

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20299

研究課題名(和文)再発・進行神経芽腫の予後改善を目指したプロテオミクスによる新規マーカーの検討

研究課題名(英文) Challenges in proteomics-based biomarker discovery of refractory and advanced neuroblastoma

研究代表者

大竹 耕平 (OTAKE, Kohei)

三重大学・医学部・助教

研究者番号：40378344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：予後不良な神経芽腫のマーカーを選出するため、2つの神経芽腫細胞株を用い、分化誘導を行い、分化した細胞、分化していない細胞からタンパク質を抽出した。Proteomicsによりタンパク質の同定を行い、合計713種類のタンパク質が検出され、12種類のタンパク質が分化していない悪性度の高い神経芽腫の細胞のみに発現していた。このうち、ATP-dependent RNA helicase(DDX39A)に着目し、検証を行った。神経芽腫の予後との検討では神経芽腫の予後因子の一つであるMYCN増幅と共に有意に予後と相関を認め、DDX39Aの高発現群でoverall survivalが不良であった。

研究成果の概要(英文)：Shotgun proteomic analysis was performed in undifferentiated and ATRA-induced differentiated NB cells in vitro. An identified protein was verified by MRM and western blot analysis. Immunohistochemistry (IHC) was used to examine the expression of the identified protein in 33 primary NB tissues. Twelve proteins, including ATP-dependent RNA helicase (DDX39A), were only detected in undifferentiated NB cells. A peptide of DDX39A was detected at a significantly higher level in undifferentiated IMR-32 and LA-N-1 cells by MRM. Western blot analysis revealed that DDX39A expression was significantly higher in undifferentiated IMR-32 and LA-N-1 cells. IHC demonstrated that DDX39A was highly expressed in the primary tumor tissues of patients with poor prognosis, and univariate and multivariate survival analyzes showed that DDX39A expression could be an independent unfavorable prognostic factor. DDX39A is a potential biomarker for unfavorable NB using a proteomic approach.

研究分野：小児外科

キーワード：神経芽腫 マーカー 予後因子 プロテオミクス DDX39A

### 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、脳腫瘍を除く、小児固形腫瘍の中でもっとも頻度が高い悪性腫瘍である。神経芽腫の予後因子や自然退縮に関する先人たちの様々な研究により、多くの偉大な発見がなされている(Maris JM N Engl J Med 2010)が、進行、再発神経芽腫ではその overall survival を改善するには至っておらず、難治性の疾患である。小児悪性腫瘍は成人と比べ、頻度は稀であるが、高リスクの神経芽腫では、骨髄移植を併用した大量化学療法、放射線治療と手術を併せた multimodality treatment でも、overall survival は 40%以下であり、予後が非常に不良である(Maris JM, et al. Lancet 2007)。一方では、神経芽腫は“自然退縮”という現象が存在し、無治療もしくは少量の化学療法で転移巣さえも消失するという性質を持つ群も存在する。そのため、神経芽腫では、化学療法などの治療を適切に行う上で、様々なマーカーの検討とリスク分類に合った治療の選択が非常に重要となる。現在の統一された治療プロトコールでは、治療前の腫瘍生検による病理所見などの生物学的な予後因子と発症時の年齢、局所浸潤や遠隔転移の有無などの臨床的な因子を組み合わせ、リスク分類(Cohn SL, et al. J Clin Oncol 2009)を行い、最適な化学療法を選択し、高リスク症例であれば、骨髄移植を伴う大量化学療法後に手術による局所切除と放射線治療を行う。

そこで、一旦、治療は終了となるが、その後の再発、進行症例は 40.6%に認められ、10年の overall survival は再発症例 6.8%、進行症例 14.4%と予後は極めて不良である(Garaventa A, et al. Eur J Cancer 2009)。大量化学療法、骨髄移植、手術、放射線治療と多くの困難を乗り越えてきた子供たち、その家族のためにも、再発、進行神経芽腫症例の予後の改善は神経芽腫の治療に携わる医師である我々の第一の課題である。また、リスクの低い Stage1 や 2 の症例の中にも、局所再発などの再発、進行症例は 7%、16.8%と存在し、これらに有効な維持治療、追加治療を行うことも重要であると考えられる(Garaventa A, et al. Eur J Cancer 2009)。再発、進行神経芽腫症例の追加治療としては、現在、study が進行中の vinblastine と sirolimus の併用療法、抗 GD2 抗体などの免疫療法 ALK インヒビターである crizotinib、131I-MIBG と irinotecan の併用療法、low-dose irinotecan などがあげられるが、新規マーカーが直接治療のターゲットとなる可能性も十分ある(Cole KA, et al. Clin Cancer Res 2012, Kaneko S, et al. Int J Clin Oncol 2013, Morgenstern DA, et al. Pediatr Blood Cancer 2014)。

もし、プロトコールに沿った治療後に、その後の進行や再発のリスクが評価できれば、さらなる維持治療、追加治療を適切に行うことで、進行、再発を未然に防ぐことができると

考えられ、それは大いに予後の改善につながる可能性を持ち、リスクの低い Stage1 や 2 の症例については有効な術後補助化学療法を行う目安となる。ただし、不要な治療は副作用、晩期障害の原因となるため、治療終了時に適切なリスク分類を行う必要があり、現時点で有効なマーカーは存在していない。つまり、治療終了時の予後不良、再発予測のための有効なマーカーを発見することができれば、適切に維持治療、追加治療を行うことで予後改善が見込まれる。

### 2. 研究の目的

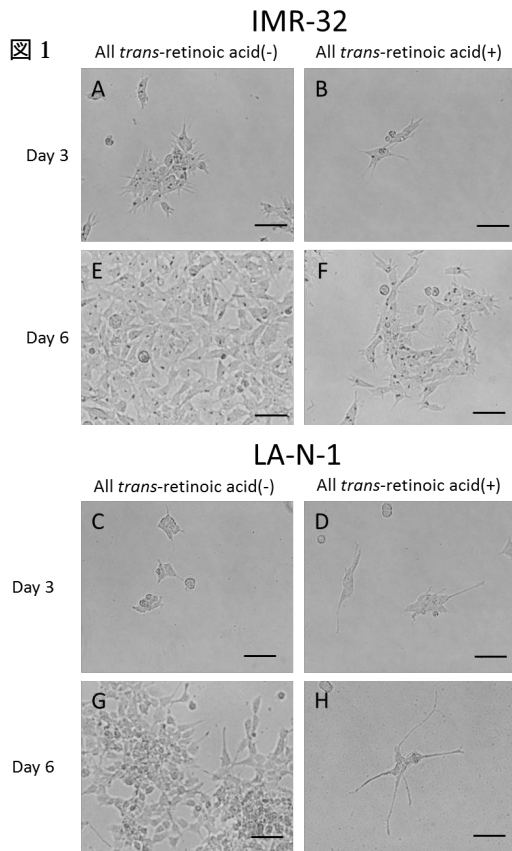
高リスクの小児神経芽腫では、骨髄移植を併用した大量化学療法、放射線治療と手術を併せた multimodality treatment でも、overall survival は 40%をきり、その予後改善が重要な課題の一つである。なかでも、プロトコールに沿った治療後の再発、進行症例の予後は極めて不良であり、その予後改善が解決策の一つと考えられる。治療終了後に適切な追加治療を行うための再発、進行症例の予測マーカーは存在せず、治療後の再発、進行を抑えるための維持治療、追加治療を適切に行うことは困難である。再発、進行症例の予後改善のために、proteomics の技法を用い、新規の予後不良予測マーカーを選出し、治療終了時の根治的外科切除標本等での予後判定を目指す。

### 3. 研究の方法

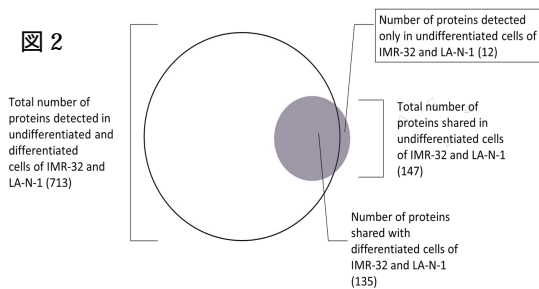
神経芽腫細胞株に all-trans-retinoic acid を暴露させ、7 日間の培養を行い、神経芽腫細胞の分化を誘導し、タンパク質を抽出し、label-free shotgun proteomics によりペプチドの解析とタンパク質の同定を行う。同定されたタンパク質について、分化していない細胞に特有のタンパク質を選出する。選出したタンパク質は multiple reaction monitoring, Western blot analysis の技法を用い、比較検証する。半定量の際に、コントロールとして酵母由来の enolase を使用する。初回の無治療の状態の神経芽腫の生検標本、もしくは初回の局所切除が可能であった症例では局所切除の標本、根治的外科切除を用い、選出されたタンパク質に関して、免疫染色を行う。免疫染色の結果と予後、再発についての検討を行い、マーカーとしての可能性を評価する。

### 4. 研究成果

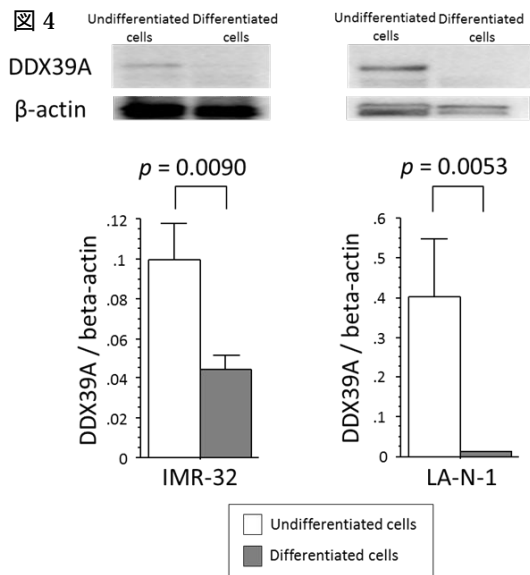
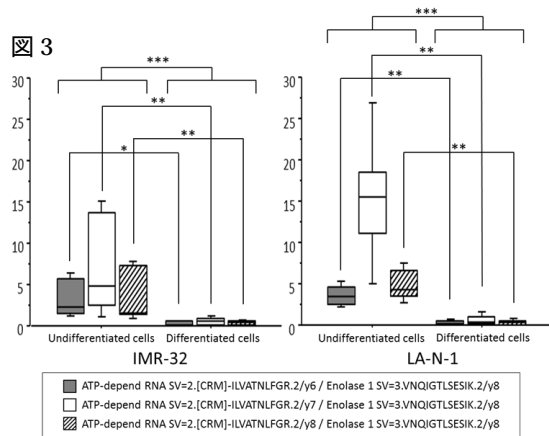
予後不良な神経芽腫のマーカーを選出するため、神経芽腫細胞株を用い、分化誘導薬である all-trans-retinoic acid(ATRA)により神経芽腫の細胞を分化させることで、その悪性を下げた細胞を培養した(図 1)。



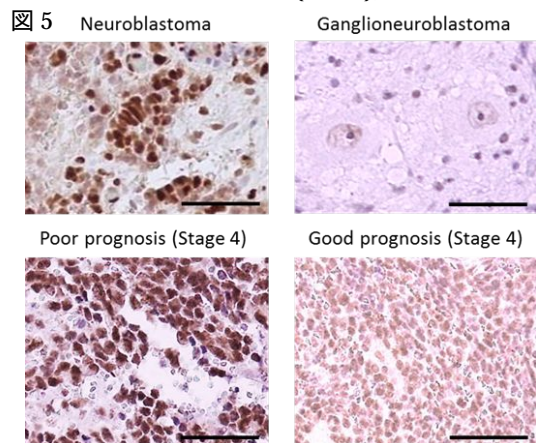
IMR-32、LA-N-1 の2つの神経芽腫細胞株を用い、10 $\mu$ M ATRA による分化誘導を行い、分化を確認し、ATRA で治療した(分化した)細胞、ATRA で治療していない(分化していない)細胞からタンパク質を抽出した。トリプシンと endoproteinase Lys-C を用いて消化を行い、ペプチド複合体とし、label-free shotgun proteomics によりペプチドの解析とタンパク質の同定を行った。合計713種類のタンパク質が検出され、12種類のタンパク質が分化していない悪性度の高い神経芽腫の細胞のみに発現していた(図2)。



このうち、タンパク質の発現部位や機能をタンパク質のデータベース(Uniprot:<http://www.uniprot.org/>)で確認し、ATP-dependent RNA helicase(DDX39A)に着目し検証を行った。Multiple reaction monitoring (MRM)で DDX39A 由来のペプチドは未分化な細胞で有意に高値であった(図3)。Western blot 法で DDX39A の発現は未分化な細胞で有意に高値であった(図4)。



さらに免疫組織学的染色により、未分化な神経芽腫の臨床検体で DDX39A の発現は陽性であることが確認された(図5)。



神経芽腫の予後との検討では、単変量解析、多変量解析で、神経芽腫の予後因子の一つである MYCN 増幅と共に有意に予後と相関を認め(図6)、DDX39A の高発現群で overall survival が不良であることが分かった(表1)。また、治療終了時の切除標本を用い、その後の再発との検討を行ったが、サンプル数が限られること、病理学的評価が困難であることから、現時点で有用な評価を行うことができなかった。

図 6

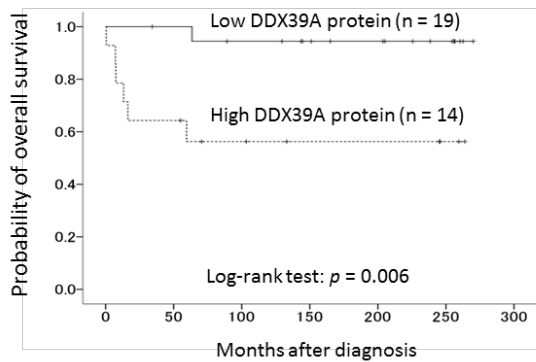


表 1

Univariate and multivariate analyses for OS in NB patients (Cox proportional hazards regression)

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
Stage (4 / 1,2,3,4S)	0.021	0-11.256	0.229			
Age (> 1.5 years / ≤ 1.5 years)	0.005	0-6.182	0.143			
Site (adrenal gland / other)	0.578	0.254-1.315	0.191			
DDX39A (high / low)	0.302	0.105-0.874	0.027	0.298	0.101-0.874	0.027
MYCN (amplified / not amplified)	7.188	1.516-34.074	0.013	7.819	1.403-43.568	0.019
Histology (neuroblastoma / ganglioneuroblastoma)	1.308	0.576-2.969	0.522			

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1) Otake K, Uchida K, Ide S, Kobayashi Y, Kobayashi I, and Kusunoki M. Identification of DDX39A as a Potential Biomarker for Unfavorable Neuroblastoma Using a Proteomic Approach. *Pediatr Blood Cancer* 2016 63(2):221-7. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 大竹 耕平, 内田 恵一, 小林 裕子, 長野 由佳, 松下 航平, 井上 幹大, 小林 一成, 楠 正人  
小児がんにおけるプロテオミクスを用いたバイオマーカー探索への挑戦  
第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016/12/5 品川プリンスホテル(東京・港区高輪)

2) Otake K, Uchida K, Ide S, Kobayashi Y, Matsushita K, Koike Y, Inoue M, and Kusunoki M.  
Identification of DDX39A as a Potential Biomarker for Unfavorable Neuroblastoma Using a Proteomic Approach.  
第 48 回環太平洋小児外科学会 (PAPS2015) 2015/5/21 Jeju South Korea

3) Otake K, Uchida K, Kobayashi Y, Koike Y, Inoue M, Matsushita K, Tanaka K, Kobayashi I, and Kusunoki M.  
Verification of DDX39A as a marker of undifferentiated neuroblastoma.  
第 115 回日本外科学会定期学術集会 (国際セッション) 2015/4/16 名古屋国際会議場(愛知・名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
大竹 耕平 (OTAKE, Kohei)  
三重大学 医学部  
助教  
研究者番号 : 40378344

(2) 研究分担者  
なし ( )  
研究者番号 :

(3) 連携研究者  
なし ( )  
研究者番号 :