

こうした症例に対する積極的治療の必要性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

- 1)黒田達夫、佐伯守洋、中野美和子ほか：横紋筋肉腫治療における外科治療の意義の検討。第15回日本小児がん学会（1999年11月、兵庫県宝塚市）
- 2)黒田達夫、佐伯守洋、中野美和子ほか：神経芽細胞腫微小転移の検索と外科手術の意義。第37回日本小児外科学会（2000年6月、福岡県博多市にて発表予定）
- 3)Kuroda T, Saeki M, Nakano M, et al : Surgical treatment of neuroblastoma with micro-metastasis. The 33rd Annual meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgery. (Las Vegas, Nevada. in press)

がん体質と免疫に関する研究

「小児がんの遺伝的・発生物学的要因の解明と診断への応用」

分担研究者 藤本純一郎 国立小児病院小児医療研究センター病理病態研究部長

研究要旨

1) B細胞の初期分化過程における Src 型チロシンキナーゼの発現様式が、その分化に伴って変化してゆくことを明らかにした。またこれに基づいて B 前駆細胞型急性リンパ芽球性白血病細胞を分類し、Src 型チロシンキナーゼの発現様式の差が予後と関連する可能性を明らかにした。

2) 神経芽細胞腫の細胞膜上で、スフィンゴ糖脂質 GM1、GD2 および Src 型チロシンキナーゼ Yes が detergent 不溶性の糖脂質膜ドメインに局在しており、細胞の刺激伝達に関与している可能性を明らかにした。

A. 研究目的

分化・増殖・細胞死等の刺激伝達機構の解明は腫瘍発生およびその治療法の確立の上で非常に重要であるという観点から、

1) 正常 B 細胞初期分化過程における刺激伝達系の発現様式について解析し、これらの細胞を発生母体とする小児 B 前駆細胞型急性リンパ芽球性白血病 (ALL) における刺激伝達系の発現様式と比較し、その腫瘍特性との関連について検討した。

2) 神経芽細胞腫の刺激伝達と糖脂質膜ドメインとの関係について検討した。

B. 研究方法

1) 各分化段階の正常 B 細胞を骨髄、末梢血、扁桃腺より分離し、細胞膜透過処理によって細胞質内の Src 型チロシンキナーゼ Hck あるいは Lyn と細胞表面の B 細胞抗原を免疫蛍光多重染色し、フローサイトメーターを用いて個々の B 細胞の分化段階と Src 型 PTK 発

現の状況を解析した。

2) 神経芽細胞腫細胞株について、ショ糖密度勾配超遠心によって糖脂質膜ドメインを生化学的に分離し、これに含まれる糖脂質および刺激伝達関連分子について解析した。また、スフィンゴ糖脂質 GM1、GD2 に対する機能的リガンドや特異抗体を添加し、細胞内蛋白のチロシンリン酸化状態の変化や、細胞の形態的变化について検討した。

倫理面の配慮では、臨床検体の使用にあたってインフォームドコンセントを得、解析結果の公表に際して個人の特定が不可能な表現方法を用いた。

C. 研究成果

1) 正常 B 細胞、小児 B 前駆細胞型 ALL 細胞を解析した結果、B 細胞の初期分化における Src 型チロシンキナーゼの発現様式が、その分化に伴って i) Hck-/Lyn-, ii) Hck+/Lyn-, iii) Hck+/Lyn+, iv) Hck-/Lyn+ の順で変化し

てゆくことが明かとなった。また、免疫沈降により、HckおよびLynが、pro-B細胞抗原受容体あるいはpre-B細胞抗原受容体と複合体を形成している可能性が示唆された。さらに、Src型チロシンキナーゼの発現様式に基づいて小児B前駆細胞型ALLを分類したところ、Hck-/Lyn+型は他の型に比較して初発時年齢が有意に高く、予後不良群である可能性が示唆された。

2) 神経芽細胞腫細胞ではスフィンゴ糖脂質GM1、GD2が発現しており、これらはSrc型チロシンキナーゼYesとともに糖脂質膜ドメインに分画された。また、神経芽細胞腫細胞にコレラトキシン(GM1に対するリガンド)、抗GD2抗体を添加し、ウエスタンブロット解析を行った結果、いずれの場合も細胞内蛋白チロシンリン酸化の増強が認められた。また、神経芽細胞腫細胞株を無血清培地中でコレラトキシンあるいは抗GD2抗体を添加培養した場合、その細胞死の誘導に対する抑制効果が認められた。

#### D. 考察

1) B細胞初期分化において、Src型チロシンキナーゼの発現が分化段階依存的に調節され、変化してゆくことが明かとなった。この発現変化はB前駆細胞の分化・増殖刺激を伝達する上で重要な役割を担っているものと推定される。また、Src型チロシンキナーゼの発現の違いはこれらの細胞に由来する白血病の増殖能と関連性があるものと考えられる。

2) 神経芽細胞腫ではスフィンゴ糖脂質GM1、GD2およびSrc型チロシンキナーゼYesが糖脂質膜ドメインを構成しており、細胞内への刺激伝達に関与している可能性が示唆された。おそらく生体内ではこれらの糖脂

質がその未知のナチュラルリガンドと結合することによって糖脂質膜ドメインを介して細胞内へ増殖あるいは生存刺激を伝達しているものと推定される。

#### E. 結論

1) B細胞初期分化におけるSrc型チロシンキナーゼの発現様式を始めとする刺激伝達系の解明は、B前駆細胞白血病の発症機構解明、新たな予後の判定法の確立や治療法開発の上で有用であると考えられる。

2) 神経芽細胞腫でスフィンゴ糖脂質が糖脂質膜ドメインの構成分子としてその刺激伝達に関与していることが示唆された。今後の研究の進展によって神経芽細胞腫の増殖機構の新たな側面が明らかになることが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Uchida H, Kiyokawa N, Horie H, Fujimoto J, and Takeda T. The detection of Shiga toxins in the kidney of a patient with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 45:133-137, 1999.
- 2) Ishii E, Yoshida N, Kimura N, Fujimoto J, Mizutani S, Sako M, Hibi S, Nagano M, Yoshida T, Mori T, Kiyokawa N, Mohri S, Miyazaki S, Hara T. Clonal dissemination of T lymphocytes in *scid* mice from familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 32:201-208, 1999.
- 3) Asanuma H, Takahashi S, Ishikawa M, Kamiguchi K, Sato N, Poppema S,

- Fujimoto J, Kikuchi K. A monoclonal antibody, 3G12, reacts with a novel surface molecule, hal-1, with high expression in CD3-positive anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol* 106: 55-63, 1999.
- 4) Nakao H, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yamasaki S, Takeda T. A monoclonal antibody to Shiga toxin 2 which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. *Infect Immun* 67:5717-5722, 1999.
- 5) Uchida H, Kiyokawa N, Taguchi T, Horie H, Fujimoto J, Takeda T. Shiga Toxins Induce Apoptosis in Pulmonary Epithelium Derived Cells. *J Infect Dis* 180:1902-1911, 1999.
- 6) Katagiri YU, Mori T, Nakajima H, Katagiri C, Taguchi T, Takeda T, Kiyokawa N, Fujimoto J. Activation of Src family kinase Yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains. *J Biol Chem* 274:35278-35282, 1999.
- 7) Taguchi T, Kiyokawa N, Sato N, Saito M, Fujimoto J. The Characteristic Expression of Hck in Human B Cell Precursors. *Exp Hematol* in press.
- 8) Sato N, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Ohmi K, Itagaki M, Sato T, Lepage A, Lanza F, Fujimoto J. Functional conservation of platelet glycoprotein V promoter between mouse and human megakaryocytes. *Exp Hematol* in press.
- 9) Serizawa I, Amano K, Ishii H, Ichikawa T, Kusaka M, Taguchi T, Kiyokawa N, Fujimoto J. Long-term overexpression of human granulocyte colony-stimulating factor in transgenic mice: persistent neutrophilia with no increased mortality for more than one year. *Cytokine* in press.
- 10) 藤本 純一郎. G-CSF による hybrid resistance の抑制. *臨床免疫* 32:348-354, 1999.
- 11) 国仲 伸男, 渡司 浩幸, 桶井 重勝, 宮内 潤, 藤本 純一郎. パラフィン切片による悪性リンパ腫のマーカー診断. *検査と技術* 27:1122-1126, 1999.
- 12) 藤本 純一郎. 新分類からみた小児のリンパ腫. *病理と臨床* 17:463-469, 1999.
2. 学会発表
- 1) 田口 智子, 清河 信敬, 藤本 純一郎. B 前駆細胞型急性リンパ芽球性白血病における Src 型チロシンキナーゼの発現様式とその意義. 第88回日本病理学会総会, 東京, 4月6-8日, 1999. (日本病理学会誌 88:154, 1999)
- 2) 佐藤 範英, 清河 信敬, 藤本 純一郎. マウス・ラット血小板GPV に対する単クローン性抗体の樹立とその解析. 第88回日本病理学会総会, 東京, 4月6-8日, 1999. (日本病理学会誌 88:155, 1999)
- 3) 田口 智子, 清河 信敬, 烏山 一, 藤本 純一郎. pro-B ALL 細胞株において Lyn および Hck は pro-B 細胞受

容体と会合する. 第61回日本血液学会  
総会, 東京, 19-21日, 1999. (Int J  
Hematol 69-Supple 1:119, 1999.)

4) 佐藤 範英, 清河 信敬, 藤本 純一  
郎. マウスGPV遺伝子プロモーター領  
域の解析. 第61回日本血液学会総会,  
東京, 19-21日, 1999. (Int J Hematol  
69-Supple 1:254, 1999.)

5) 清河 信敬, 田口 智子, 森 鉄也,  
片桐 洋子, 藤本 純一郎. CD77 を介  
するB細胞のアポトーシス誘導におけ  
るcaspaseの活性化. 第29回日本免疫  
学会総会, 京都, 12月1-3日, 1999.  
(日本免疫学会総会・学術集会記録  
29:180, 1999)

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

小児難治性白血病における生物学的特徴と遺伝的背景の解明に関する研究

国立小児医療研究センター

ウイルス研究室

水谷修紀

研究要旨

小児白血病の原因について薬物代謝酵素遺伝子NQO1の多型性との相関を調べたが、有意差はでなかった。一方種々のアポトーシス刺激による染色体転座誘導実験を行ったところ、白血病に見られる特有の遺伝子異常を誘導できることが判明した。今後内的要因、外的要因の双方からの原因探索が求められる。

A. 研究目的

白血病には病型特異的染色体異常が存在し、臨床像とよく相関することが知られている。特に乳児白血病では染色体11q23に位置するMLL遺伝子の関わる転座が多くを占めることが知られており、本邦の乳児白血病症例の62%でMLL遺伝子再構成が認められた。乳児白血病におけるMLL遺伝子切断点はtopoisomerase II阻害剤使用後の二次性白血病の切断点とほぼ同じ部位に位置しており、両者の発症には同様の機序が関わっていると考えられている。実際Greavesらの疫学調査から乳児白血病症例では患児を妊娠中に母親がベンゼンなどの有機溶媒、薬剤、殺虫剤などに暴露されていた頻度が有意に高いことが示されている。

染色体転座を起こすためにはまずDNAのdouble strand breakが起こること、そしてdouble strand breakの修復過程で間違った相手と結合することが必要と考えられる。さらにその背景には転座を起こしやすい何らかの“遺伝的要因”が存在する可能性も考えられる。私たちはこの3つの点に焦点を絞り乳児・小児白血病に特徴的なMLL遺伝子異常およびTEL-AML1融合遺伝子を例に染色体転座機構

の検討を行った。

B. 研究方法

平成5年1月から平成8年3月までの間に乳児白血病共同研究委員会に登録された乳児白血病105例を対象とした。体内に取り込まれた薬剤の多くはquinone代謝酵素であるNAD(P)H:quinone oxidoreductase(NQO1)やglutathione S-transferaseなどによって分解されるが、これらの酵素には活性の異なるpolymorphismが存在することが知られている。これらのpolymorphismと乳児白血病発症との関連を検討するために白血病細胞よりDNAを抽出、NQO1コドン187変異を検出するプライマーを用いてPCRを行い、そのプロダクトのHinf 消化のパターンで変異の有無を判定した(図1)。GSTT1についてはcDNA nt 469-723、GSTM1についてはnt 2401-2619をPCRで増幅し、遺伝子欠失の有無を判定した。

続いて乳児白血病症例および健常人末梢血より樹立したEB LCLを用いてベンゼン系薬剤やその他の薬剤に対するMLL遺伝子切断の有無をlinker mediated PCR(LM-PCR)法で検討した。プライマーはMLL遺伝子intron 8の二次性および乳児白血病での転座切断点集中領

域の切断を検出するよう設定した。同様に小児ALL cell line RS4;11およびTS-2を用いてTELおよびAML1遺伝子のdouble strand breakを検出した。プライマーはTEL intron 5、AML1 intron 1に設定した。apoptosis刺激によるTEL遺伝子再構成の検出にはinverse PCR法を用いた。またTEL exon 5にsense primerを、AML1 exon 3、4にantisense primerを設定しapoptosis刺激後のTEL-AML1融合遺伝子形成を検出した。薬剤刺激には1 $\mu$ M VP16、20mM Salycilic acid、5 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、10mM Caffeineを用いた。

なお、用いた検体は国立小児病院、ならびに昭和大学付属病院、東海大学医学部の倫理委員会の審査を得たのち用いた。

### C. 研究結果

乳児白血病症例におけるNQO1のinactive polymorphismの頻度を表1に示す。乳児白血病症例ではGSTT1、GSTM1の欠失の頻度はコントロール群に対し差が認められなかったが、NQO1については酵素活性の低いコドン187のinactive polymorphism (Pro $\rightarrow$ Ser変異)の頻度がコントロール群に対して東京地区のコントロールと比べれば若干高く、東海地区のものに比べると有意差はなく、全体徒比較しても有意差は認められないことが判明した。

次に本当にこれらの化学物質がDNA double strand breakを起こしうるかどうかについてlinker mediated PCR法を用いた検討を行った。その結果VP16のみならずベンゼン系薬剤やH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>などでもMLL遺伝子の切断が起こることが分かった。また乳児白血病症例では健常人に比べてVP16に対する感受性が高いことが示唆された。小児白血病に高頻度に異常が認められるTEL、AML1遺伝子もMLL同様薬剤刺激やapoptosis刺激によってDNA double strand breakを起こすことが明らかになった(図2)。

TEL-AML1遺伝子を例に遺伝子の異常修

復の過程をinverse PCR法で検討した。その結果DNA double strand breakを起こしたTEL遺伝子はその修復過程で誤った遺伝子と融合し、結果として染色体転座を形成することが明らかになった(図3)。そしてその結果として極微量ではあるがTEL-AML1融合遺伝子も形成されることが分かった(図4)。

### D. 考察

今回の研究で本邦の乳児白血病症例ではquinone代謝酵素のinactive polymorphismはコントロール群に対して有意差はなかった。欧米諸国のコントロール群のNQO1 inactive polymorphismの頻度が20%前後であるのに対し本邦や台湾、韓国などでは約半数に認められており、民族間の違いが結果に影響している可能性もある。

MLL遺伝子はTopoisomerase II阻害剤だけでなくベンゼン系薬剤やH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>などによっても切断を受けることが分かった。特にVP16を添加した場合乳児白血病EB-LCLでは高頻度にMLL遺伝子の切断を生じており、乳児白血病症例はVP16に対し感受性を有している可能性がある。

染色体転座の形成過程を検討するため小児白血病で高頻度に認められる12;21転座を例に検討を行ったが、inverse PCRの結果から薬剤やapoptosis刺激後にはDNA double strand breakの修復過程として様々なTEL関連転座が生じ、その一部としてTEL-AML1融合遺伝子も形成されと考えられた。

以上から様々な薬剤刺激やapoptosis刺激がDNAの切断を生じ、その異常修復が小児白血病に特異的な染色体異常を引き起こす可能性が示された。またその背景には種々の薬物代謝酵素のinactive polymorphismなどの遺伝的素因も影響している可能性も考えられており今後の検討が必要と思われる。

### E. 結論

小児白血病、乳児白血病において遺伝的要因と細胞死刺激など環境要因が関係している可能性が高く、今後両方の側面からの検討が必要である。

F.

1. 論文発表

1. Miyauchi J, Asada M, Tsunematsu Y, Kaneko Y, Kojima S, Mizutani S. Abnormalities of the p53 Gene in Juvenile Myelomonocytic Leukaemia. *Br.J.Haematol.*106:980-986,1999
2. Nagano M, Kimura N, Ishii E, Yoshida N, Yoshida T, Sako M, Hibi S, Imashuku S, Miyazaki S, Hara T, Mizutani S. Clonal expansion of  $\alpha\beta$ -T Lymphocytes with inverted J  $\beta$  1 bias in familial hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Blood* 94 (7):2374-82,1999
3. Shigeta T, Takagi M, Delia D, Chessa L, Iwata S, Kanke Y, Asada M, Eguchi M, Mizutani S. Defective control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint in heterozygous carriers of ATM mutations. *Cancer Res* 59:2602-2607,1999
4. Delia D, Mizutani S, Tagliabue E, Fontanella E, Asada M, Yamada T, Taya Y, Prudente S, Frati L, Pierotti M, Chessa L. ATM protein and p53-serine 15 phosphorylation in Ataxia-Telangiectasia (AT) patients and AT heterozygotes. *Br. J. Cancer* (in press)
5. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytic differentiation. *EMBO J.* 18 (5):1223-1234,1999
6. Takagi M, Shigeta T, Asada M, Iwata S, Nakazawa S, Kanke Y, Ishimoto K, Mizutani S. DNA damage associated cell cycle and cell death control is differentially modulated by caffeine in clones with p53 mutations. *Leukemia* 13:70-77,1999
7. Iwata S, Sato Y, Asada M, Takagi M, Tsujimoto A, Inaba T, Yamada T, Sakamoto S, Yata J, Shimogori T, Igarashi K, Mizutani S. Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase(ODC) required for cell growth and transformation. *Oncogene* 18:165-172,1999
8. Ishii E, Yoshida N, Kimura N, Fujimoto J, Mizutani S, Sako M, Hibi S, Nagano M, Yoshida T, Mori T, Kiyokawa N, Mohri S, Tanaka T, Miyazaki S, Hara T. Clonal dissemination of T-lymphocytes in scid mice from familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 32 (3) : 201-208,1999
9. Asada M, Yamada T, Fukumoto K, Mizutani S. p21Cip1/WAF1 is important for differentiation and survival of U937 cells. *Leukemia* 12:1944-1950,1998.
10. 水谷修紀 ATM遺伝子と発癌 実験医学 第17巻 第5号(増刊) : 41-47, 1999
11. 水谷修紀 慢性骨髄性白血病の分子病態 医学のあゆみ 第190巻第5号 341-345, 1999
12. 水谷修紀 小児がんと遺伝 Li-Fraumeni症候群、Ataxia Telangiectasiaをめぐる最近の話題小児科診療 第62巻 第8号:1137- 1144, 1999

2. 学会発表

1. Mizutani S, Takagi M., Shigeta T, Asada M, Delia D, Chessa L. Cell cycle



and apoptosis dysregulation in Ataxia  
Telangiectasia. Losane, Switzeralnd,  
Jan.27- 30,1999

2. 浅田 穰, 山田 孝之, 一條 秀憲,  
吉田 稔, 水谷 修紀 p21Cip1 の細胞  
質発現とアポトーシス耐性の機構 第61回  
日本血液学会, 東京, 4月19-21日, 1999.
3. 小口 薫, 高木正稔, 浅田 穰, 水谷  
修紀, 岩田 力, 瀬川 昌也, 二瓶健次  
Ataxia Telangiectasia の細胞におけるプ  
ロテインキナーゼ chk2 の異常 第41回日  
本小児血液学会, 東京, 9月10-11日,  
1999.
4. Minoru Asada, Takayuki Yanmada,  
Hidenori Ichijo, Domenico Delia, Shuki  
Mizutani. Apotosis inhibitory activity of  
cytoplasmic p21Cip1/WAF1 The

Programmed Cell Death meeting. Cold  
Spring Habor, USA, Sept. 29- Oct. 3,  
1999

5. 土田 里香, 宮内 潤, 恒松 由記子,  
加藤 順也, 別所 文雄, 水谷 修紀  
横紋筋肉腫の分化における細胞周期抑制  
因子 p27/Kip1 と転写因子 AP-1 の  
coactivator p38/Jab1 の発現に関する免  
疫組織学的検討 第15回日本小児癌学会,  
宝塚, 11月18-19日, 1999.
6. 浅田 穰, 山田 孝之, 一條 秀憲,  
水谷 修紀 アポトーシス阻害因子として  
の p21CKI 第22回日本分子生物学会, 福  
岡, 12月7-10日, 1999.

G. 知的所有権の取得状況  
なし

# 小児がんの遺伝的・発生物学的要因の解明と診断への応用 小児がんの遺伝疫学的研究

分担研究者 谷村雅子（国立小児病院小児医療研究センター小児生態研究部）

**研究要旨** 小児がん全国登録の神経芽腫3808例の家族歴を解析した。発端者が神経芽腫の同胞、いとこ、おじおばの神経芽腫罹患率は、発端者が他の小児がんの場合より高率であり、LOH型の可能性が考えられる。神経芽腫の原因遺伝子として、幼時期の神経芽腫と成人女子の性器腫瘍とに関与するものの存在が示唆された。神経芽腫の予後良好型と予後不良型の相違については、両型が共通の遺伝的背景をもつ可能性も考慮に入れて検討する必要がある。

## A. 研究目的

神経芽腫の原因遺伝子には、予後不良型の神経芽腫に関与する染色体1p上の他、幾つかの候補領域が報告されているが、遺伝子の特定には至っていない。また、神経芽腫の早期発見を目的として、日本では6ヶ月児を対象としたマススクリーニングが行われているが、このスクリーニング発見例には予後良好で自然退縮する型が多く含まれていることが判明し予後不良型の神経芽腫との遺伝的異質性の有無の解明が急務の課題となっている。しかし、神経芽腫の治癒率は最近まで低く、家族発生例が稀であるため、遺伝子探索や遺伝的異質性の検討に有用な情報が少ない。

神経芽腫の原因遺伝子探索に有用な情報を提供しまた、予後良好な6カ月マススクリーニング発見例と1歳以降発生の予後不良型との遺伝的異質性の有無を検討するため、世界最大の小児がん登録資料の家族歴を解析した。

## B. 研究方法

日本小児がん全国登録は（財）がんの子供を守る会の事業として、日本小児がん学会、日本小児血液学会、日本小児外科学会の協力を得て、1969年から毎年、全国の約950の病院の小児科を対象に、小児悪性腫瘍および良性腫瘍の調査を継続しており、分担研究者は事務局を担当している。

今回は、神経芽腫例3808について、同胞、いとこ、親、おじおばの家族歴を他の小児がんと比較した。また、神経芽腫の同胞・いとこ発生例の同一家系の罹患率間における発生年齢と転帰の相違を調べた。

（倫理面への配慮） 異なる病院からの重複登録を検

出するため調査票には氏名が記載されているが、個人情報漏示なきよう資料を管理し、報告は集計結果のみとしている。

## C. 研究結果

### 1) 神経芽腫の同胞・いとこ発生

神経芽腫が同胞に発生した家系の割合は、発端者が神経芽腫の家系では0.079%で、発端者が他の小児がんの家系における0.015%より有意に高率であった。いとこの神経芽腫の発症も発端者が神経芽腫の家系の方が高率であった。

神経芽腫の同胞・いとこ発生例における神経芽腫の診断年齢は0歳から6歳まで広く分布し、同一家系内でも0歳代の予後良好型と1歳以降の悪性型の両型の発生がみられた。

### 2) 神経芽腫の親・おじおばのがん罹患

神経芽腫の親子例は登録例にはなかった。

おじおばが神経芽腫に罹患した家系の率は、発端者が神経芽腫では0.026%で、発端者がその他の小児がん家系の0.015%より高率であった。

更に、発端者が神経芽腫のおばにおいては、発端者がその他の小児がんに比して、卵巣嚢腫、卵巣腫瘍、子宮がんの発生率が有意に高く、発端者は女子が多く、神経芽腫の診断年齢は平均2.6歳と遅かった。発端者が神経芽腫の母親にも性器腫瘍が多く発生していた。

## D. 考察

発端者が神経芽腫の同胞、いとこ、おじおばの神経芽腫罹患率は、発端者が他の小児がんの場合より高率であり、LOH型の可能性が考えられる。

経芽腫罹患率は、発端者が他の小児がんの場合より高率であり、LOH型の可能性が考えられる。

神経芽腫と母親・おばの性器腫瘍の関連性は、神経芽腫発端者は一般の神経芽腫に比して、女子で発生年齢が幼児期という特徴があるので、偶然に観察されたのではなく、真に両者の関連性があるものと考えられる。更に、これらの家系では、神経芽腫発端者の同胞が流産や死産、性器腫瘍のおばの同胞のがん罹患が少なくないことから、神経芽腫の原因遺伝子として、神経芽腫の幼児期発生および成人女子の性器腫瘍発生に共通に関与するものの存在の可能性が示唆される。

同胞・いとこ発生例の同一家系に、0歳発生で予後良好型の神経芽腫と1歳以降発生で予後不良型の両型が混在していることから、両型の神経芽腫発生の遺伝的背景が全く異なるのではない可能性も考えられる。該当家系についての分子レベルでの解明が急がれる。

上記の結果と、神経芽腫に合併する先天奇形や染色体異常の解析結果と考え併せて、家系分析を進めたい。

## E. 結論

神経芽腫の原因遺伝子として、既知の染色体1P領域の他に、女子の幼児期の神経芽腫と成人女子の性器腫瘍とに関与するものの存在が示唆された。

神経芽腫の予後良好型（6ヶ月スクリーニング発見例）と1歳以降発生の予後不良型との遺伝的相違については、両型が同一家系に発生している家系の存在から、両型が共通の遺伝的背景をもつ可能性も考慮に入れて検討する必要があると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Tsuchida Y, Ikeda H, Shitara T, Tanimura M.

Evaluation of the results of neuroblastoma screening at six months of age.

Med Ped Oncol 34 :80-81, 2000.

Kawamura S, Suzuki Y, Tamai Y, Takami H, Tsushima K, Munakata A, Yokoyama M, Saito S, Sakata Y, Tanimura M, Mikami S.

Acute leukemia in parent and offspring.

Hirosaki Med J 50: 209-214, 1999.

谷村雅子

小児がん全国登録における新生児期の腫瘍。  
金原出版 40: 69-75, 1999.

小児がん全国登録委員会

小児悪性新生物全国登録登録委員会報告-1996年度成績。小児がん 36:118-141, 1999.

### 2. 学会発表

鈴木裕子, 河村節子, 玉井佳子, 高見秀樹, 対馬健一, 坂田 優, 谷村雅子, 棟方昭博, 横山 碓

小児急性白血病から調査した親子白血病。

第61回日本血液学会, 4月19日, 1999.

Yamamoto K, Ito E, Hayashi Y, Asami T, Ohta S, Mabuchi O, Higashigawa M, Kawasaki H, Tanimura M.

Incidence and mortality of neuroblastoma in 7 prefectures in Japan, before vs after screening and in unscreened vs screened children.

International Society of Pediatric Oncology 31th Meeting, Canada, September 27, 1999.

谷村雅子, 小林 登, 横山 碓, 金子道夫, 松井一郎

小児がんと先天奇形との合併の臓器系統別解析。

第58回日本癌学会総会, 広島, 9月29日, 1999.

池田 均, 平戸純子, 土田嘉昭, 谷村雅子

肝芽腫における肝組織内のDNA活性酸素障害の同定。

第58回日本癌学会総会, 広島, 9月30日, 1999.

谷村雅子, 松井一郎, 小林 登, 横山 碓, 金子道夫

異なる臓器における小児がんと先天異常との合併状況。

日本人類遺伝学会第44回大会, 仙台, 11月18日, 1999.

池田 均, 丸山憲一, 小泉武宣, 平戸純子, 谷村雅子, 土田嘉昭

超低出生体重児における肝芽腫とDNA活性酸素障害。

第15回小児がん学会, 宝塚, 11月19日, 1999.

## G. 知的所有権の取得状況 なし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）  
分担研究報告書

神経芽腫の分化における細胞周期調節因子の役割に関する研究

分担研究者 宮内 潤 国立小児病院研究検査科長

研究要旨

細胞周期調節因子のS期への進行の抑制的調節因子である cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor の一つの p27<sup>Kip1</sup> の発現と神経芽腫の分化との関連を解析した。p27<sup>Kip1</sup> は分化初期（花冠細線維型神経芽腫）には核内に弱く発現するが、分化の途中段階（低分化型神経節芽腫）では細胞質内に強陽性となる。in vitro においても神経芽腫の細胞株 TGW の分化誘導過程において p27<sup>Kip1</sup> の発現が細胞質内に亢進することが western blot 法で証明された。p27<sup>Kip1</sup> の核から細胞質への輸送と分解に関与するとされる p38<sup>MAPK</sup> も、免疫組織化学にて p27<sup>Kip1</sup> と類似した局在変化を示した。これらの結果より、p27<sup>Kip1</sup> は神経芽腫の分化に関連して細胞質にて産生ならびに分解が亢進することが示唆され、腫瘍の分化に何らかの役割を果たすものと考えられた。

A. 研究目的

乳児神経芽腫にしばしばみられる自然退縮という現象の一つの機序として、腫瘍の分化による増殖の停止が関与する可能性が考えられているが、その詳細な機序は知られていない。自然退縮を期待しにくい年長児の神経芽腫との違いが何に起因するのかを解明することは、新しい神経芽腫の治療法の開発につながることを期待される。細胞周期進行に抑制的に働く負の調節因子が、がんの分化や患者の予後に関与するという結果が近年報告がなされていることから、本研究では、細胞周期のS期への進行を停止させる働きをもつ cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor の一つである p27<sup>Kip1</sup> の発現と神経芽腫の分化との関連を病理組織学的に検

討した。

B. 研究方法

神経芽腫の分化に関連した代表的な組織型について、腫瘍組織切片を用いて p27<sup>Kip1</sup> の発現と分化度の関連を免疫組織化学にて検討した。

神経芽腫の細胞株 TGW は、all-trans 型レチノイン酸あるいは bromodeoxy uridine (BrdU) で存在下では分化が誘導され神経突起を形成するが、これらの分化誘導剤の非存在下では明らかな分化を示さない。培養神経芽腫の分化誘導に伴う p27<sup>Kip1</sup> の発現変化を、免疫組織化学ならびに Western blot 法にて解析した。

p27<sup>Kip1</sup> の核内から核外への輸送とそれに引き続く proteasome による分解を促進

する働きをもつとされる p38<sup>Jab1</sup> の局在を、腫瘍組織の切片を用いた免疫組織化学にて検索した。

本研究は病理組織ならびに細胞株を用いた蛋白発現の研究であり、患者の遺伝情報を調べるものではないため、倫理面での問題はない。

### C. 研究結果

p27<sup>Kip1</sup> は花冠細線維型神経芽腫では核内に弱く発現し、神経節芽腫では細胞質に多量に出現し、成熟すると再び核内のみに限局するという分化に関連した発現様式の変化がみられた。このような p27<sup>Kip1</sup> の発現強度と細胞内局在の変化をさらに *in vitro* にて確認する目的にて、培養神経芽腫細胞株を用いて分化誘導系における p27<sup>Kip1</sup> の発現の変化を解析した。神経芽腫細胞株 TGW は bromodeoxy-uridine (BrdU) の存在下で7日間培養すると、神経突起を形成して分化を示す。このような細胞を免疫組織化学にて p27<sup>Kip1</sup> を染めると、分化誘導前にはほとんど p27<sup>Kip1</sup> が陰性であったが、分化後には主に細胞質に明らかな陽性像を示した。

Western blot 法にて BrdU 添加後の TGW 細胞の p27<sup>Kip1</sup> の発現を継時的に調べた結果、時間経過とともに発現の亢進がみられ、特に核分画よりも細胞質分画に優位な発現が証明された。以上のごとく、神経芽腫の分化に伴って p27<sup>Kip1</sup> の発現が誘導され、細胞質に出現することが、*in vivo* ならびに *in vitro* のいずれの系にても確認された。

次に上記の p27<sup>Kip1</sup> の細胞質内発現がどのような意義をもつかについて解析を加

えた。1998 年の Nature 誌にて p38<sup>Jab1</sup> が p27<sup>Kip1</sup> を核内から核外へ移送し、proteasome の働きによって p27<sup>Kip1</sup> が細胞質で分解されることを促進する働きをもつことが明らかにされた。神経芽腫の分化に伴って p27<sup>Kip1</sup> の局在が核内から細胞質にも出現するようになることに、p38<sup>Jab1</sup> が関与するか否かを調べる目的にて、上記と同様に腫瘍組織の切片と p38<sup>Jab1</sup> に対する特異抗体を用いた免疫組織化学により、神経芽腫における p38<sup>Jab1</sup> の発現ならびに局在を検討した。その結果、p38<sup>Jab1</sup> は花冠細線維型の神経芽腫においては多少の分化傾向を示す細胞において細胞質内に発現し、それ以降の分化段階では神経節芽腫では細胞質内と核内の両者ともに陽性を示したが、神経節芽腫では主として細胞質内に強い発現がみられたのに対し、神経節腫にまで分化すると核内が優位に陽性を示した。以上のごとく、p38<sup>Jab1</sup> は p27<sup>Kip1</sup> と連動して両者ともに比較的類似した発現強度と細胞内局在の変化を示すことが判明した。すなわち p38<sup>Jab1</sup> は p27<sup>Kip1</sup> と同様に分化に伴って細胞質内につよく発現し、成熟すると核内に優位に発現することが判明した。

### D. 考察

本研究では、神経芽腫の分化に伴って p27<sup>Kip1</sup> は発現強度と細胞内局在が変化することが示された。p27<sup>Kip1</sup> は分化の途中段階でのみ細胞質内に強く発現することが、*in vivo* および *in vitro* のいずれの面からも示されたが、他の研究者らによる Northern blot 解析にて p27<sup>Kip1</sup> は神経芽腫細胞の *in vitro* の分化誘導に伴って p27<sup>Kip1</sup> の合成が

亢進することが報告されており、分化に伴って p27<sup>Kip1</sup> は細胞質内で合成されるものと考えられた。また p27<sup>Kip1</sup> の細胞質内でのタンパク合成のみならず、p38<sup>Jab1</sup> による p27<sup>Kip1</sup> の細胞質への移送とその結果として起こるタンパク分解も、p27<sup>Kip1</sup> の細胞質内出現の一因である可能性が今回の研究から示唆された。cdk inhibitors の細胞内局在と機能は密接に関連し、腫瘍の分化に何らかの役割を果たすものと考えられた。

#### E. 結論

p27<sup>Kip1</sup> は神経芽腫の分化に伴って発現・分解が亢進することが示された。p27<sup>Kip1</sup> の機能や細胞内局在の意義を今後さらに詳細に検討することは、神経芽腫の分化の機序の解明に役立つものと期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(英文)

- 1) Tsunematsu Y, Yoshizawa Y, Miyauchi J, Iijima T, Konishi M, Miyaki M: A novel case of Wilms' tumor followed by colon cancer, both showing microsatellite instability. *Oncology* 58:159-160, 2000
- 2) Miyauchi J, Asada M, Tsunematsu Y, Kojima S, Kaneko Y, Mizutani S: Abnormalities of the p53 gene in juvenile myelomonocytic leukemia. *Br. J. Haematol.* 106:980-986, 1999
- 3) Miyauchi J: All-*trans* retinoic acid and hematopoietic growth factors regulating the growth and differentiation of blast progenitors in acute promyelocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 33:267-280, 1999
- 4) Horie R, Gattei V, Ito K, Imajo-Ohmi S, Tange T, Miyauchi J, Pinto A, Degan M, De Iuliiis A, Mazzocco FT, Rossi FM, Higashihara M, Watanabe T: Frequent expression of the variant CD30 in human malignant myeloid and lymphoid neoplasms. *Am. J. Pathol.* 155:2029-2041, 1999
- 5) Sato T, Tatsuzawa O, Koike Y, Wada Y, Nagata M, Kobayashi S, Ishizawa A, Miyauchi J, Shimizu K: B-cell lymphoma associated with DiGeorge syndrome. *Eur. J. Pediatr.* 158:609, 1999

(和文)

- 1) 鈴木晟幹、向井 清、武井章人、高見剛、星加明德、宮内 潤、林 雅晴：Cornelia de Lange syndrome の 1 例。小児科臨床 52:1967-1972, 1999
- 2) 宮内 潤：急性白血病における白血病幹細胞と造血因子（総説）。臨床血液 40:617-629, 1999
- 3) 宮内 潤：（一週一話）神経芽腫の予後と乳児がん検診。日本医事新報 3930:121, 1999
- 4) 土田嘉昭、池田 均、宮内 潤、松岡健太郎、本名敏郎、別所文雄、岡 輝

明、平戸純子：高用量化学療法による  
神経芽腫の病理組織学的変化. 日小  
外会誌 35:666-673, 1999

- 5) 国仲伸男、野村砂代子、寺戸一昭、渡  
司博幸、涌井重勝、松岡健太郎、宮内  
潤：毛細管現象を応用した*rapid in situ*  
*hybridization* 法による Epstein-Barr  
Virus 検出の臨床的有用性. 医学検  
査 48:1502-1506, 1999
- 6) 国仲伸男、渡司博幸、涌井重勝、宮内  
潤、藤本純一郎：パラフィン切片によ  
る悪性リンパ腫のマーカー診断. 検  
査と技術 27:1122-1126, 1999
- 7) 松岡健太郎、宮内潤：Alveolar  
capillary dysplasia の1例. こども医  
療センター医学誌 28:54, 1999

## 2. 学会発表

(国外)

- 1) Miyauchi J: The effects of IL-12 on  
the growth of blast progenitors in  
acute myelogenous leukemia. 41st

annual meeting of the American  
Society of Hematology (Dec. 3-7,  
1999, New Orleans, LA, USA)  
[Blood 94 Suppl.1: 221b(#4192),  
1999]

(国内)

- 1) 土田里香、宮内潤、恒松由記子、  
加藤順也、別所文雄、水谷修紀：横  
紋筋肉腫の分化における細胞周期抑  
制因子 p27/KIP1 と転写因子 AP-1  
の coactivator p38/Jab1 の発現に関  
する免疫組織学的検討. 第 15 回日本  
小児がん学会総会 (1999 年 11 月  
18-19 日、宝塚) [小児がん  
36(3):489, 1999]
- 2) 伊藤千賀子、熊谷昌明、塩田曜子、  
長谷川有紀、宮内潤、恒松由記子：  
同種骨髄移植後に慢性 GVHD として  
ネフローゼ症候群を発症した小児急  
性リンパ性白血病の一例. 第 41 回日  
本臨床血液学会総会 (1999 年 10 月  
13-15 日、秋田) [臨床血液 40(9):933,  
1999]

小児における抗腫瘍免疫応答の特殊性に関する研究

—小児癌患者末梢血の神経芽腫に対する抗腫瘍免疫能の解析—

分担研究者 東 みゆき 国立小児医療研究センター免疫研究室研究員

研究要旨 T細胞の活性化に重要な costimulatory 分子である CD80 遺伝子導入神経芽腫細胞腫刺激によって誘導される小児癌患者末梢リンパ球の神経芽腫に対する抗腫瘍細胞障害性 T細胞(CTL)を評価した。健常成人と異なり小児癌患者末梢血リンパ球は、CD80 陽性神経芽腫細胞腫刺激でほとんど反応せず、CTL 活性も認められなかった。

A. 研究目的

神経芽腫自然退縮機構における宿主免疫応答反応について検討することを目的とし、小児末梢 Tリンパ球の癌細胞に対する抗原特異的反応を CD80 遺伝子導入腫瘍細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

1. 健常成人および小児固形癌患者末梢血を採取し、比重分離液にて単核球を分離後、液体窒素にて凍結保存した PBMC を用いた。

2. 遺伝子導入により CD80 を高発現させた神経芽腫細胞株 IMR32 および SK-N-SH で、末梢血単核球を刺激し、7日後の CD80 非導入親株に対する細胞障害活性を  $^{51}\text{Cr}$  遊離試験にて測定した。また、抗 CD3Fab 抗体添加による阻害効果を測定することで、抗原特異的活性かどうかを検討した。

C. 研究結果

1998年11月より一年間の間に、順天堂大学小児科および国立小児病院を受診した小児癌患者の11例および国立小児病院癌登録患者5例の末梢血単核球保存検体計16例について検討した。16例中14例が、神経芽腫の確定診断を得た。患者年齢は、3,6,10歳児が一例ずつ含まれていたが、他はすべて2歳未満であっ

た。健常成人および小児癌患者 PBMC は、CD80 発現腫瘍細胞との培養で、培養3-4日目までは、同様に反応し活性化されたとされるリンパ球の芽球化が認められたが、その後、小児癌患者 PBMC では、反応細胞の増加が認められず、アポトーシス様の死細胞の急激な増加が認められた。健常成人においても、培養後期において細胞死が認められるが、その比率は小児癌検体において明らかに多い様に思われた。培養7日目の健常成人 PBMC は、CD80+IMR32 あるいは CD80+SK-N-SH との共培養により、親株 IMR32 あるいは SK-N-SH に対する CTL を示した (IMR32;  $38.6 \pm 19.9\%$ , SK-N-SH;  $50.8 \pm 27.1\%$ )。これに対して、小児癌患者 PBMC は、ほとんど活性を示さなかった (IMR32;  $3.6 \pm 5.6\%$ , SK-N-SH;  $15.7 \pm 16.9\%$  for SK-N-SH)。しかしながら、うまく CTL が誘導できた症例においては、抗 CD3 抗体添加で、20%以上の阻害が認められており、抗原特異的な CTL の存在が示唆された。

D. 考察

小児癌患者 PBMC は、CD80 発現神経芽腫細胞刺激で、培養早期には反応が認められるものの、その後の増殖反応が明らかに抑制されており、CTL の誘導もほとんど認められなかった原因としては、反応性の低下による早期の IL-2 の枯渇あるいは Fas-Fas ligand 経路によ



る反応 T 細胞のアポトーシスが考えられた。RT-PCR の解析により、IMR32 および SK-N-SH は通常においても Fas ligand を発現していることから、初期の反応により活性化され Fas 発現が誘導され、Fas 感受性になった T 細胞が、腫瘍細胞上に発現された Fas ligand からの刺激により、death signal を受け、アポトーシスを起こしている可能性も示唆された。今後、この可能性について、検討を進める予定である。

#### E. 結論

健常成人と異なり小児癌患者末梢血リンパ球は、CD80 陽性神経芽腫細胞刺激でほとんど反応せず、CTL 活性の増強も認められなかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Seko Y, Takahashi N, Yagita H., Okumura K, Azuma M, Yazaki Y. Effects of in vivo administration of anti-B7-1/B7-2 monoclonal antibodies on the survival of mice with chronic ongoing myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J. Pathol.* 188: 107-112, 1999
- 2) Yamamoto M, Kiyono H, Yamamoto S, Batanero E, Kweon NM, Otake S, Takeda Y, Azuma M, McGhee JR. Direct effects on antigen-presenting cells and T lymphocytes explain the adjuvanticity of a nontoxic cholera toxin mutant. *J. Immunol.* 162: 7015-7021, 1999
- 3) Oki, S., Kohsaka, M. Azuma. Augmentation of cell surface expression of CTLA4 by wortmannin: Involvement of lysosomal sorting properties of CTLA-4. *Int. Immunol.* 11: 1563-1571, 1999
- 4) Matui, T., M. Kurokawa, T. Kobata, S. Oki, M. Azuma, S. Tohma, T. Inoue, K. Yamamoto, K. Nishioka, T. Kato. Autoantibodies to T cell co-stimulatory molecules in systemic autoimmune diseases. *J. Immunol.* 162: 4328-4335, 1999
- 5) Nakazawa, A., Watanabe, M., Kanai, T., Yajima, T., Yamazaki, M., Ogata, H., Ishii, H., Azuma, M.,

Hibi, T. Functional expression of a costimulatory molecule, CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa. *Gastroenterology* 117: 536-545, 1999

6) Kawamura, T., M. Azuma, N. Kayagaki, S. Shimada, H. Yagita, K. Okumura Fas/Fas ligand-mediated elimination of antigen-bearing Langerhans cells in draining lymph nodes. *British. J. Dermatol.* 141: 201-205, 1999

7) Seko, Y., N. Takahashi, H. Oshima, O. Shimosato, H. Akiba, T. Kobata, H. Yagita., K. Okumura, M. Azuma, Yazaki, Y. Expression of tumour necrosis factor (TNF) receptor/ligand superfamily co-stimulatory molecules CD40, CD30L, CD27L. and OX40L in murine hearts with chronic ongoing myocarditis caused by coxsackie virus B3. *J. Pathol.* 188: 423-430, 1999

##### 2. 学会発表

- 1) Mogi S, Enomoto S, Kohsaka T, Azuma M. Efficient induction of anti-tumor immune responses by gene-transduction with 4-1BB ligand. The 5<sup>th</sup> annual Meeting The Japan Society of Gene Therapy (Tokyo), 1999.6.18-19
- 2) 茂木 世紀、畑 安浩、野沢和久、榎本昭二、東 みゆき 4-1BB シグナルによる CD4 T 細胞の細胞障害活性発現機構、第 58 回日本癌学会総会(広島)、1999.9.29-10.1
- 3) 野沢和久、大畑順子、桜井仁亨、香坂隆夫、八木田秀雄、奥村 康、東 みゆき. マウス急性 GVHD 発症における CD137 (4-1BB)/CD137L 経路の関与. 第 29 回日本免疫学会総会(京都), 1999.12.1-3