

研究計画書

1. 研究の名称

髄芽腫における Gli3 発現の臨床的意義の検討

2. 研究の目的及び意義

【背景】

髄芽腫 (medulloblastoma : MB) は小児に好発し、小脳虫部を中心に発生して第四脳室および小脳半球に浸潤性に増殖し、髄液播種を起こしやすい特性を有する WHO grade IVに分類される未分化悪性腫瘍である。

従来、髄芽腫の予後予測には臨床リスク分類である Packer の分類 (3 歳未満、転移あり、術後残存病変が 1.5 cm²以上のうち、ひとつでも有するものを高リスク、それ以外を標準リスクとする)¹⁾が用いられている。しかし、3 歳未満の乳幼児は神経発達が未熟なために予防的頭蓋脊髄照射を省いた治療を行うことがあり、そのために治療成績が悪くなっている可能性がある。

転移評価は Chang の metastasis staging system を用いて、M0 (転移なし) から M4 (中枢神経外への転移) まで分類し、M1 (髄液の顕微鏡的細胞浸潤) 以上を転移ありとして高リスクに含める臨床試験が多い。しかし M0 と M1 については予後に差がないとの報告^{2,3)}があり、術後放射線治療に加えて化学療法を行った場合には術後残存腫瘍量は強い予後因子にならないという報告^{4,5)}もある。

髄芽腫は病理組織学的に、desmoplastic MB (D MB)、classic MB (C MB)、large cell/anaplastic MB (LC/A MB) に分類され、それぞれの頻度はおよそ 30、65、5%である⁶⁾。Medulloblastoma with extensive nodularity (MBEN) は髄芽腫全体の 5%を占め、乳幼児に多く、ソニックヘッジホッグ (SHH) シグナル異常と関連があると考えられている。D MB > C MB > LC/A MB の順に生存率が低下し、組織型が予後に関与することが知られているが^{6,7,8)}、1,000 例を超える大規模解析である MAGIC 分類 (後述) が台頭し、近年は軽視されがちである。

また、分子マーカーとしては予後良好因子として β カテニン⁹⁾ や TrkC¹⁰⁾ などがあり、予後不良因子としては MYC 遺伝子の増幅¹¹⁾ などが知られている。さらに最近では、DNA copy number analysis や mRNA expression profiling などの大規模遺伝子解析から、NanoStrings 法¹²⁾ を用いることで髄芽腫が分子学的に異なる 4 群に分類 (MAGIC 分類)^{13),14)} されることが判明し、予後との関連性も指摘されている。この髄芽腫の腫瘍発生の分子メカニズムの中で重要な役割を果たすシグナル伝達系の一つに SHH シグナル伝達系が知られている。申請者らは、髄芽腫において SHH シグナル伝達系を調節する分子マーカーの一つである glioma-associated oncogene homolog (Gli) 3 に着目した病理学的研究を行い、Gli3 の発現が、髄芽腫の神経系やグリア系への分化の指標となること、組織学的に D MB と関連があること、予後良好因子である可能性、を示した¹⁵⁾。

現在、髄芽腫の治療強度は Packer の臨床分類¹⁾ を参考に決定しているが、最近では MAGIC 分類^{12),13),14)} が重要視され、予後との関連も明らかになりつつあることから、分子マーカーを用いた新たなリスク分類とそれに基づく治療法の個別化も今後検討がなされるであろう。この髄芽腫の分子リスク分類の流れの中で、Gli3 は key molecule となりうる分子であり、今後さらに多くの症例で検証されるべき事項と考える。

- ・基本情報：発症年齢、性別、リスク分類、腫瘍の局在、治療内容。
- ・病理学的情報：組織型、Ki-67 標識率、 β カテニン染色など。
- ・遺伝子・染色体情報：MAGIC 分類、TrkC、monosomy 6、Gli2 amplified、14q loss、MYC amplified、iso 17q、Chromosome 11 loss、Chromosome 17 gain など。
- ・臨床経過に関する情報；初回手術日、転帰（生存、再発、死亡）、二次がんの発生など。

(2) 腫瘍の組織型の判定

腫瘍の組織型は HE 染色や鍍銀染色を用いて、WHO 分類に従い MBEN、D/N MB、C MB、LC/A MB に分類する。

(3) 腫瘍の分化度の有無の判定

腫瘍の分化度は下記抗体を用いた免疫染色で評価し、分化なし（UD 群）、神経分化あり（ND 群）、グリア分化あり（GD 群）、に再分類する。神経分化については抗 NeuN 抗体と抗 Doublecortin 抗体を、グリア系については抗 GFAP 抗体を用い、アビジン-ビオチン複合体で標識し、ジアミノベンジジンで可視化する。Gli3 の発現状態は抗 Gli3 抗体を用いた免疫染色で評価し、腫瘍細胞の 20%以上で核を縁取るような特徴的な染色を示している場合を Gli3 陽性と判定する。判定の困難な症例に関しては、Gli3 と NeuN もしくは Gli3 と GFAP の二重蛍光免疫染色を行い、分布が一致していることを確認する。

(4) MAGIC 分類における Gli3 の位置づけの検討

2013 年以降、日本小児がん研究グループの『小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築 I. 髄芽腫、上衣腫』にて NanoStrings 法を用いて MAGIC 分類による分類を行われており、その結果と Gli3 との関連を検討する。2013 年以前の症例に関しては同研究の解析機関である独立行政法人国立病院機構大阪医療センター臨床研究センター再生医療研究室の金村米博先生に NanoStrings 法による解析を依頼する。協力可能な施設においては、各症例につき凍結生標本 50-100mg 以上もしくは $5\mu\text{m}$ 厚 10 枚以上の FFPE 切片をサンプルチューブに入れ、大阪医療センター臨床研究センター再生医療研究室へ送付する。

(5) 統計分析

各群における全生存率と無イベント生存率は Kaplan-Meier 法を用いて評価する。死亡、病気の進展、再発、二次がんの発生をイベントと判断する。生存曲線の群間差はログランク法を用いて検定する。また、(1)に示した他の臨床情報に関しても、カイ二乗検定や G 検定を用いて群間差の有無を検討する。

【将来の研究利用】 いずれかに

なし

あり（髄芽腫に関して新たな知見が報告された場合、本研究で得られた検体を用いて検証、再検討することがありうる。）

5. 研究対象者の負担等

治療で摘出された髄芽腫標本が研究対象であるため、研究対象者に新たな侵襲や負担を強いることはない。

6. 研究対象者からの同意取得方法

【取得方法】 いずれかに

新規試料・情報による研究

文書 IC

文書により説明し、文書により同意を受ける。

口頭 IC (記録作成を含む)

(口頭 or 文書) により説明し、(口頭 or 文書) により同意を受ける。

記録作成は、同意の日時、説明方法、説明者、同意事項等について記載する。

記載場所：

オプトアウト (情報公開+拒否機会)

あらかじめ情報を通知・公開し研究対象者等が拒否できる機会を保証する。

公開場所 (URL)：

既存試料・情報による研究

過去に診療の一環で採取された既存試料 (FFPE 組織試料) の残余を使用するため、研究対象者からの同意取得方法はオプトアウトを選択する。

文書 IC

文書により説明し、文書により同意を受ける。

口頭 IC (記録作成を含む)

(口頭 or 文書) により説明し、(口頭 or 文書) により同意を受ける。

記録作成は、同意の日時、説明方法、説明者、同意事項等について記載する。

記載場所：

オプトアウト (情報公開+拒否機会)

情報を通知・公開し研究対象者等が拒否できる機会を保証する。

公開場所 (URL)：大分大学医学部小児科学講座のホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/pediatrics/>

【代諾者等】 いずれかに

なし

あり (理由：被験者にもわかりやすく説明するが、被験者が乳幼児もしくは重篤な精神発達遅滞を伴う場合は、インフォームド・コンセントを与える能力を欠くため、保護者を代諾者として同じく説明する。)

【インフォームド・アセント】 いずれかに

行う (意思表示可)

行わない (理由：)

7. 研究対象者のプライバシー保護

【匿名化の方法】

診療情報は、解析前に住所、氏名、生年月日、患者 ID を削除し、符号を付して匿名化することにより個人の特特定が出来ないようにする (連結可能匿名化)。対応表は各施設において、研究責任者または分担研究者が鍵の掛かる場所で厳重に保管する。

【公表の配慮】

得られた結果は、学会や医学雑誌に発表されることや、治療の効果が認められる場合は、厚生労働省に提出されることとなるが、研究の結果を公表する際は個人が特定できないようプライバシーに配慮する。

8. 試料および情報の保存

【試料】

保存方法：連結可能匿名化したのち研究責任者が大分大学医学部小児科学講座の研究室で厳重に保管する。対応表は別のセキュリティ設定をした記録媒体に保管する。

期 間：論文発表後から5年間

廃棄方法：大分大学医学部の定める廃棄方法に従い廃棄する。

【情報（研究に用いられる情報に係る資料を含む）】

保存方法：連結可能匿名化したのち研究責任者が大分大学医学部小児科学講座の研究室で厳重に保管する。対応表は別のセキュリティ設定をした記録媒体に保管する。

期 間：論文発表後から10年間

廃棄方法：紙媒体の診療情報はシュレッダーを用いて破棄し、電子媒体の診療情報はデータが復元できない処理を施したうえで廃棄する。

9. 研究機関の長への報告内容及び報告方法

「倫理委員会・ヒトゲノム研究倫理審査委員会申請の手引」に基づき、医学部長に所定の報告書を提出する。

10. 遺伝的特徴に関する重要な知見

なし（本研究で得られる可能性のある遺伝情報は腫瘍組織の遺伝子変異（somatic mutation）に関してのみであり、生殖細胞変異（germline mutation）に関しては検討しない。従って、遺伝カウンセリングが必要な事態は基本的に生じない。）

あり（ ）

11. 健康被害に対する補償および賠償

なし

あり（ ）

12. 研究資金

本研究は、公的な資金である大分大学医学部小児科学講座の基盤研究経費ならびに寄附金を用いて研究を行う。

13. 本研究に係る利益相反

本研究は大分大学医学部小児科学講座の基盤研究経費ならびに寄附金を資金として研究を行う。この他に特定の団体からの資金提供や薬剤等の無償提供などは受けておらず、研究組織全体に関して起こりうる利益相反はない。

14. 研究の実施場所

大分大学医学部 小児科学講座研究室

15. 研究期間

倫理委員会承認日から 2020 年 3 月 31 日まで。

16. 研究の実施体制

【本学における研究組織】

| | 所属・職名 | 氏名 | 経験年数 |
|-------|------------------------------|----------|-----------|
| 研究責任者 | 大分大学医学部小児科学講座 | 講師 宮原 弘明 | 15 年 |
| 研究分担者 | 大分大学医学部小児科学講座 | 教授 井原 健二 | 27 年 |
| | 大分大学小児科大分こども急性救急疾患学部門医療・研究事業 | 教授 末延 聡一 | 27 年 |
| | 大分大学医学部小児科学講座 | 助教 平野 直樹 | 7 年 |
| 連絡先 | 大分大学医学部小児科学講座 | 宮原 弘明 | (内線 2095) |

【研究全体の実施体制】

研究分担者 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室 室長 金村 米博

研究協力者

| | | |
|--------------------|------------|-------------|
| 大阪市立総合医療センター | 小児血液腫瘍科 | 副院長・部長 原 純一 |
| 〃 | 〃 | 副部長 岡田 恵子 |
| 〃 | 〃 | 医員 山崎 夏維 |
| 大阪大学大学院医学系研究科 | 脳神経外科 | 助教 香川 尚己 |
| 金沢医科大学医学部発生発達医学 | 小児科 | 教授 犀川 太 |
| 岐阜大学大学院医学系研究科 | 小児病態学講座 | 併任講師 小関 道夫 |
| 九州大学病院 | 小児科学講座 | 講師 古賀 友紀 |
| 高知大学 | 小児科 | 准教授 久川 浩章 |
| 佐賀大学医学部附属病院 | 小児科学講座 | 助教 西 眞範 |
| 滋賀医科大学 | 小児科学講座 | 講師 多賀 崇 |
| 自治医科大学とちぎ子ども医療センター | 小児脳神経外科 | 教授 五味 玲 |
| 筑波大学医学医療系臨床医学域 | 小児科学 | 准教授 福島 敬 |
| 〃 | 脳神経外科学 | 准教授 山本 哲哉 |
| 千葉県がんセンター | 脳神経外科 | 部長 井内 俊彦 |
| 徳島大学病院 | 小児科 | 講師 渡辺 浩良 |
| 独協医科大学 | 小児科学講座 | 講師 佐藤 雄也 |
| 東京女子医科大学 | 小児科学講座 | 准教授 鶴田 敏久 |
| 東京大学 | 小児科学講座 | 准教授 滝田 順子 |
| 名古屋市立大学大学院医学研究科 | 新生児・小児医学分野 | 助教 伊藤 康彦 |
| 〃 | 〃 | 助教 亀井 美智 |
| 名古屋大学大学院医学系研究科 | 小児科学 | 助教 村松 秀城 |
| 新潟大学脳研究所 | 病理学講座 | 教授 柿田 明美 |
| 〃 | 脳神経外科学分野 | 教授 藤井 幸彦 |
| 〃 | 〃 | 特任准教授 吉村 淳一 |
| 〃 | 〃 | 助教 棗田 学 |

日本医科大学千葉北総病院

小児科

准教授

浅野 健

兵庫県立こども病院小児がん医療センター

血液・腫瘍内科

部長

長谷川 大一郎

17. 相談等の対応

【相談窓口】

担当者氏名：宮原 弘明

連絡先：大分大学医学部小児科学講座

電話 097-586-5833

【公開先】

大分大学医学部小児科学講座ホームページ

URL：<http://www.med.oita-u.ac.jp/pediatrics/>

18. 研究に関する情報公開

研究対象者の求めに応じ、他の研究対象者等の個人情報等の保護及び当該研究の独創性の確保に支障がない範囲内で研究計画書及び研究の方法に関する資料の情報公開を行う。資料の入手又は閲覧の方法は上記の相談窓口へ問い合わせいただく。

19. その他

本研究の研究途上において、さらに共同研究者の追加の必要が生じた場合は、共同研究者から患者の組織ならびに臨床情報の提供を受けることになるが、その際は本学医学部倫理委員会の承認、さらに医学部長の許可を得た上で実施する。

20. 参考文献

- 1) Packer RJ: Childhood medulloblastoma: progress and future challenges. *Brain Dev* 21:75-81, 1999.
- 2) Zeltzer PM, Boyett JM, Finlay JL, et al.: Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 17(3): 832-45, 1999.
- 3) Kortmann RD, Köhl J, Timmermann B, et al.: Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the German prospective randomized trial HIT '91. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 46(2): 269-79, 2000.
- 4) Albright AL, Wisoff JH, Zeltzer PM, et al.: Effects of medulloblastoma resections on outcome in children: a report from the Children's Cancer Group. *Neurosurgery.* 38(2): 265-71, 1996.
- 5) Packer RJ, Siegel KR, Sutton LN, et al.: Efficacy of adjuvant chemotherapy for patients with poor-risk medulloblastoma: a preliminary report. *Ann Neurol.* 24(4): 503-8, 1988.
- 6) Polkinghorn WR, Tarbell NJ: Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. *Nat Clin Pract Oncol.* 4(5): 295-304, 2007.
- 7) Partap S, Fisher PG: Embryonal tumors. In Gupta N, Banerjee A, Haas-Kogan D(eds): *Pediatric CNS Tumors*, 2nd ed, Springer, Berlin Heidelberg, pp 89-114, 2010.

- 8) Pizer BL, Clifford SC: The potential impact of tumour biology on improved clinical practice for medulloblastoma: progress towards biologically driven clinical trials. *Br J Neurosurg.* 23(4): 364-75, 2009.
- 9) Ellison DW, et al. β -Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: The United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *J Clin Oncol* 23:7951-7957, 2005.
- 10) Grotzer MA, et al.: TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. *J Clin Oncol* 18:1027-1035, 2000.
- 11) Eberhart CG, et al.: Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and Anaplasia. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:441-449, 2004.
- 12) Northcott PA, et al.: Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol* 123: 615-626, 2012.
- 13) Northcott PA, et al.: Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 488: 49-56, 2012.
- 14) Taylor MD, et al.: Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123: 465-472, 2012.
- 15) Miyahara H, et al.: Neuronal differentiation associated with Gli3 expression predicts favorable outcome for patients with medulloblastoma. *Neuropathology* 34:1-10, 2014.

本院ならびに共同研究施設で髄芽腫の治療を受けられた患者さん・ご家族の皆様へ

～手術時（2000年4月1日から2017年3月31日まで）に摘出された癌組織の医学研究への使用のお願い～

【研究の目的について】

髄芽腫は小児の小脳に好発する悪性腫瘍です。これまで、髄芽腫の予後予測には Packer の分類（3歳未満、転移あり、術後残存病変が 1.5 cm²以上のうち、ひとつでも有するものを高リスク、それ以外を標準リスクとする）が用いられ、治療の強さが決定されてきました。最近では、遺伝子解析の技術が進歩し髄芽腫が分子学的に異なる 4 群に分類されることが証明され（これを MAGIC 分類といいます）、髄芽腫が形成される過程でウイングレス伝達系やソニックヘッジホッグ伝達系と呼ばれる刺激伝達経路が重要な役割を果たすことが明らかになってきました。本研究の研究者らは、ソニックヘッジホッグ伝達系を調節する分子の一つである Gli3 に着目した髄芽腫の研究を行い、Gli3 の働きによって髄芽腫を構成する未熟な細胞が神経細胞やグリア細胞へ成熟すること、Gli3 によって神経細胞への成熟傾向を示す髄芽腫が予後良好である可能性を示しました（宮原ら、Neuropathology、2014年）。

本研究では、全国の賛同を得られた医療研究施設から髄芽腫の症例を集めて、本研究の研究者らが過去の研究で得た知見を再検証します。具体的には、①髄芽腫における Gli3 の発現と患者さんの予後との関連、②Gli3 が髄芽腫の治療戦略を決定するうえでの指標となりうるか、③MAGIC 分類における Gli3 の位置づけ、を明らかにして、将来的には Gli3 が髄芽腫の予後予測や分子標的療法に用いられることを目指しています。

【使用させていただく組織（試料）等について】

本院ならびに共同研究施設におきまして、既に髄芽腫の治療を受けられた患者さんの腫瘍組織（試料）を医学研究へ応用させていただきたいと思っております。その際、腫瘍組織を調べた結果と診療情報（例えば治療効果がどうであったかなど）との関連性を調べるために、患者さんの診療記録（カルテやレントゲン写真など）を調べさせていただくこともあります。なお患者さんの腫瘍組織（試料）及び診療記録（カルテ）を使用させていただきますことは本学医学部倫理委員会において外部委員も交えて厳正に審査され承認されています。また、患者さんの試料および診療情報は、国の定めた「人を対象とする医学系研究に関

する倫理指針」に従い、匿名化したうえで管理しますので、患者さんのプライバシーは厳密に守られます。当然のことながら、個人情報保護法などの法律を遵守いたします。

【使用させていただく組織（試料）の保存等について】

腫瘍組織（試料）の保存は論文発表後 5 年間を基本としており、保存期間終了後は、腫瘍組織（試料）を焼却処分します。ただし、研究の進展によってさらなる研究の必要性が生じた場合は 5 年間を超えて保存させていただきます。また、患者さんの診療情報については、論文発表後 10 年間保存し、保存期間終了後はデータが復元できない処理を施した上で廃棄します。

【患者さんの費用負担等について】

本研究を実施するに当たって、患者さんの費用負担はありません。また、本研究の成果が将来薬物などの開発につながり、利益が生まれる可能性があります。万が一、利益が生まれた場合、患者さんにはそれを請求することはできません。

【研究資金】

本研究においては、公的な資金である大分大学医学部小児科学講座の基盤研究経費ならびに寄付金を用いて研究が行われ、患者さんの費用負担はありません。

【利益相反について】

この研究は、上記の公的な資金を用いて行われ、特定の企業からの資金は一切使いません。「利益相反」とは、研究成果に影響するような利害関係を指し、金銭および個人の間接的な関係を含みますが、本研究ではこの「利益相反（資金提供者の意向が研究に影響すること）」は発生しません。

【研究の参加等について】

本研究へ腫瘍組織（試料）を提供するかしないかは患者さんご自身の自由です。従いまして、本研究に腫瘍組織（試料）を使用してほしくない場合は、遠慮なくお知らせ下さい。その場合は、患者さんの腫瘍組織（試料）は研究対象から除外いたします。また、ご協力いただけない場合でも、患者さんの不利益になることは一切ありません。なお、これらの研究成果は学術論文として発表することになりますが、発表後に参加拒否を表明された場合、すでに発表した論文を取り下げることがありません。

患者さんの腫瘍組織を使用してほしくない場合、その他、本研究に関して質問などがありましたら、主治医または以下の研究責任者までお申し出下さい。

【研究責任者】

879-5593 大分県由布市挾間町医大ヶ丘 1-1
大分大学医学部小児科学講座 講師 宮原弘明 (みやはらひろあき)
電話番号 097-586-5833