

兵庫県立こども病院

事業実施期間: 開始 平成31年4月1日～ 終了 令和3年3月31日

申請者役職・氏名 血液腫瘍内科 田村 彰広

研究・事業名

単球解析による新規脳腫瘍診断・治療法開発

交付申請内容

研究・事業の目的及び意義

小児脳腫瘍は他分野と比べて研究開発が遅れており、小児がんの中で死亡者数が最も多く、新たな視点に基づいた治療法開発が望まれている。最新の研究から、単球・マクロファージが脳腫瘍の発症や進行に関与していることが示唆されている(Quail DF, et al. Cancer Cell 2017)。一方、単球の中には複数の亜集団が存在することが明らかにされ、サブセット毎に多様な機能を有することが報告されている(Guilliams M, et al. Immunity 2018)。そのため、髄芽腫、胚細胞性腫瘍、非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍、膠芽腫、上衣腫、びまん性橋膠腫、神経膠腫など、病態生理や臨床経過の異なる様々な小児脳腫瘍は、関与している単球・マクロファージのサブセットも多様であることが予想される。しかしながら、このような単球・マクロファージの多様性と、小児脳腫瘍の発症や進行との関連性に関しては明らかになっていない。小児脳腫瘍の発症・進行メカニズムの解明および新規診断法・治療法開発を目指し、マルチカラーフローサイトメトリー解析を用いて脳腫瘍の病態に関連する単球・マクロファージサブセットを抽出し、新たな診断法・治療法に結び付き得るパラメーターを明らかにすることを、本研究の目的とした。

本研究は、基礎研究の結果を臨床に応用することを目指したトランスレーショナル研究であり、脳腫瘍の新規診断、治療法の開発に繋がりうる科学的のみならず社会的意義の極めて高い研究提案である。

研究・事業の方法及び手段

【対象患者】兵庫県立こども病院にて診療中かつ、口頭および書面にて臨床研究参加の同意が得られた症例を対象とし、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して行う。検体の解析は、兵庫県立こども病院にて匿名化処理を行った後、理化学研究所生命機能科学研究センター内で行う。

【研究計画】小児脳腫瘍に対する新規診断法・治療法の開発を目指し、下記2項目を本研究計画とする。

1) マルチカラーフローサイトメトリーによる脳腫瘍病型特異的単球サブセットの同定

10色超のマルチカラーフローサイトメトリーにて、小児脳腫瘍患者由来末梢血に含まれる各種単球サブセットの高次元解析を行い、小児脳腫瘍病型毎に相関する単球サブセットの解析を行う。

解析項目はCD14、CD16、CD36、CD64、HLA-DR、CD11b、CD11c、Slan、CX3CR1、CD62L、CCR2、Tie2などを予定している。また、臨床経過と細胞活性の変化や相関性を解析するため、同一患者における複数タイムポイント(初発時、手術後、化学療法中、寛解期、再発時など)の解析を予定している。解析対象患者は約40名を予定している。

2) 新規診断法・治療法開発に連結しうる脳腫瘍に特異的な単球由来パラメーターの抽出

臨床経過は兵庫県立こども病院の診療情報を基に解析する。単球・マクロファージサブセット毎の解析データと診療情報を用いた統計処理を行い、サブセットと小児脳腫瘍の臨床経過との相関性解析にて、脳腫瘍病型毎に臨床経過に強く関連するパラメーターの抽出を行う。

【共同研究者】

理化学研究所 生命機能科学研究センター 宮西 正憲

研究・事業の特徴(新規性、独自性等)

本研究は、単球の有する細胞生物学的観点より、小児脳腫瘍の病態解明および新規診断法・治療法開発を目指す世界初の前向き研究である。単球・マクロファージは、血液細胞の中では最も研究の遅れている分野の一つであり、人を対象とした研究はほとんど進んでおらず、世界に先駆けた新規性の高い研究が可能である。その一方で、専門的な知識や高度な解析技術を要するため、充実した研究体制の構築が必須である。申請者および共同研究者は、これまで単球・マクロファージを専門に研究を行っており、世界に先駆けた単球・マクロファージサブセット解析技術を有する。兵庫県立こども病院は、国内最大規模の小児がん拠点病院であり、希少な脳腫瘍を含め様々な大規模患者サンプルの取得が可能である。さらに、長年に渡り保存、ストック化された国内最大規模の小児脳腫瘍サンプルを有している。

また申請者が客員研究員を兼任する理化学研究所生命機能科学研究センターは徒歩圏内に位置しており、地の利を活かした効率的かつスピーディーな研究体制を構築することで、基礎研究と臨床の現場を高いレベルで橋渡しできる点も本研究の大きな特徴である。本研究は、基礎研究の結果を臨床に応用することを目指したトランスレーショナル研究であり、脳腫瘍の新規診断、治療法の開発に繋がりうる科学的のみならず社会的意義の極めて高い研究提案である。

研究・事業により期待される効果

単球・マクロファージは、これまでの想定以上に多くの生物学的機能を有し、種々の疾患の病態や進行に強く関与することが基礎的研究にて明らかになりつつある。にも関わらず、人における研究や解析はほとんど進んでいない。その大きな理由として、統計学的解析に十分な症例数を確保することが極めて困難であることや、複雑なサブセットを高次元に解析する技術が臨床現場に無いこと等が挙げられる。今回、理化学研究所生命機能科学研究センターと連携することで、当院の小児基幹病院としての強みを最大限に活用することが可能となる。これにより、ヒト単球・マクロファージに関する最新の基礎的知見が得られるのみならず、様々な脳腫瘍病型の発症や進行メカニズムの解明や新規診断法・治療法開発へと繋がる知見が得られることが期待される。また、単球・マクロファージを標的とすることで、これまでの侵襲性の高い手術方法と異なり、低侵襲かつ簡便な治療法の開発が可能であり、臨床の現場のみならず患者やその家族にとって望ましい治療法の選択肢となりうる。と考える。

本研究より得られるデータやその先の開発技術は、どれも新規性かつ独自性の高いものであり、神戸市医療産業都市に所

属する近隣の企業、特にバイオベンチャーや製薬企業等と連携することで、開発、事業化を加速化させ、世界初の技術を神戸市医療産業都市から発信可能である。

また本研究は、神戸市医療産業都市に位置する医療機関所属若手医師と研究機関所属若手研究者が連携し主導する新たなタイプのトランスレーショナル研究であり、次世代を担う若手トランスレーショナル研究者の育成を推進する研究ハブを形成する目的も有している。そのため本研究の発展に伴い、更に研究と医療の両立を目指す若手医師・研究者の参画が期待でき、医療産業都市としてさらなる発展に貢献できると考える。

実績報告内容

研究・事業の方法及び手段

<臨床データ解析>

2006年1月から2020年1月までの間に兵庫県立こども病院で診療した神経芽腫患者(n=55)の診療録をもとに、臨床データを後方視にデータ収集した。臨床経過と診断時検査結果との相関性は、統計解析ソフト(EZR)を用いて解析した。

<単球の不均一性解析>

健康人末梢血を用いて、FACSでCD14、CD16などの発現を用いて単球を細胞ソーティングした後、BD Rhapsodyを用いて1細胞RNA-seqを行った。得られたデータは、1細胞RNA-seqデータ解析ソフト(SEQ GEQ)を用いて解析した。

研究・事業の内容及び目標達成状況

神経芽腫は、自然退縮する予後良好群から集学的治療後も半数以上が再発する高リスク群まで存在する不均一な悪性腫瘍である。高リスク神経芽腫は、中でも頭蓋内転移をきたしやすく、予後不良である。兵庫県立こども病院の有する膨大な臨床データを元に、初診時から加療中、退院後フォローアップまで全ての診療期間を対象に、神経芽腫の免疫学的予後予測因子の探索を行った。

末梢血単球絶対数(absolute monocyte count; AMC)×末梢血リンパ球絶対数(absolute lymphocyte count: ALC) $\geq 1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ をHigh group、末梢血単球絶対数×末梢血リンパ球絶対数 $< 1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ をLow groupとして二群化したところ、High group(n=38)の4年無増悪生存率が81.7%に対して、Low group(n=17)の4年無増悪生存率が31.7%で、末梢血単球数と末梢血リンパ球数の乗算値が低値の群で有意に予後不良であった(p<0.001)(図1)。さらに、この新規パラメーターを元に高リスク神経芽腫を二分化すると、これまで分離不可能とされていた超高リスク群とそれ以外を明確に分離することに成功した(High group (n=17)の4年無増悪生存率が59.8%に対してLow group (n=13)の4年無増悪生存率が8.5%, p<0.001)(下右図)(Tamura et al. Front Oncol 2020、添付文献)。初診時の末梢血単球の状態を評価することにより、個別化医療の実現に繋がる可能性を示す重要な発見である。

最新の研究から、単球はこれまでの想定以上に多様であることが示唆されており(Villani et al. Science 2017)、病態解明には単球の不均一性の解明が必須である。そこで、1細胞RNA-seqを用いた単球サブセットの不均一性解析を計画した。

新規単球サブセットの同定および単球単離法の確立を目的として、マウス末梢血を用いて単球単離の条件検討を行った後、ヒト末梢血を用いた解析を行った。

健康人末梢血単球を用いて1細胞RNA-seqを行い、得られたデータをUMAPで次元削減したところ、表面抗原で規定した単球集団中に4つの単球サブセット(UMAP_1、UMAP_2、UMAP_3、UMAP_4)が可視化された(図2)。

次に、各単球サブセットの単離法の同定のため、UMAP_1、UMAP_2、UMAP_3、UMAP_4それぞれのサブセットに特異的に発現する遺伝子を抽出したところ、UMAP_1で27遺伝子、UMAP_2で27遺伝子、UMAP_3で102遺伝子、UMAP_4で85遺伝子が候補として抽出された(図3)。

研究・事業により期待される効果/ 神戸医療産業都市の発展に与える効果

本研究開発によって、神経芽腫の新規予後予測バイオマーカーが同定された。今後、神戸市医療産業都市発の予後予測バイオマーカーが世界で使用される可能性がある。

また、本研究により、新たな単球の不均一性解析手法が開発された。単球は、これまでの想定以上に様々な疾患病態に関与していることが明らかになってきており、本研究開発で得られた単球不均一性解析手法が、様々な疾患研究や基礎研究に応用される可能性がある。

本研究結果を応用して、神戸市医療産業都市内の企業、医療機関、研究施設などとの共同での新規診断法・治療法開発により、神戸市医療産業都市の発展に繋がることを期待される。

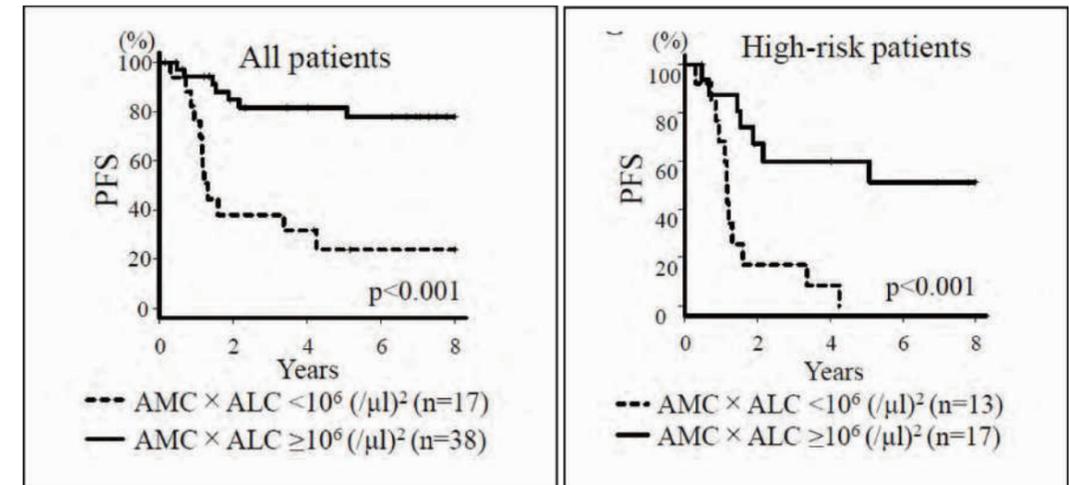
今後の展開

本研究開発で確立した独自の1細胞解析手法を用いて、神経芽腫などの患者末梢血を用いた単球の1細胞解析を行い、健康人単球との比較により、疾患特異的単球サブセット並びに治療標的候補分子の同定を行う予定である。末梢血単球を解

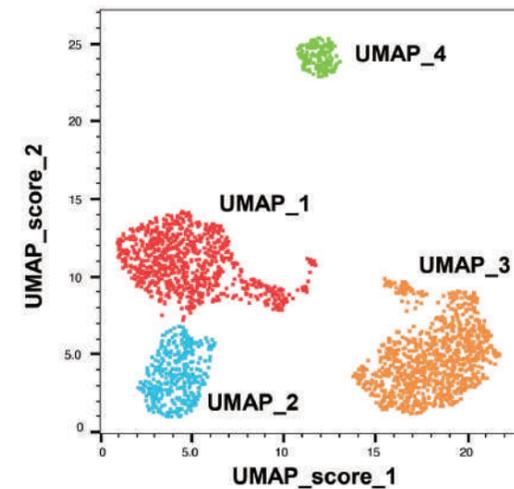
析することにより、低侵襲に予後予測や患者毎の個別化治療が可能になることが期待される。さらに、本研究開発で発見した予後予測バイオマーカーの有用性を全国臨床試験で検証予定である。

また、本研究で開発した単球不均一性解析手法は、がんのみならず、単球が関与する様々な疾患病態解明や基礎研究に応用できる技術革新となることが期待される。

(図1)



(図2)



(図3)

