立、4) 中央診断システムと検体保存システムの構築による診断法の標準化と臨床研究・基礎研究の推進、を行うことを目的とする。

得られた成果は、小児がんの臨床特性の分子情報に基づいた診断法の標準化および精度の高い臨床試験の推進に役立つ。また、分子基盤に基づいた新たな治療戦略を提案することが可能となり、難治性の小児がんの治療成績向上に貢献できる。これらの成果を通じて、小児疾患で死亡原因の第1位である小児がんの予後とQOLを改善し、健全な次世代の育む環境を整備することができる。

B. 研究方法

本研究では、1) 小児がんにおける遺伝子構造異常の詳細解析と遺伝子標的治療モデルの開発、2) エピジェネティックな遺伝子修飾や臓

器形成遺伝子機能の解析、3) 小児がんの生物学的特性を解明し、且つ病態を層別化できる指標を見いだす、4) 中央診断システムと検体保存システムの構築による診断法の標準化と臨床研究・基礎研究の推進、を行った。各々の課題における具体的な研究方法の記載は省略する。

(倫理面への配慮)

遺伝的な背景への配慮、未成年者への説明と同意に関する配慮、長期生存を考慮した説明と同意ならびに個人情報の保護のあり方、など課題が多い。基本的には国が定める各種の指針に従うが、上記の課題に関する論議や国民的合意の状況を考慮しながら適切な配慮を行う。具体的には主任研究者、分担研究者が属する研究機関に倫理申請を行い、全ての課題について倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) 小児がんにおける遺伝子構造異常の詳細解析と遺伝子標的治療モデルの開発

Ewing肉腫の90%以上にEWSの再構成に伴うキメラmRNAの発現を認めることが判明した。Ewing肉腫に特異発現するEWSキメラ遺伝子の機能をヒト骨髄間葉系細胞への導入により解析した。その結果、EWS/FLI1またはEWS/ERGの発現によりヒト間葉系細胞、U-TE13細胞は形態変化のみならず発現遺伝子パターンもEwing肉腫類似のものとなった。このことからEwing肉腫が間葉系細胞を発生母地としていることが示唆された。mRNAを標的とした分子治療法の開発を目指しこれらキメラ遺伝子のsiRNAベクターの構築を行った。粘液型脂肪肉腫で認められる

2) エピジェネティックな遺伝子修飾や臓器形成関連遺伝子機能の詳細解析

Beckwith-Wiedemann症候群(BWS)で11p15.5に存在するインプリンティングドメインでのDNAメチル化状態を解析した。本症候群はインプリン

ディングドメインLIT1-DMRおよびH10-DMRのメチル化状態の異常によって惹き起こされることが明らかになった。そこでBMW本邦例44例について、同部位のメチル化状態を解析した結果、欧米例と比し本邦例ではH19-DMR高メチル化が有意に低く、染色体異常や原因不明が高い傾向にあった。以上、同症候群ではその発症機序に人種差が存在することが明らかになった。一方、散発性ウイルス腫瘍でWT1遺伝子および11p15.5に座位を有する前記遺伝子のメチル化について広範に検討した結果、大部分の症例で2種以上に遺伝子以上に変化が認められた。なかでもH19-DMRの高メチル化が40%認められた。散発性ウイルス腫瘍でもその発生に同領域の異常が密接に関連していることが明らかになった。Gorlin症候群では18例中14例にPatched (PTCH) 遺伝子変異を認めた。同症候群については多種類のスプライス異常が検出されるため、それらを効率よく検出できるマイクロアレイを開発し、診断にあたってその有用性を明らかにできた。

3) 小児がんの病態層別化

-がんの網羅的遺伝子解析について-

病態層別化が可能な指標を見いだすため、小児がん特化型DNAチップを完成させ肝芽腫80例、神経芽腫136例の解析を終了した。神経芽腫ではこのDNAチップの結果が高い予後予測能を示すことが明らかとなった。また、肝芽腫でアレイCGHによるゲノム構造異常解析を行った結果、遺伝子異常が殆どない群と頻発する群とに分かれた。それぞれの群と病態を対比させて結果、予後と相関(前者が予後良好群、後者が予後不良群)することが明らかとなった。小児血液腫瘍については、新鮮ALL約200例の500K高密度ゲノムアレイ解析を開始した。解析途中であるが、多数の微小欠損や増幅の集積点が存在することが明らかとなり、この中にはTCR- α/δ (14q11)、TCR- β (7q34)、TCR- γ (7q14) のTCR再構成に関係したlocus や、TCL(14q22)等の既知のlocusの他、1q21や

10q23等のこれまでに報告がない多数の異常の集積点を確認された。また、ALL再発の早期予知に応用可能なフローサイトメトリーによる骨髄微量残存腫瘍(MRD)検出法の開発を進め、4カラー解析により10,000分の1の感度で検出できるシステムを構築することができた。

4) 中央診断システムと検体保存システムの構築による診断法の標準化と臨床研究・基礎研究の推進

複数の小児がん臨床試験グループと連携し、組織・細胞・遺伝子に関する中央診断体制ならびに検体保存体制を国立成育医療センター内に整備した。小児血液腫瘍、神経芽腫、Ewing肉腫、横紋筋肉腫、ウイルス腫瘍について上記活動を実施している。小児血液腫瘍については患者の寛解期白血球DNAを連結可能匿名化状態で保存するシステムを稼働させている。

D. 考察

1) Ewing肉腫は未だ発生母地が不明であるものの、EWS/FLI1等の特異的キメラ遺伝子が高頻度に認められる。ヒト間葉系細胞にこれらキメラ遺伝子を導入した結果、Ewing肉腫類似の表現型を獲得させることに成功した。これらキメラ遺伝子がEwing肉腫の発症に密接に関連していることが明らかになった。粘液細胞型脂肪肉腫で、その大部分の症例でみられる

TLS-CHOP遺伝子を標的としたsiRNAにより、腫瘍増殖抑制を図ったところIn vitroでは増殖抑制が認められたものの、in vivoではその効果が明らかでなかった。siRNAによる腫瘍の増殖抑制は注目を集めているものの、効果が限定されるなどの制限もある。

2) インプリンティングの破綻は悪性腫瘍の発生に関わるのみならず臓器形成異常にも関与する点で重要である。腫瘍・奇形症候群であるBWSでは11p11.5のインプリンティング遺伝子のメチル化状態がその発症に重要な意義を有していることを明らかにした。また、本邦例と欧米

例でのメチル化状態の差異が腫瘍合併頻度と関連している可能性を示唆する所見を得た。また、ウイルス腫瘍の発症には11p13にある *WT1*異常ならびに11p15.5にある一連のインプリンティング遺伝子のメチル化異常など複数の遺伝子変化が関わっていることが判明した。

3) 本研究で、小児がんに対する網羅的遺伝子発現解析ならびに網羅的遺伝子構造解析が進み、小児がんの病態層別化に重要な知見が得られた。また、ALLの予後診断でフローサイトメーターが有用であることを検証した。

4) 臨床試験と連携した中央診断と検体保存のシステムは定着した。小児がん患者のDNA signatureの体系的な保存は新たな治療戦略を

考案する上でも重要な情報になると考えられる。

E. 結論

希少疾患である小児がんについて中央診断と検体保存システムを構築しつつ研究を推進する体制が整備された。それに基づく個々の研究成果は新規性、科学性が高いと考える。

F. 健康危険情報

該当事項なし

H. 知的所有権の取得状況

なし