

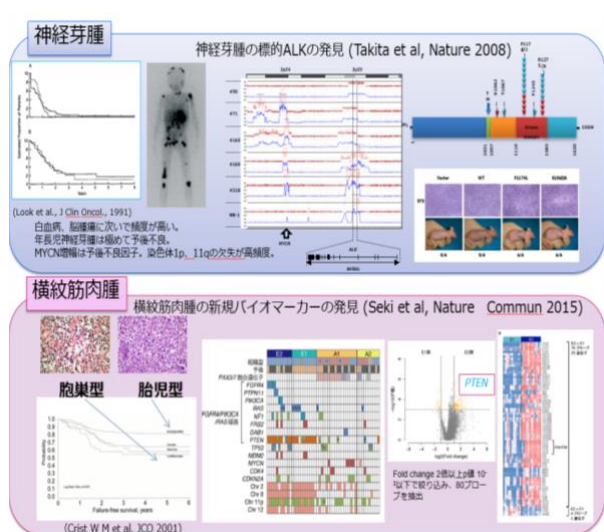
私たちの研究室では、小児がんに対するよりよい治療法や予後予測法を開発するために、次世代シーケンサーによる高度ゲノム解析技術や ES 細胞ならびに iPS 細胞を用いた幹細胞生物学研究の手法を使って、分子病態の解明を目指した基礎的研究に取り組んでいます。小児がんの原因となる遺伝子の異常を生まれつき持つ場合、さまざまな先天性疾患を発症することが知られています。すなわち、これらの遺伝子はがんの発生のみならず幅広い生命現象に重要な役割を果たしていると考えられています。従って、小児がんの病態解明は、さまざまな疾患の理解や生命現象の解明にもつながる重要な研究と考えられます。以下がこれまでの研究内容と現在のプロジェクトです。

1. 神経芽腫における分子病態の解明

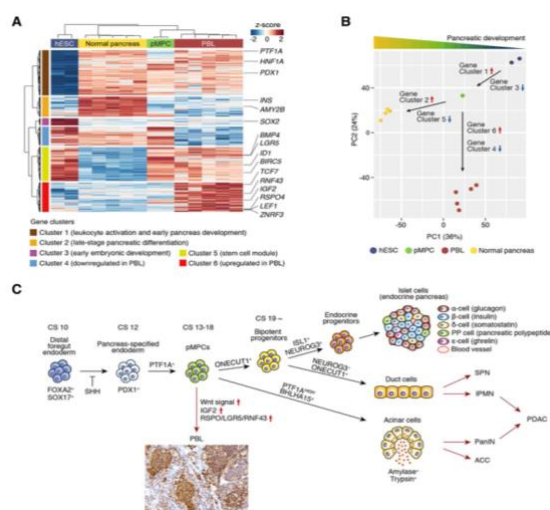
神経芽腫は主として乳幼児期に発症する神経堤由来の小児固形腫瘍であり、小児がんの中では白血病、脳腫瘍について頻度が高いものです。高リスク神経芽腫は極めて予後不良であり、治癒率は 30-40%です。私たちは先行研究において網羅的なゲノムコピー数解析の手法により、ALK の機能獲得型変異を見出し、神経芽腫の原因の一つであることを明らかにしました(**Takita et al. Nature 2008**)。本研究結果をもとに、難治性神経芽腫における ALK 阻害剤の医師主導臨床試験が国内外で行われています。さらに、神経芽腫では 11q 上の ATM 経路の異常が発に関与していることを見出し、PARP 阻害剤の有用性を示しました(**Takagi, Takita et al. J Natl Cancer Inst. 2017**)。この知見をもとに、東京医科歯科大学と共同で、小児固形腫瘍に対する PARP 阻害剤の第 I 相試験を行っています。

2. その他の固形腫瘍における統合的ゲノム解析

希少腫瘍である肺芽腫につき次世代シーケンサーを用いた統合的ゲノム解析を行い、散発性肺芽腫において、DICER1 の両アレル変異が原因であることをつきとめました(Seki Takita et al. Cancer Res. 2014)。また小児軟部腫瘍の中で最も高頻度な横紋筋肉腫のゲノム・エピゲノム異常の全体像を解明し、DNA メチル化パターンに規定される胎児型横紋筋肉腫における予後不良な一群を抽出しました(Seki, Takita et al. Nat Commun. 2015)。さらに統合的ゲノム解析を駆使して、小児の腭臓の悪性腫瘍である腭芽腫の分子病態を解明し、本症は、11q の IGF2 を含むインプリンティング領域のヘテロ接合性の消失と WNT 経路の異常に特徴づけられる遺伝学的特性が極めて均一な腫瘍であることが明らかにしました(Isobe, Takita et al. Cancer Res. 2018)。



神経芽腫と横紋筋肉腫における先行研究

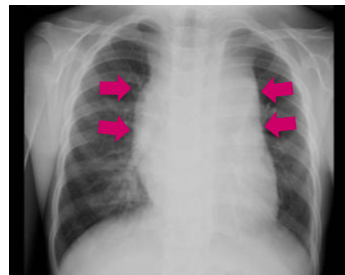
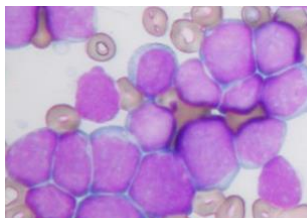


膝芽腫における分子病態の解明

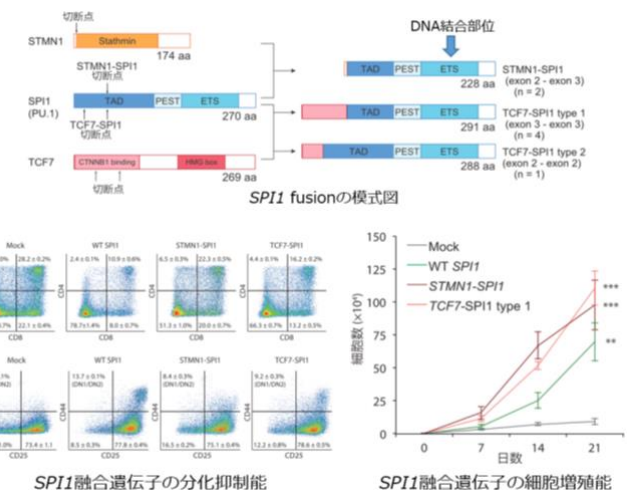
3. 造血器腫瘍におけるゲノム・エピゲノム解析

T 細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)の中でも、とりわけ再発・非寛解例は予後不良であることから、新たな治療法の開発が必要です。私たちは、T-ALL の臨床検体を用いて、全トランスクリプトーム解析を行い、重複する新規 SPI1 関連融合遺伝子を約 4%の例に見出しました。興味深いことに、SPI1 融合遺伝子陽性例は、極めて予後不良であり、また特有の発現プロファイルを有することが明らかとなりました (Seki, Takita et al, **Nat Genet.** 2017)。これまで小児 T-ALL において予後予測マーカーが同定されていなかったことから、SPI1 融合遺伝子は世界初の T-ALL における予後不良マーカーとなりうる事が明らかとなり、またこの群に対する治療の強化が小児 T-ALL の治療成績の向上に貢献するものと期待されます。

T-ALL の骨髓像



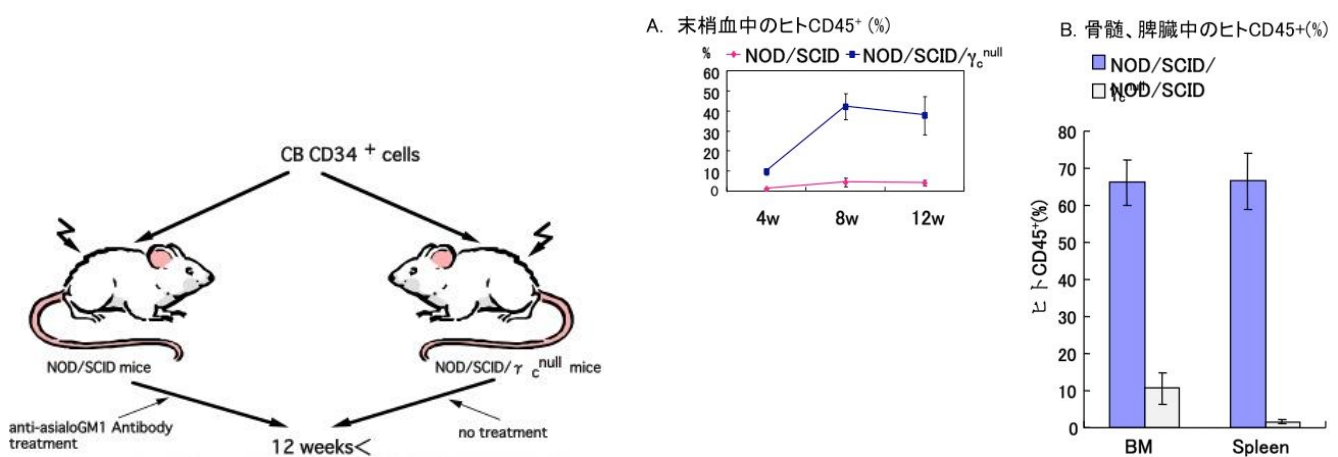
T-ALL の縦郭腫瘍



T-ALL で検出された SPI1 融合遺伝子

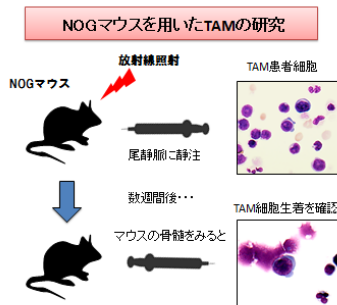
4. NOG マウスを用いた白血病の研究

造血幹細胞は自己複製能と全ての種類への血球へ分化できる多分化能を併せ持った細胞と定義されています。いわゆる「骨髓移植」ではこの造血幹細胞が患者さんの骨髓の中で分化増殖して造血系を再構築すると考えられています。しかしながらヒト造血幹細胞研究は実験系の制約からマウスなどのそれに比べて遅れている現状にありました。我々の教室ではヒト造血幹細胞の生着に極めて優れた NOD/SCID/ γ_c^{null} mouse を世界に先駆けて開発し、正常造血幹細胞や白血病細胞をマウスに生着させて、生体内で研究できる系の構築に成功しました。この系を使って以下の研究を進めています。

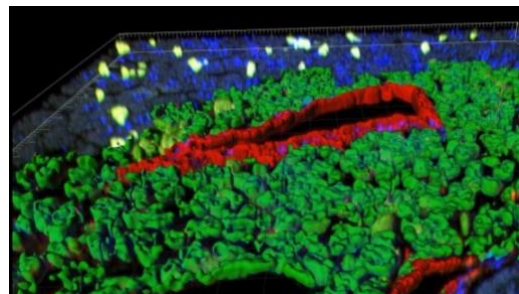


(A) 一過性骨髄増殖症(TAM)とダウン症関連骨髄性白血病(ML-DS)の研究

TAM は新生児期に一過性の芽球の増加をみる、ダウン症候群患児特有の病態です。多くの場合、芽球は自然に消退しますが、約 20%で後に白血病 (ML-DS) を発症することが知られています。我々のグループではご家族の同意が得られた TAM の患者さんから細胞をいただいて NOG マウスに移植し、長期に生着させることに成功しました。(Saida. et al. Blood 2013)。本実験系は、前白血病状態から白血病に至る過程を再現し得るモデルであり、様々な解析手法を組み合わせることでヒトにおける発癌機構の解明を目指します。



(図 A)



(図 B) ヒト白血病化 NOG マウスの肝臓内イメージ

胆管上皮細胞 (赤) 周囲に白血病細胞 (緑) が集簇している

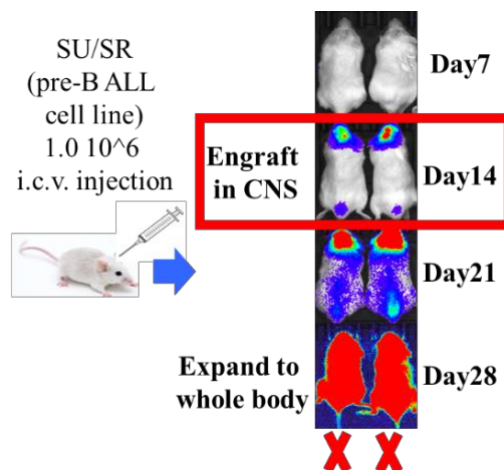
(B) 小児白血病と中枢神経を含む髄内外微小環境の研究

白血病再発において、骨髄のみならず臨床的には中枢神経再発や精巣再発などを中心とした髄外微小環境における白血病幹細胞残存が大きく寄与している事が考えられていますが、その詳細なメカニズムは明らかになっていません。これまで我々は患者由来ヒト小児 ALL 細胞を使用したヒト白血病 NOG マウスモデルを作成し、肝臓における髄外微小環境の存在を示し、微小環境内で働く因子を target とした新規治療モデルを提示してきました (Kato, I. et al. PLoS One. 2011)。中枢神経浸潤を含んだ白血病の髄外微小環境を構築するメカニズムを明らかにし、髄外微小環境を標的とした新薬、新治療の開発へとつなげる研究を実施しています

(Kato, I. et al. Blood. 2017)。

(C) CAR-T 細胞を用いた中枢神経白血病的治療開発研究

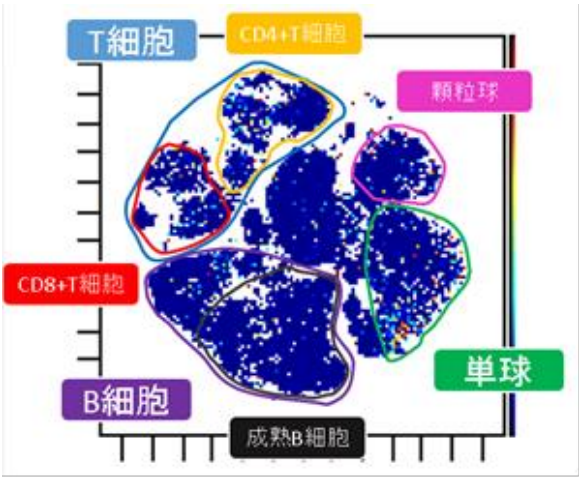
キメラ抗原受容体遺伝子改変 T (chimeric antigen receptor T-cell : CAR-T) 細胞治療が、再発・難治性の急性リンパ性白血病に対する大変有望な治療として報告されています。当科では、NOG マウスの脳室内に直接細胞を投与する方法を用いて、ヒト ALL の中枢神経単独病変のマウスモデルを作成し、信州大学・京都府立医科大学との共同で非ウイルスベクターにより作成された CAR-T 細胞を用いてその効果を示す基礎研究を行っております (Tanaka, et al 2018 ASH)。白血病の中枢神経浸潤に対して、長期毒性を軽減しつつ効果の高い治療として、CAR-T 細胞髄腔内直接投与という、新たな治療方法の開発を目指して研究を実施しています。



(マウスへの白血病細胞髄腔内移植)

5. 白血病免疫環境の解析

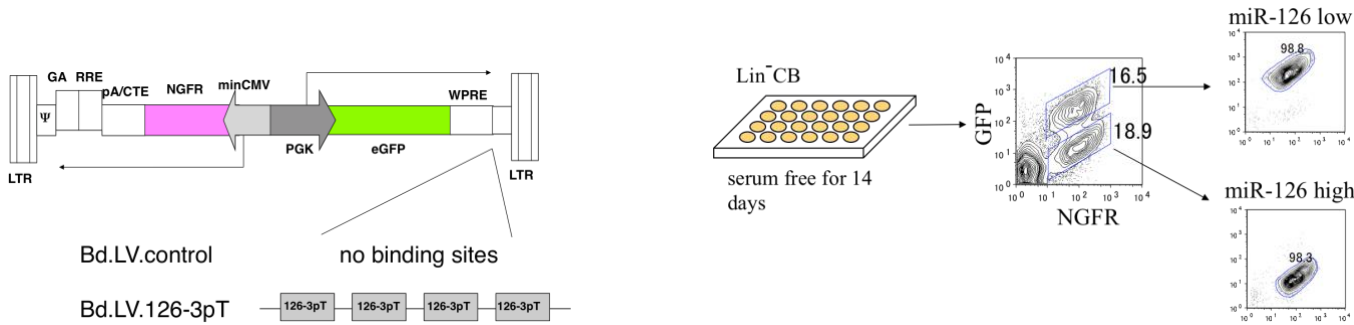
白血病の発症や治癒過程においては白血病細胞と免疫担当細胞などの生体環境が密接な関係があると考えられていますが、その詳細は明らかではありません。現在、大阪大学の坂口志文先生との共同研究で、最新マスマイトメトリーを用いて骨髄・末梢血における白血病免疫環境の解析を行っています。



(最新マスマイトメトリーを用いた解析)

6. microRNA sensing vector を用いた造血幹細胞の純化

近年、microRNA (miRNA) と呼ばれる non coding small RNA が幹細胞系をはじめとして、様々な細胞の生物学的活性に重要な役割を果たしていることが示されています。海外のラボとの協力で miRNA の活性を可視化できる lentivirus vector の開発に関わり、なかでも miRNA-126 がヒト造血幹細胞で高度に発現していることを見いだしました (Sci Transl Med. 2010)。この系を用いることで、細胞内の miRNA 活性が生きたままリアルタイムに測定することが可能となりました。micro RNA binding site を入れ替えることにより様々な miRNA に対応が可能で、正常のみならず白血病細胞における miRNA の発現や役割について研究を進め、予後因子を含めた biomarker の発見や創薬の可能性につき現在検討を行っています。



Bidirectional lentivector (miR-126 sensing vector)

miR-126 発現に応じた生細胞の分取

7. 小児固形がんをターゲットとした新規治療開発

小児がん全体の治療成績は集学治療の進歩により向上してきていますが、神経芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、悪性ラブドイド腫瘍など小児固形がんの予後は依然として不良であり、新規治療の開発が望まれています。我々は小児固形がんの細胞株または患者由来腫瘍を NOG マウスに移植する実験系を用いて以下の研究を進めています。

(A) 小児固形がんに共通した新規抗体治療の開発

多くの小児固形がんの起源は胎児期に一過性に存在する神経堤細胞由来と推定されています。我々はヒトES細胞、iPS細胞から神経堤細胞が分化誘導される過程で発現する表面抗原の網羅的スクリーニングにより多くの小児固形がん共通して発現する表面抗原を同定しました。さらに、悪性ラブドイド腫瘍を移植したNOGマウスにその表面抗原に対するウサギポリクローナル抗体を投与すると、明らかな腫瘍縮小効果を認めました（図1、Nodomi S, Umeda K, et al. Oncogene 2016）。現在、様々な小児固形がんに対する抗体の有効性を検討し、この表面抗原を発現する小児固形がん共通した新規抗体治療の開発を目指した研究を行っています。

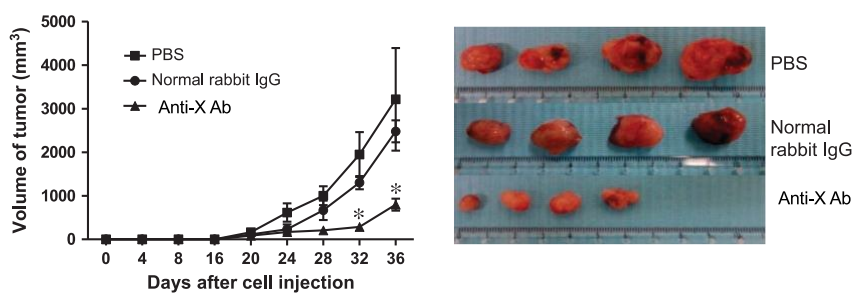


図 1 神経堤細胞関連表面抗原 X に対する抗体投与による悪性ラブドイド腫瘍の in vivo 腫瘍縮小効果

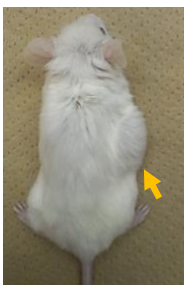
(B) 患者腫瘍組織移植（PDX）モデルを用いた小児固形がん幹細胞をターゲットとした新規治療法の開発

白血病、脳腫瘍、乳癌など多くのがんにおいてがん組織の一部にがん幹細胞が存在することが知られています。この細胞は正常組織の幹細胞と同様に無限の増殖能と多分化能を有し、新たながん細胞の供給源となるだけでなく、従来の抗がん剤や放射線治療に対して抵抗性を示すため、がんの再発の主原因であることが報告されています。小児固形がんにおいてがん幹細胞をターゲットとした治療法は開発されていません。

患者由来腫瘍と長い培養期間のうちに元来の性質を徐々に喪失した細胞株では細胞表面抗原発現パターンに大きな隔たりがあります。また、小児固形がんは多数の患者由来腫瘍を得ることが困難であり、かつがん幹細胞は腫瘍内に少数しか存在せず、解析に十分な細胞が確保できないため、患者腫瘍組織移植（PDX）で生着が得られた腫瘍細胞が代替の実験ツールとして着目されています。

我々はこれまでに神経芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、悪性ラブドイド腫瘍など様々な小児固形がんの PDX 細胞を作成しています。現在はこの小児固形がん PDX ライブラリーを活用し、新規治療ターゲットとしての有用性を検討する研究を進めています。

悪性ラブドイド腫瘍



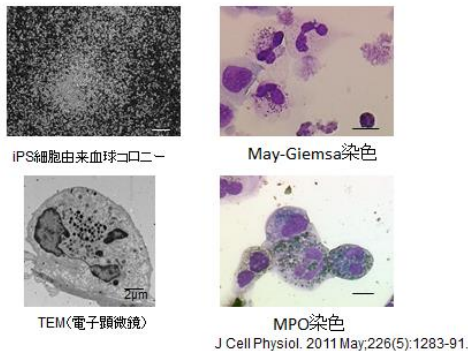
8. 患者由来 iPS 細胞を用いた先天性血液疾患の研究

様々な先天性血液疾患では心・血管・リンパ系、神経・骨格筋系等の機能障害や形成不全を伴う事が知られています。近年、これらの疾患の多くで原因となる遺伝子変異が同定され、それらは多系列の臓器発生・分化、DNA 修復、リボソームの生成などに深く関連した遺伝子であることがわかってきました。我々は患者由来 iPS 細胞を用いた多系統臓器の分化誘導および各系統細胞の表現型・機能評価を行うことにより多方面から先天性血液疾患を解析し、病態解析や新規治療薬開発の基盤技術を確立する事を目指しています。

我々はまず iPS 細胞から好中球を分化させる分化誘導システムを確立し (Morishima T, Watanabe K, et al. J Cell Physiol. 2011)、先天性好中球減少症の患者由来 iPS 細胞を用いた本疾患の病態を再現することに成功しました (Morishima T, Watanabe K, et al. Haematologica. 2014)。現在は先天性骨髄不全症候群の一つである Shwachman-Diamond 症候群、リンパ形成不全を伴う先天性免疫不全症 Emberger 症候群の研究を開始しています。

(図) human iPS 細胞からの好中球分化誘導

human iPS 細胞からの好中球分化誘導



9. Shwachman-Diamond 症候群の遺伝子解析

Shwachman-Diamond 症候群は、骨髄不全、膵外分泌異常、骨格異常を主徴とする先天性骨髄不全症候群で、白血病に罹患するリスクが高いことが知られています。最近、本疾患の原因遺伝子 SBDS が発見され、この遺伝子がコードする蛋白が、リボソームの生成に関与していることが報告されました。SBDS 遺伝子変異はこの病気の患者さんの 90%に認められ、診断価値が高いとされています。私達のグループでは、SBDS 遺伝子解析を行っております。体重の増えが良くない、身長が伸びない、下痢が続く、脂肪便が出る、血球が減少しているといった症状があり、本疾患が疑われた場合には、梅田 (umeume@kuhp.kyoto-u.ac.jp) までご連絡ください。

Shwachman-Diamond症候群を疑う症状・検査所見

症状

- 体重増加不良
- 低身長
- 骨格異常
- 脂肪性下痢
- 易感染性

検査所見

- 好中球減少
- 貧血
- 血小板減少
- 脂肪膵
- 膵外分泌酵素低値
- 便中脂肪増加
- 肝障害
- 骨異常

注:必ずしもすべてそうわけではありません。

10. 治療中の白血病患者における微小残存病変の検出

小児白血病はその多くが化学療法で治癒する疾患となりましたが、4～5人に1人の再発が見られます。再発する患者さんを予測できればさらなる治療成績の向上に繋がると考えられます。化学療法後に白血病細胞が残存する度合い（MRD; minimal residual disease）が予後と関連することが報告されています。我々はJPLSG(Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group)のMRD診断施設として、急性骨髄性白血病の患者さんにおけるMRDをマルチカラーフローサイトメトリーを用いて0.1%以下の感度で測定し、予後予測に有用であることを見出しており、予後因子として治療に組むこむべく研究を進めています。また、併せて白血病細胞の表面抗原の解析を通じて白血病幹細胞集団の同定につながる分子の探求を行うなど、臨床検体を用いた研究を進めています。

足立研究室

京都大学医学研究科人間健康科学系専攻の足立研究室 HP (<https://adachilab-kyotouniv.amebaownd.com/>) もご覧ください。日本小児がん研究グループ（JCCG）臨床試験の余剰検体を用いて患者さんのための臨床研究を行っています。上久保靖彦特定教授、奥野恭史教授との共同研究で、スーパーコンピューターを用いた低分子創薬（抗がん剤）開発研究も行っています。松尾英将助教と共に、小児がんに興味を持ってくれる血液専門の臨床検査技師を養成し、フローサイトメトリー（FACS）や形態中央診断に熟練した検査技師を多く輩出するよう、京大病院検査部と密接な協力関係を築いています。免疫不全マウス（NOGマウス）やFACSを使用した研究は、小児科血液腫瘍Gスタッフの全面的な協力を得て行っています。

平成 30 年 3 月 28 日

(臨床研究に関する公開情報)

京都大学医学部附属病院では、下記の臨床研究を実施しております。この研究の計画、研究の方法についてお知りになりたい場合、この研究に検体やカルテ情報を利用することをご了解できない場合など、お問い合わせがありましたら、以下の「問い合わせ先」へご照会ください。なお、この研究に参加している他の方の個人情報や、研究の知的財産等は、お答えできない内容もありますのでご了承ください。

[研究課題名] 小児・成人悪性腫瘍がん幹細胞の同定に関する研究

[研究責任者] 梅田 雄嗣 京都大学医学部附属病院 小児科 助教

[研究の目的]

この研究の目的は、小児・成人悪性腫瘍疾患において発症や、再発の主原因であるとされるがん幹細胞を含めたがん細胞や腫瘍環境細胞の特性を知ることにより、有効な治療法を開発することです。

[研究の方法]

●対象となる患者さんと研究方法

小児あるいは成人の血液悪性疾患あるいは固形悪性腫瘍の患者さん

主には組織や細胞などの検体に含まれるDNAやRNAという物質を取り出し、遺伝子の構造や発現量を解析します。調べる対象は、関係する可能性のある数多くの遺伝子です。その他、正常細胞と比較しながら、がん細胞や腫瘍環境細胞の性質を詳しく調べます。さらには免疫不全マウスを使用して治療法の開発なども行います。

●利用する検体、カルテ情報

検体：血液・骨髓液・髄液・手術検体など（診療または他の研究で使用した余りの検体で、この研究のために新たに採取することはありません）

カルテ情報：診断名、年齢、性別、治療経過、血液検査、骨髓検査、染色体検査、遺伝子検査など

[個人情報の取扱い]

利用する情報からは、お名前、住所など、患者さんを直接同定できる個人情報は削除します。また、研究成果はデータベース、学会や学術雑誌上で発表されますが、その際も患者さんを容易に特定できる個人情報は明らかになりません。

[問い合わせ先]

京都大学医学部附属病院 小児科 梅田 雄嗣

連絡先：TEL 075-751-3297

[病院の相談窓口]

京都大学医学部附属病院経営管理課 研究推進掛

連絡先：Tel075-751-4899/trans@kuhp.kyoto-u.ac.jp

患者・家族のニーズと看護の役割」へのご協力をお願い

研究機関名	京都大学医学部附属病院		
研究責任者	京都大学医学部附属病院	看護部	北病棟3階 川勝 和子 副看護師長
研究分担者	京都大学医学部附属病院	看護部	北病棟3階 長谷川 結花 スタッフ
	京都大学医学部附属病院	看護部	北病棟3階 関口 まゆみ 看護師長
	京都大学医学部附属病院	周産母子診療部	小児科 加藤 格 助教
	京都大学医学部附属病院	小児科	梅田 雄嗣 助教
	京都大学医学部附属病院	小児科	平松 英文 講師
	京都大学医学部附属病院	小児科	滝田 順子 教授
	京都大学大学院医学研究科	人間健康科学系専攻	足立 壯一 教授

1. 研究の目的及び意義

本研究の目的は、造血細胞移植後長期フォローアップ看護外来における患者・家族のニーズとその支援を明らかにすることである。

小児の造血細胞移植後長期フォローアップ看護外来を開設している施設は多くなく、上記について後方視的に現状を把握することで、今後の造血細胞移植後長期フォローアップ看護外来での患者・家族のニーズを明らかにすることで、必要な看護実践の改善に寄与する知見が得られることが期待される。

なお、この研究計画の内容は、研究に参加される方の人権や安全の保護および科学性等において問題がないかどうか、倫理審査委員会ですべてに検討されます。調査は倫理審査委員会からの承認を受け、さらに実施医療機関長からの許可を得た後に行われます。

2. 研究対象者

2017年1月～2018年10月に当院の造血細胞移植後長期フォローアップ看護外来を受診した造血細胞移植後の患者と家族

3. 研究期間

承認日から2019年3月31日まで

4. 研究方法

上記、「2.研究対象者」に該当する患者さんの電子カルテから臨床情報を収集し、統計学的解析に基づき、解析を行います。

5. 使用する試料

ありません

6. 使用する情報

研究に使用する情報として、カルテから以下の情報を抽出して使用させていただきますが、対象となる患者さんの個人情報は削除し、匿名化して、個人情報などが漏洩しないようプライバシーの保護には細心の注意を払います。

- ・ 患者さんの特性に関するもの
 - 性別、生年月日、移植日、移植ソース、疾患名等
- ・ 看護面談内容

7. 試料・情報の保存

本研究に使用した情報は、当該論文等の発表後、10年間保存させていただきます。

8. 情報の保護

調査情報は京都大学医学部附属病院看護部北病棟3階で厳重に取り扱います。電子情報の場合は、データの漏洩対策としてパスワードによって保護され、定期的なOSのアップデート・セキュリティチェックが行われ、ウィルス対策がされているパソコンで管理します。

9. 研究に関する資料の開示

ご本人やご家族のご希望があれば、個人情報の保護や研究の独創性の確保に支障がない範囲内で、この研究計画の資料等を閲覧または入手することができますので、お申し出ください。

また、この研究にご質問等がありましたら、下記の連絡先までお問合せください。また、対象になられた患者さんの情報が研究に使用されることについてご了承いただけない場合には研究対象としませんので、下記の連絡先までお申し出ください。この場合も診療など病院サービスにおいて患者の皆様には不利益が生じることはありません。

<連絡先>

京都大学医学部附属病院 看護部 北病棟3階 川勝和子

〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

電話番号 075-751-3297 FAX番号 075-751-4208

電子メールアドレス kawakatu@kuhp.kyoto-u.ac.jp

<病院の相談窓口>

京都大学医学部附属病院 相談支援センター

連絡先：Tel 075-751-4748 / E-mail ctsodan@kuhp.kyoto-u.ac.jp