

厚生科学研究費補助金（がん克服研究事業）

平成 13 年度総括研究報告書

小児がんの遺伝的・発生生物学的特性の解明と診断への応用

主任研究者 恒松 由記子 国立小児病院小児科医長

研究要旨：1) 二次性白血病/MDS (恒松)：小児がんから発生した二次性白血病/MDS の全国調査で 2001 年までに、149 例（白血病 82、MDS65）が集積された。そのうち、79 例が造血器腫瘍からで 80 例が固形腫瘍から発生し神経芽腫から発生した 27 例の白血病の約半数が予後良好群から発生していた。2) 神経芽細胞腫の遺伝子発現解析 (佐伯)：N-myc 増幅数の異なる神経芽腫細胞株の間でマイクロアレイを用いて遺伝子発現様式を検討し、TGF- β 、HGF など今まで報告の無い遺伝子の発現様式を検索した。3) 小児血液腫瘍の遺伝子発現解析 (藤本)：前駆細胞性 ALL 細胞株の表面抗原架橋によるアポトーシス誘導における raft を介した細胞内刺激伝達の関与を明らかにした。また、pre-B と pro-B ALL において発現に差が認められる細胞内刺激伝達あるいは転写制御関連因子を複数同定した。4) アポトーシス誘導分子 (宮下)：グルココルチコイド (GC) の薬効機序の解明を目的に GC によって変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ (以下マイクロアレイ) を用いて解析した結果 GC によって発現が増加する遺伝子 93 個と、減少するもの 28 個がとれた。5) 小児がんの遺伝的背景 (水谷)：AT ヘテロ接合体のがん易罹患性について今年度は乳児白血病を解析し、一例において ATM 遺伝子のミスセンス変異 8921CtoT を見いだした。このミスセンス変異では機能が欠損していることが明らかになった。6) 白血病細胞 Ara-C 感受性と TNF α (宮内)：白血病幹細胞の増殖と抗白血病剤 Ara-C に対する感受性に及ぼす TNF α の作用を解析した。IL-3 の存在下で TNF α は Ara-C 感受性を細胞周期と無関係に調節し、TNF α の下流で働く NF- κ -B は apoptosis の抑制・誘導のいずれの作用も有する可能性が示された。7) 小児がん全国登録 (谷村)：1985 年～99 年に診断された登録例のうち、出生時の母の年齢が 20 歳未満の割合は、同時期の一般集団中のその割合に比して、泌尿器系がん (2.3%) 交感神経系腫瘍 (1.8%)、悪性リンパ腫 (1.7%) で高率傾向があった。8) 網膜芽細胞腫全国登録 (東)：網膜芽細胞腫登録で昭和 61、62 年度 10 年後追跡調査と平成 3、4 年度 5 年後追跡調査を行った。生存率は 10 年後で 95.3%、5 年後で 95.0%で、5 年経過すれば原病による生存率は安定するが、2 次がんの発生が増加していた。

分担研究者

恒松 由記子 (国立小児病院小児科医長) ,
佐伯 守洋 (国立小児病院副院長)
藤本 純一郎 (同医療研究センター病理病
態研究部部長) ,

宮下俊之 (国立小児病院医療研究センター発
生奇形研究室室長)

水谷 修紀 (東京医科歯科大学大学院医歯学総
合研究科発生発達病態学小児科学講座教
授)

宮内 潤 (国立小児病院研究検査科科长)

谷村 雅子 (国立小児病院医療研究センター
小児生態研究部部長)

東 範行 (国立小児病院眼科医長)

A. 研究目的

本研究は、国立小児病院が今年度に成育医療センターとなることを射程に入れて計画された。本研究の目的は小児がんの遺伝学的・発生生物学的な特質ならびに小児がんの臨床的な特質を、基礎的、臨床的、臨床疫学的なアプローチにより明らかにすることにある。また、基礎研究、疫学情報の収集、心理社会的研究を行う上での基盤づくりをおこなうことも目的としている。以下各研究班員ごとに報告する。1) 小児のがん治療に関連して白血病の発生が増加しているといわれているが実態調査が必要である。2) 神経芽細胞腫における発現遺伝子の解析結果を治療反応性と併せて検討し、遺伝子発現の違いから予後や生物学的特定と密接に関連した遺伝子発現様式を検索する。これにより、本症のカスタマイズされた治療への道を開く。3) B 前駆細胞性 ALL (pro-B および pre-B ALL) の特性解明の一端として、A) 細胞表面抗原 CD24 の架橋刺激によるアポトーシス誘導に伴う細胞内刺激伝達系の変化について、特に糖脂質豊富マイクロドメイン(raft)に着目した解析および B) gene chip を用いた pro-B と pre-B ALL との遺伝子発現状況の比較解析を目的とした。4) マイクロアレイを用いて GC によって変動する遺伝子を網羅的に解析することから始めて、その標的遺伝子を同定することにより、未だ不明な点が多い GC の抗白血病剤としての作用機序の解明を目的とする 5) 乳児白血病患者ではトポイソメラーゼ阻害剤にたいする感受性が高いことが遺伝的要

因として関与しているのではないかと考え、それを明らかにする目的で研究を行った。

6) つよい増殖能を有し白血病細胞集団の維持に関わる白血病幹細胞は、造血因子の増殖刺激作用によって抗白血病剤 Ara-C に対する感受性が増強する。TNFalpha は造血因子の作用を修飾することから、白血病幹細胞の増殖と Ara-C 感受性に及ぼす TNFalpha の作用を解析した。7) 母の高齢出産では染色体不分離の危険率が上昇するが転座には影響しないことが知られているが、若年出産と遺伝子の突然変異との関係については調査報告がない。若年出産の染色体異常や遺伝子突然変異への影響の有無の検討の必要性を探ることを目的とした。8) わが国に置ける網膜芽細胞腫の近年の動向を明らかにする目的で、網膜芽細胞腫全国登録の追跡調査を行った。

B. 研究方法

本研究班の研究資料は本院で行われている患者または保護者の同意に基づく保存された試料を用いる研究と全国的規模で収集された資料によるもの、または株化された試料によるものである。1) 全国 173 施設にアンケート調査を行って免疫マーカー・核型分析等から二次性白血病/MDS の同定を行い治療との関連等を解析し特に 27 例の神経芽腫からの症例については、詳しい二次調査をおこなった。2) DNA チップを用い 4000 個の遺伝子について N-MYC 発現の増幅の無い NB-69 株、増幅が顕著である NB-19 株の 2 種の株間で発現結果を比較した。3) A) 抗 CD24 抗体の結合により B 前駆細胞性 ALL 細胞株に架橋刺激を加え、アポトーシス誘導をアネキシン V の結合で検出し、フローサイトメトリーで解析した。同時に

細胞抽出液を調整して raft に局在する蛋白をシヨ糖密度勾配超遠心法によって分離し、刺激伝達分子に対するイムノブロット解析を行った。B) ALL 細胞株 NALM-16 (pro-B)およびNALM-17(pre-B)より RNA を抽出し、gene chip による比較解析により両者間で遺伝子の発現量に差のある分子群をスクリーニングした。複数の B 前駆細胞性 ALL 細胞株に対して、同定された分子について RT-PCR による遺伝子の発現量およびイムノブロットによる蛋白発現量の解析を行った。4) GC によってアポトーシスと細胞周期の停止をおこす白血病細胞株 697 を用いた。デキサメタゾン (DEX) 添加後、複数のタイムポイントで RNA を回収し、ビオチン標識 cRNA を合成した後、オリゴ DNA チップを用いて遺伝子の転写レベルを網羅的に解析した。基準値以上の発現変動を示す遺伝子をスクリーニングし、更に定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロット法を組み合わせ、チップより得られたデータの確認を行った。5) 7 例の MLL 遺伝子再構成を有する乳児白血病患者より EB ウイルス株化細胞を樹立した。ウェスタンブロット、核酸配列決定等は既報の方法に準じて行った。6) 白血病幹細胞の増殖に及ぼす IL-3 をはじめとする造血因子と TNF α の併用効果をコロニー培養および液体培養にて検討し、白血病幹細胞の Ara-C 感受性に及ぼす IL-3 と TNF α の併用効果を解析した。また TNF α のシグナル伝達系路で apoptosis に抑制的に働く NF- κ B の主なサブユニットに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドを作製し、NF- κ B の機能阻害が Ara-C 感受性に及ぼす効果を解析した。7) 小児がん全国登録表の記載項目の中から、1985 年～99

年に診断された小児がん 18296 例中の出生時の母の年齢が 20 歳未満である割合を各種瘍ごとに一般集団における割合 (0.95～1.93) と比較した。8) 網膜芽細胞全国登録記載項目から、昭和 61、62 年度および平成 3、4 年度の登録症例の 10 年後および 5 年後追跡調査を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の試料はほとんどが本院での国立小児病院内悪性腫瘍試料登録に登録された血液、組織、病歴を用いている。試料採取に当たってはあらかじめ文書によるインフォームドコンセントを得て行い、遺伝的な素因に関連する研究を行うに際しては、再度インフォームドコンセントを得る。研究はすべて研究計画書を倫理審査委員会に提出し承認されている。

C. 研究結果

1) 二次性白血病/MDS : 小児治療関連二次性白血病/MDSの全国調査で2001年までに、149例(白血病84、MDS65)が集積された。そのうち、79例が造血器腫瘍から70例が固形腫瘍から発生した。神経芽腫から発生した27例の白血病の約半数が予後良好群から発生していた。2) (A) NGF-受容体の遺伝子の発現パターンは、マイクロアレイ法と RT-PCR法で概ね同様の傾向を示した。(B) *N-my c* の増幅数の異なる神経芽細胞腫2株間で、TGF- β やHGFなどの既知遺伝子の発現量が大きく異なっており、更に発現量の異なる遺伝子の同定などマイクロアレイ法による結果を解析途中である。3) B 前駆細胞性 ALL 細胞株では CD24 の架橋によってアポトーシス誘導が認められるが、raft 構造の攪乱剤を用いることによりこのアポトーシス誘導は抑制された。CD24

は細胞膜上の raft に局在しており、CD24 の架橋によって raft の中で Src 型チロシンリン酸化酵素 Lyn の活性化が起こり、さらに MAP キナーゼの活性化等による細胞内刺激伝達が誘導されることが明らかとなった。

B) pre-B ALL と pro-B ALL で遺伝子および蛋白レベルで発現に大きな差が認められる分子として、転写因子 DP-1、刺激伝達関連分子 IGFBP-2、ケモカイン受容体 CXCR-4、等約 20 種類を同定した。

4) グルココルチコイド (GC) によって発現が増加する遺伝子 93 個と、減少するもの 28 個が見出された。これらを機能別に分類するとシグナル伝達、免疫反応、増殖抑制に関与するものがまとまって変動していることがわかった。そのうち多くの遺伝子の変動が RT-PCR 法、ウェスタンブロット法により確認された。興味ある遺伝子として SOCS1、SOCS2、FKBP51、DSCR1 (以上シグナル伝達関連)、p19INK4d、BTG1、BTG2 (以上増殖抑制関連) 等が挙げられた。

5) 乳児白血病の遺伝的背景: 7 例のうち 1 例で 8921CtoT のミスセンス変異を同定した。この変異アレルを AT 線維芽細胞に導入することによりその機能の比較を行った。その結果 pcDNA3-YZ5/8921T はクロノジェニック活性の回復能の障害が認められた。ATM による p53 をリン酸化活性を解析したところ pcDNA3-YZ5/8921T は IL-3 による白血病幹細胞の増殖刺激に対し、明らかに機能に欠損が見られた。

6) TNF α はコロニー形成をしばしば増強したが自己複製は多くの場合に抑制した。白血病幹細胞の Ara-C 感受性は、TNF α と IL-3 との併用にて増殖の増強・抑制に関わらず全例で低下した。NF-kappaB に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドは白血病

細胞株 Ara-C 感受性を増強したが、患者検体の白血病幹細胞の Ara-C 感受性を低下させた。

7) 出生時の母の年齢が 20 歳未満の割合は、同時期の一般集団のわりあい (0.93 から 1.55% に比して、泌尿器系がん (2.3%)、交感神経系腫瘍 (1.8%)、悪性リンパ腫 (1.7%) で高率傾向であった。神経芽腫においては、自然治癒例を含むと考えられている予後良好の生後 6 ヶ月～11 ヶ月診断例では 1.03% に対して、遺伝子損傷が関与している予後不良の 1 歳から 4 歳までの診断例では 2.34%、5 歳～14 歳診断例では 1.91% で若年出産の場合において胎児期における体細胞レベルの染色体・遺伝子への損傷が高いことが示唆される。なお、神経芽細胞腫発生年齢にかかわらず、若年出産して母の喫煙率は 3 割を超える高率であった。

8) 追跡可能であったものは 10 年後追跡調査で 29.9%、5 年後追跡調査で 42.3% であり、生存率は 10 年後追跡調査で 95.3%、5 年後追跡調査で 95.0% であった。死亡原因は、10 年後では、原病死 1 例、2 次がん 1 例、5 年後では、原病死 3 例、2 次がん 2 例であった。生存例のなかでも 10 年後では 2 次がんが 4 例発生していた。2 次がんは 1 例を除き、すべて両眼網膜芽細胞腫の症例に発生していた。

D) 考察

1) 今後も二次性白血病/MDS の調査を続け、薬剤感受性の個体差の検討、primary tumor に対する治療の監視等を行う。

2) 現在はまず細胞株を用いて、N-myc 遺伝子発現との関連で他の遺伝子発現様式が検討された。臨床検体における RT-PCR 法の結果との比較検討より、マイクロアレイ法によるこの実験系が、概ね臨床検体における結果と同様で

あることが確認された。検討していくべき遺伝子の同定には、更に時間を要する。3) B前駆細胞性ALL細胞株のCD24の架橋によってアポトーシス誘導においてraftを介した細胞内への刺戟伝達が関与している可能性が示唆された。一方、今回同定されたpre-BALLとproBALLでそれぞれのタイプのALL細胞に特有の細胞内刺激伝達や転写制御に関与する可能性が考えられる。この情報は、pre-Bとpro-B ALLの特性の違いの解明や、両者に対する治療法の差腹化の上で有用と考えられる。

4) SOCS1、p56lckはGCによる免疫抑制に、FKBP51、DSCR1は免疫抑制とアポトーシスの両者にGranzyme (Gzm)A、GzmKはアポトーシスに、p19INK4d、BTG1、BTG2は細胞増殖の抑制にそれぞれ関与すると考えられた。これら遺伝子の変動のもつ生理的意義を解明するには、他の細胞や他の解析法を用いた更なる実験が必要と考えられた。5) 乳児白血病患者の正常細胞において胚細胞レベルでのATM遺伝子異常を発見した。AT患者細胞に於てはトポIIインヒビターに対する高感受性が知られている。またMLL遺伝子はトポIIインヒビターによって切断を受けやすく、さらに乳児白血病ではMLL遺伝子異常のおこる頻度が極めて高い。このようなことを総合して我々は乳児白血病のなりやすさを決定する遺伝的要因にATM遺伝子の変異が深く関与していることが疑われた。6) Ara-Cは細胞周期に選択的に作用する薬剤であるが、TNF α は白血病幹細胞のAra-C感受性を細胞周期と無関係に調節し、apoptosisを抑制する作用が知られる。NF- κ Bは、これを促進する場合もあると考えられた。7) 租集計から若年出産といく

つかの小児がんとの関係が示された。わが国においては、高齢出産が増加する一方、若年出産も増加している。配偶子、若年母体、妊娠中の健康管理、出生ごの環境問題のいずれが問題であるのか今後調査をすすめたい。8) 今回の追跡調査で生存率は10年後で95.3%、5年後で95.0%で大きな差がなかった。適切な治療を行えば生存率が高く、5年経過すればほぼ生存率は安定することが示唆された。しかし、死亡原因は5年後では原病死が多いのに対し、10年後では2次がんが多くなっており、生存例で2次がんの発生がみられた。2次がんは両眼性網膜芽細胞腫におけるがん体質に加えて、保存療法による晩期合併症も考えられ、さらなる長期の追跡調査が必要である。

E) 結論

1) 小児がんに発生した二次性白血病 149例のうち、固形腫瘍では神経芽細胞腫からのものが27例と最も多かった。化学療法を必要としない予後のよいタイプからの発生を予防するために今後行政的な対策が必要である。2) 予後関連因子として既知のN-myc増複数の異なる神経芽細胞腫培養株においてマイクロアレイ法を用いて遺伝子発現様式の違いを検討し、臨床検体における遺伝子発現の結果との相関性を検討した。3) B前駆細胞性ALL細胞株の表膜抗原架橋によるアポトーシス誘導にraftを介した細胞内刺激伝達が重要である可能性が示された。また、B前駆細胞性ALLでもpre-Bとpro-B ALLではそれぞれ特性の異なる細胞内刺激伝達や転写制御機構を有するものと考えられる。4) GCによって変動する遺伝子をマイクロアレイを用いて解析した結果、GCにより白血病細胞に誘導される細胞周期の停

止とアポトーシスと呼ばれる細胞死に関連するいくつかの遺伝子が同定された。5)

乳児白血病の遺伝的要因としてATM遺伝子が関与している可能性が示唆された。

6) TNF α は白血病幹細胞のAra-C感受性を細胞周期と無関係に調節すること、NF- κ Bはapoptosisに対して抑制・誘導のいずれの作用も有することが示された。

7) 若年出産と遺伝子と突然変異との関係については調査報告がないが、若年出産の割合がいくつかの小児がんにおいては高い傾向が見られ、若年出産の生物学的あるいは社会的な影響の可能性が必要である。

網膜芽細胞腫登録で昭和 61、62 年度 10 年後追跡調査と平成 3、4 年度 5 年後追跡調査を行った。生存率は 10 年後で 95.3%、5 年後で 95.0%で、5 年経過すれば原病による生存率は安定するが、2次がんの発生が増加していた。

E. 健康危険情報

今年度の研究では取り立てて報告すべきものはなかった

G. 研究発表

研究発表 (2001-2002)

主任研究者

- 1) Manabe A, Tsuchida M, Hanada R, Ikuta K, Toyoda Y, Okimoto Y, Ishimoto K, Okawa H, Ohara A, Kaneko T, Koike K, Sato T, Sugita K, Bessho F, Hoshi Y, Maeda M, Kinoshita A, Saito T Tsunematsu Y, and Nakazawa S: Delay of the diagnostic lumbar puncture and intrathecal chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia who undergo routine corticosteroid testing; Tokyo Children's Cancer Study Group Study L89-12: J Clin Oncol. 19:3182-3187, 2001
- 2) Kumon K, Kobayashi H, Namiki T, Tsunematsu Y, Miyauchi J, Kikuta A, Horikoshi Y, Komada Y, Hatae Y, Eguchi H, Kaneko Y: Frequent increase of DNA copy number in the 2q24 chromosomal region and its association with a poor clinical outcome in hepatoblastoma: cytogenetic and comparative genomic hybridization analysis. Jpn.J.Cancer Res.92 : 854-862, 2001
- 3) Nakadate H, Yokomori K, Watanabe N, Tsuchiya T, Namiki T, Kobayashi H, Suita S Tunematsu Y, Horikoshi Y, Hatae Y, Endo M, Komada Y, Eguchi H, Toyoda Y, Kikuta A, Kobayashi R, Kaneko Y : Mutations /deletions of the *WT1* gene, loss of heterozygosity on chromosome arms 11p and 11q , chromosome ploidy and histology in Wilms' tumors in Japan. Int. J. Cancer 94:396-400, 2001
- 4) 恒松由記子:小児白血病長期生存者の晩期障害. 小児内科 33 : 1056-1510, 2001.
- 5) 恒松由記子:小児がんの疫学と家族性腫瘍. ゲノム医学 1 : 239-247, 2001.
- 6) 恒松由記子:小児がんの遺伝的リスク評価と遺伝性腫瘍症の診療. 実験医学 19 : 78-184, 2001.
- 7) 恒松由記子, 塩田曜子: 243 Langerhans cell histiocytosis(LCH). 小児内科 33 : 546- 547, 2001.
- 8) 恒松由記子:Li-Fraumeni 症候群.小児科診療 64 巻増刊号 : 2002.

- 9) 熊谷昌明、恒松由記子：小児固形腫瘍の化学療法。がんの化学療法（後編）（西條長宏編集）、p. 1449-1458 最新医学社 2001.
- 10) 恒松由記子：8章A.子どものがん。ナーシングマニュアル 1 改訂版 がん看護マニュアル（岡崎伸生 柿川房子編）p.381-384, 学研,2001.
- 11) 恒松由記子：治療選択決定時におけるインフォームド・コンセントのポイント。インフォームド・コンセントガイダンス—血液疾患診療編—（月本一郎編）、p.108-123、先端医学社、2001.
- 13) 恒松由記子：遺伝子解析と生命倫理エビデンスに基づいた遺伝医療の倫理学を。がん看護 6：326-327,2001.
- 分担研究者
- 14) Katagiri-U Y, Kiyokawa N, Fujimoto J: A role for lipid rafts in immune cell signaling (review). *Microbiol Immunol* 45:1-8, 2001
- 15) Kiyokawa N, Mori T, Taguchi T, Saito M, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Sato N, Nakajima H, Katagiri YU, Takeda T, Fujimoto J: Activation of the Caspase Cascade During Stx1-induced Apoptosis in Burkitt's Lymphoma Cells. *J Cell Biochem* 81:128-142, 2001
- 16) Katagiri-U Y, Kiyokawa N, Fujimoto J: The effect of Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide in rafts of human kidney cells and Burkitt's lymphoma Ramos cells (review). *Trends Glycosci Glyc* 13:281-290, 2001
- 17) Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino T, Katagiri-U Y, Fujimoto J: CD24 induces apoptosis in human B cells via the GEM/rafts-mediated signaling system. *J Immunol* 166:5567-5577, 2001
- 18) Yamamoto K, Ohta S, Ito E, Hayashi Y, Asami T, Mabuchi O, Higashigawa M, Tanimura M : Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: Cohort study in 7 Prefectures in Japan. *J Clin Oncol*, in press.
- 19) Matsubasa T, Uchino T, Kondo Y, Maruyama K, Tanimura M, Endo F: Oxidative stress in very low birth weight infants. *J Radiol*, in press.
- 20)
- 21) Tsuchida R, Yamada T, Takagi M, Shimada A, Ishioka C, Igarashi T, Chessa L, Delia D, Teraoka H and Mizutani S :Detection of *ATM* gene mutation in human glioma cell line M059J by a rapid frame-shift/ stop codon assay in yeast. *Rad. Res.* in press.
- 22) Kawasaki H, Isoyama K, Eguchi M, Hibi S, Kinukawa N, Kosaka Y, Oda T, Oda M, Nishimura S, Imaizumi M, Okamura T, Hongo T, Okawa H, Mizutani S, Hayashi Y, Ichiro Tsukimoto, Nanao Kamada, and Eiichi Ishii Superior outcome of infant acute myeloid leukemia with intensive chemotherapy : results of the Japan Infant Leukemia Study Group *Blood* 98 :3589-94, 2001
- 23) Kobayashi K, Uthida S, Mizutani S,

- Sasaki S, Marumo F. :Intrarenal and cellular localization of CLC-K2 protein in the mouse kidney. *J Am Soc nephrol* 12:1327-34, 2001
- 24) Kobayashi K, Uthida S, Mizutani S, Sasaki S, Marumo F. Developmental expression of CLC-K1 in the postnatal rat kidney. *Histochem Cell Biol*. 116:49-56, 2001
- 25) Buscemi G, Savio C, Zannini L, Micciche F, Masnada D, Nakanishi M, Tauchi H, Komatsu K, Mizutani S, Khanna K Concannon P, Chessa L, Delia D : Chk2 Activation dependence on Nbs1 after DNA damage *Molecul Cell Biol* 21: 5214-22, 2001
- 26) Alexander F, Patheal S, Biondi A, Brandalise S, Cabrera M, Chan L, Chen Z, Cimino Z, Cordoba J, Gu LG, Hussein H, Ishii E, Kamel AM, Labra S, Magalhaes IQ, Mizutani S, Petridou E, Pombo M, Yuen P, Wiemels JL, Greaves MF: Transplacental Chemical exposure and risk of infant leukemia with *MLL* gene fusion. *Cancer Res* 61 ; 2542-46,2001
- 27) Eguchi-Ishimae M , Eguchi M, Ishii E, Miyazaki S, UedaK, Kamada N, Mizutani S : Brekage and fusion of the TEL(ETV6) gene in immature B lymphocytes induced by apoptogenic signals. *Blood* 97(3); 737-743, 2001
- 28) Cuddeback S.M., Yamaguchi H., Komatsu K, Miyashita T, Yamada M., Wu C, Singh S, and Wang H.G. Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J Biol Chem* 276:20559-20565.2001
- 29) Shikama Y, Miyashita T, and Yamada M: Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.* 264, 315-325.
- 30) Miyashita T, Shikama, Y, Tadokoro K and Yamada M.: Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family. *FEBS Lett.* 509, 135-141. 2001
- 31) Miyashita T., Ohtsuka Y, Okamura-Oho Y, Shikama Y, and Yamada M. :Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death Diff.* 8 :377-386.2001
- 32) Miyauchi J: In vitro effects of interleukin-12 on the growth of blast progenitors in acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 15:1996-1998, 2001
- 33) Nakajima Y, Kawakubo K, Kuriyama Y, Miyauchi J, Ohyashiki K: A clustered dense body in a patient with splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Haematologica* 86:109-110, 2001
- 34) Noma M, Sekiguchi A, Chikada M, Ishizawa A, Miyauchi J, Okada R: Quantitative analysis of hypertrophy in cardiac chambers in cyanotic tetralogy of Fallot. *Jpn Heart J* 42:173-184, 2001
- 35) 黒田達夫、佐伯守洋、本名敏郎、他 : 悪

科 34, 2002 印刷中

- 35) Kamata Y, Okuyama T, Kosuga M, O'hira A, Kanaji A, Sasaki K, Yamada M, Azuma N: Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. Mol Ther.4(4) 307-312,2001
- 36) Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A ,Li XK , Okawa H, Ogino I, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Kamata Y, Azuma N, Suzuki S, Yamada, M Okuyama T: Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. Mol Ther3(2) 139-148,2001
- 37) Kawase E, Azuma N. :A case of atypical WAGR syndrome with anterior segment anomaly and microphthalmos. Br J Ophthalmol in press 2001
- 38) Nishina S, Azuma N: Severe macular pucker after infantile retinal detachment surgery Arch Ophthalmol 119:1855-1856,2001

厚生科学研究費補助金（がん克服研究事業）

平成 13 年度分担研究報告書

小児がんから発生する二次性白血病/MDS の実態調査研究

分担研究者 恒松由記子 国立小児病院小児科医長

研究要旨：小児がんから発生した二次性白血病/MDS の全国調査；1984 年から毎年小児血液学会認定施設にアンケート調査用紙を送付、2001 年までに、149 例（白血病 82、MDS65）が二次性白血病と同定され集積された。そのうち、79 例が造血器腫瘍からで 80 例が固形腫瘍から発生していた。固形腫瘍から発生したもののうち神経芽腫から発生した症例が最も多く 27 例であった。神経芽細胞腫から発生した二次性白血病/MDS の約半数が 14 ヶ月以下の予後良好群から発生していた。化学療法を必要としない予後のよいタイプからの発生を予防するために今後行政的な対策が必要である。

A. 研究目的

小児がんが生存率を高めているが、同時に治療による副作用が注目されている。中でも二次がんが最も憂慮されている副作用であり、最近二次がんのなかで二次性白血病の発生率が高まっている。その実態調査とリスク因子を明らかにすることは小児がん患者の QOL を向上させるために重要であり、また、白血病発生のメカニズムを明らかにすることにも寄与する。今年度はわが国だけで行われている神経芽細胞腫のマスキングの普及により、実際の罹患率より多く発生している予後が良好な神経芽細胞腫から発生した二次性白血病がどれくらいあるかを調査することを主眼とした。

B. 研究方法：1984年から毎年全国の小児血液学会認定医のいる施設174病院にアンケート用紙を送り、一次調査と二次調査に分けて回収した。一次腫瘍は15歳未満で発症したもので、二次性腫瘍は1981年から2000年までに発生したものとした。一次腫瘍としては、固形腫瘍/白血病/悪性リンパ腫/ホジキン病/のほかに抗がん剤を使用したLCH/HLHとした。二次性造血器腫瘍としては二次性の白血病/MDS/悪性リンパ腫と診断されたもので表面マーカー、核型その他の状況から、二つの疾患が異なるものと同定され、同種幹細胞移植を行ったものは除外した。表面マーカーと核型分析は許可を得てそのコピーを送付してもらった。調査票には、一次腫瘍での治療内容、化学療法の総投与量などが含まれていた。

C. 研究結果：二次性白血病/MDS：小児治療関二次性白血病/MDSの全国調査で2001年までに、149例（白血病84、MDS65）が集積された。そのうち、79例が造血器腫瘍からで70例が固形腫瘍から発生した。神経芽腫から発生した27例の白血病のうち、22例について詳細な二次調査を行い得た。神経芽細胞腫から発生した二次性白血病22例のうち、神経芽細胞腫の発症年齢が11ヶ月未満のものが10例、でその他14ヶ月のもの一例を加えると半数が予後良好と考えられる年齢群から発生していた。（マスキング発見例が3例あり）若年例で発生した神経芽細胞腫からの群でも不適切な大量化学療法が行われていたものが多かった。また、一歳以上の群から発生したものは、超大量化学療法や自家骨髄移植により、延命したもので、これらは全員二次性MDSで転帰は全員死亡していた。全体として核型は非常に複雑であった。二次性白血病までのLatency period は最も早く12ヶ月、遅く102ヶ月と発病から8年以上経過しても二次性白血病/MDS発症のリスクがあることがわかった。

D 考察：小児がんから発生した149例の二次性白血病/MDSのうち神経芽細胞腫から発生したものが固形腫瘍からの症例うち最も多く、その半数が1歳以下の予後良好群から発生し、そのうち3例はマスキング例から発生していたことはわが国における神経芽細胞腫からの二次性白血病の特長とも言える。米国における神経芽細胞腫からの二次性白血病の報告をみると、全て超

大量化学療法を行わざるを得なかった症例に限られている。また、最高8年以上の期間において二次性白血病を発生していることがわかったので、長期フォローアップ中に白血病の発生リスクがあることについて今後注意を促すことが必要である

E. 結論

神経芽細胞腫から発生したものが固形腫瘍からの症例のうち最も多く、その半数が1歳以下の予後良好群から発生し、そのうち3例はマスキリング例から発生していたことがわかった。化学療法を必要としない予後のよいタイプからの発生を予防するために今後行政的な対策が必要である。また、大量化学療法を行って生存している小児がん患者のフォローアップ中には10年以上の期間わたって、二次性白血病/MD S発生に対する監視が必要である。

F. 研究発表

- 1) Manabe A, Tuchida M, Hanada R, Ikuta K, Toyoda Y, Okimoto Y, Ishimoto K, Okawa H, Ohara A, Kaneko T, Koike K, Sato T, Sugita K, Bessho F, Hoshi Y, Maeda M, Kinoshita A, Saito T Tsunematsu Y, and Nakazawa S: Delay of the diagnostic lumbar puncture and intrathecal chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia who undergo routine corticosteroid testing; Tokyo Children's Cancer Study Group Study L89-12: J Clin Oncol. 19:3182-3187, 2001
- 2) Kumon K, Kobayashi H, Namiki T, Tsunematsu Y, Miyauchi J, Kikuta A, Horikoshi Y, Komada Y, Hatae Y, Eguchi H, Kaneko Y: Frequent increase of DNA copy number in the 2q24 chromosomal region and its association with a poor clinical outcome in hepatoblastoma: cytogenetic and comparative genomic hybridization analysis. Jpn.J.Cancer Res.92 : 854-862,2001
- 3) Nakadate H, Yokomori K, Watanabe N, Tsuchiya T, Namiki T, Kobayashi H, Suita S Tunematsu Y, Horikoshi Y, Hatae Y, Endo M, Komada Y, Eguchi H, Toyoda Y, Kikuta A, Kobayashi R, Kaneko Y : Mutations /deletions of the *WT1* gene, loss of heterozygosity on chromosome arms 11p and 11q , chromosome ploidy and histology in Wilms' tumors in Japan. Int. J. Cancer 94:396-400,2001
- 4) 恒松由記子:小児白血病長期生存者の晩期障害. 小児内科 33 : 1056-1510,2001.
- 5) 恒松由記子:小児がんの疫学と家族性腫瘍. ゲノム医学 1 : 239-247,2001.
- 6) 恒松由記子:小児がんの遺伝的リスク評価と遺伝性腫瘍症の診療. 実験医学 19 : 78-184,2001.
- 7) 恒松由記子, 塩田曜子:243 Langerhans cell histiocytosis(LCH). 小児内科 33 : 546-547,2001.
- 8) 恒松由記子:Li-Fraumeni 症候群.小児科診療 64 巻増刊号 : 2002.
- 9) 熊谷昌明、恒松由記子 :小児固形腫瘍の化学療法.がんの化学療法(後編)(西條長宏編集)、p. 1449-1458 最新医学社 2001.
- 10)恒松由記子 : 8 章A.子どものがん.ナーシングマニュアル1 改訂版 がん看護マニュアル(岡崎伸生 柿川房子編) p.381-384,学研,2001.
- 11) 恒松由記子 :治療選択決定時におけるインフォームド・コンセントのポイント.インフォームド・コンセントガイダンス—血液疾患診療編—(月本一郎編)、p.108-123、先端医学社、2001.
- 13) 恒松由記子 : 遺伝子解析と生命倫理 エビデンスに基づいた遺伝医療の倫理学を. がん看護 6 : 326-327,2001.

遺伝子情報発現の解析による神経芽細胞腫の
予後判定に関する研究

分担研究者 佐伯 守洋 国立小児病院 副院長

研究要旨 予後関連遺伝子として既知のN-myc増幅数の異なる神経芽細胞腫培養株においてMicroarray法を用いて諸種の遺伝子発現を検討した。神経成長因子-受容体系の遺伝子に関しては、腫瘍の臨床検体におけるRT-PCR法の遺伝子発現検索の結果と相関性が検討された。

A. 研究目的

進行神経芽腫の治療成績は、従来のがん遺伝子変異や特定の遺伝子発現の異常に基づいたrisk分類に応じた治療法を選択しても、満足すべき成績ではない。そこで本研究では、神経芽腫において臨床的予後、生物学的特性とより相関性の強い遺伝子発現様式を検索し、これを新たな指標とした適切な治療法の選択、個々の症例に対する治療のカスタマイズに応用することを目的とする。既知の遺伝子の発現の評価ならびに、新たに本症の予後と相関性の高い遺伝子を同定する。さらに神経芽腫の遺伝子発現様式の検討より本腫瘍の病因・病態の解明の糸口を得ることも目的とする。

B. 研究方法

(1) ヒト発現遺伝子約4000個についてすでに作成済みのDNAチップを用いて、N-mycがん遺伝子の増幅のないNB-69株、増幅の顕著であるNB-19株の2種の神経芽腫細胞株における遺伝子発現様式を比較した。この結果解析として、両者間で発現

量に大きな差のある遺伝子の同定作業を開始した。

(2) 既知の予後関連遺伝子としてNGF, Trk-A, NGFRに関しては、これまでのRT-PCR法による臨床検体での遺伝子発現結果とMicroarray法の結果を比較した。

C. 研究結果

(1) 神経成長因子 (NGF) -受容体系の遺伝子 (NGF, Trk-A, NGFR) の発現パターンは、Microarray法による細胞株における解析結果と、RT-PCR法による神経芽腫臨床検体における検討結果が概ね同様の傾向を示した。しかしながら、臨床検体では個々の腫瘍により遺伝子発現のvariationが大きかった。

(2) N-mycの増複数の異なる神経芽細胞腫2株間で、TGF-BやHGFなどの既知遺伝子の発現量が大きく異なっており、さらに発現量の異なる遺伝子の同定などMicroarray法の結果を解析途中である。

D. 考察

今年度の研究では、倫理的な問題への

配慮より、先ず細胞株を用いてN-myc遺伝子発現との関連で他の遺伝子発現様式が検討された。発現量がN-myc遺伝子の増幅の有無と明らかに相関あるいは逆相関する遺伝子を選定し、その同定作業を進めた。このうち本症の予後との相関が指摘される神経成長因子-受容体系の遺伝子については、腫瘍組織の臨床検体におけるRT-PCR法の発現検索との比較検討が行われた。この結果、Microarray法による細胞株における検索結果が、概ね臨床検体における結果と同様であることが確認され、今後この実験系を用いて行く上での基礎知見が得られた。しかしながら一方で、臨床検体における遺伝子解析結果は個々の腫瘍によるvariationが大きく、症例毎の治療のカスタマイズの困難さも示唆された。

解析を進めて本症の予後と関連しうる候補遺伝子を同定していくためには、さらに若干の時間を要する。

E. 結論

予後関連遺伝子として既知のN-myc増幅数の異なる神経芽細胞腫培養株においてMicroarray法を用いて遺伝子発現様式の違いを検討し、臨床検体における遺伝子発現の結果との相関性が検討された。

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：
先天性神経芽細胞腫症例の検討。第17回
日本小児がん学会（2001年11月、東京）

論文発表

1) 嶋寺伸一、佐伯守洋、中野美和子、ほか：
Multifocal Neuroblastomaが示唆された副腎および仙骨前神経節芽腫の1例。日小外会誌 37:305-310, 2001

2) 黒田達夫、佐伯守洋、中野美和子、ほか：
悪性軟部腫瘍に対する外科治療。小児外科34, 2002 in press

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

遺伝子発現情報を用いた小児血液腫瘍の特性の解明に関する研究

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

ヒトB前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病(ALL)細胞における、細胞表面分子CD24の架橋刺激によるアポトーシス誘導における細胞膜糖脂質豊富マイクロドメイン(raft)を介した細胞内刺激伝達の関与を明らかにした。今後、raftを創薬の標的とした新規治療法開発の応用が期待される。また、pre-Bとpro-B ALLにおいて発現に差が認められる細胞内刺激伝達および転写制御関連因子を複数同定した。この情報は今後pre-Bとpro-B ALLの特性の違いの解明や、両者に対する治療法の差別化の上で有用と考えられる。

A. 研究目的

B細胞分化抗原のひとつであるGPI結合蛋白CD24は、小児期の腫瘍として最も頻度の高いB前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病(ALL)のマーカーとして有用であるが、われわれはこれまでに、CD24の架橋刺激によってB前駆細胞性ALLにアポトーシスが誘導されることを明らかにした。今回、その分子機構の解明を目的として、CD24の架橋刺激に伴う細胞内刺激伝達について解析した。GPI結合蛋白は、細胞膜上では細胞膜糖脂質豊富マイクロドメイン(raft)と呼ばれる機能的構造単位に存在すると考えられているが、最近raftの細胞内刺激伝達における重要性が明らかになってきた。そこで特にCD24とraftとの関連に着目した検討を行った。また、B前駆細胞性ALLはpro-Bとpre-B ALLに分類されるが、両者の細胞学的あるいは病態的特性の差については不明な点が多い。そこで、gene chip解析を用いて、両者における遺伝子発現状況の差について検討した。

B. 研究方法

抗CD24抗体の結合によりB前駆細胞性ALL細胞株に架橋刺激を加え、アポトーシス誘導をアネキシンVの結合で検出し、フローサイトメトリーで解析した。同時に細胞抽出液を調整してraftに局在する蛋白をショ糖密度勾配超遠心法によって分離し、刺激伝達分子に対するイムノプロット解析を行った。B) ALL細胞株NALM-16(pro-B)およびNALM-17(pre-B)よりRNAを抽出し、gene chipによる比較解析により両者間で遺伝子の発現量に差のある分子群をスクリーニングした。複数のB前駆細胞性ALL細胞株に対して、同定された分子についてRT-PCRによる遺伝子の発現量およびイムノプロットによる蛋白発現量の解析を行った。

C. 研究成果

B前駆細胞性ALL細胞株ではCD24の架橋によってアポトーシス誘導が認められるが、raft構造の攪乱剤methyl β -cyclodextrinを用いることによりこのアポトーシス誘導は抑制された。raft分画の蛋白に対するイムノプロット解析の結果、CD24は細胞膜上のraftに局在しており、CD24の架橋によってraftの中でSrc型チロシンリン酸化酵素Lynの活性化が起こり、さらにMAPキナーゼの活性化等による細胞内刺激伝達が誘導されることが明らかとなった。

gene chipによる比較解析によりNALM-16(pro-B)およびNALM-17(pre-B)で遺伝子および蛋白レベルで発現に大きな差が認められる分子として、転写因子DP-1、刺激伝達関

連分子IGFBP-2、ケモカイン受容体CXCR-4、等約20種類を同定した。そこで、複数の細胞株について、これらの遺伝子の発現状況をRT-PCRで解析した結果、これらの遺伝子の発現の差は、単に二つの特定の細胞株の間の差ではなく、pro-Bとpre-B ALL細胞の間で共通する差である可能性が明らかになった。さらに、イムノプロット解析により、これらの分子が蛋白レベルでも遺伝子レベルでみられたのと同様な発現の差を示すことが明らかとなった。

D. 考察

B前駆細胞性ALL細胞株のCD24の架橋によるアポトーシス誘導においてraftを介した細胞内への刺激伝達が関与している可能性が示唆された。すなわち、細胞表面抗原の架橋によって惹起されるアポトーシス刺激の細胞内伝達においてraftが重要な中継点となっている可能性が考えられる。今後、この現象を応用した新規治療法開発において、raftが重要な創薬標的の一つとなる可能性が示唆される。一方、今回同定されたpre-B ALLとpro-B ALLで発現に差が認められる分子群は、それぞれのタイプのALL細胞に特有の細胞内刺激伝達や転写制御に関与する可能性が考えられる。この情報は、pre-Bとpro-B ALLの特性の違いの解明や、両者に対する治療法の差別化の上で有用と考えられる。

E. 結論

B前駆細胞性ALL細胞株の表面抗原架橋によるアポトーシス誘導にraftを介した細胞内刺激伝達が重要である可能性が示された。また、B前駆細胞性ALLでもpre-Bとpro-B ALLではそれぞれ特性の異なる細胞内刺激伝達や転写制御機構を有するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katagiri-U Y, Kiyokawa N, Fujimoto J: A role for lipid rafts in immune cell signaling (review). *Microbiol Immunol* 45:1-8, 2001.
- 2) Kiyokawa N, Mori T, Taguchi I T, Saito M, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Sato N, Nakajima H, Katagiri YU, Takeda T, Fujimoto J: Activation of the Caspase Cascade During Stx1-induced Apoptosis in Burkitt's Lymphoma Cells. *J Cell Biochem* 81:128-142, 2001.

- 3) Katagiri-U Y, Kiyokawa N, Fujimoto J: The effect of Shiga toxin binding to globotriaosylceramide in rafts of human kidney cells and Burkitt's lymphoma Ramos cells (review). *Trends Glycosci Glyc* 13:281-290, 2001.
- 4) Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino T, Katagiri-U Y, Fujimoto J: CD24 induces apoptosis in human B cells via the GEM/rafts-mediated signaling system. *J Immunol* 166:5567-5577, 2001.
- 5) Katagiri YU, Ohmi K, Katagiri C, Sekino T, Nakajima H, Ebata T, Kiyokawa N, Fujimoto J. Prominent immunogenicity of monosialosyl galactosylglycoside, carrying a stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) epitope in the ACHN human renal tubular cell line-a simple method for producing monoclonal antibodies against detergent-insoluble microdomains/raft. *Glycoconj J* 18:347-353.2001.
2. 学会発表
- 1) 片桐 洋子, 清河 信敬, 藤本 純一郎
ラフト/マイクロドメインを認識するモノクローナル抗体の作成.
第90回日本病理学会総会, 東京, 4月5-7日, 2001.
- 2) 田口 智子, 清河 信敬, 片桐 洋子, 藤本 純一郎
B細胞のアポトーシス誘導における糖脂質膜ドメインの関与.
第90回日本病理学会総会, 東京, 4月5-7日, 2001.
- 3) 清河 信敬, 田口 智子, 森 鉄也, 片桐 洋子, 藤本 純一郎
大腸菌産生ペロ毒素によるヒトB細胞のアポトーシス誘導機構に関する検討.
第90回日本病理学会総会, 東京, 4月5-7日, 2001.
- 4) 田口 智子, 清河 信敬, 鈴木 東洋, 三森 謙一, 藤本 純一郎
CD24の架橋によるB前駆細胞のアポトーシス誘導に関する検討.
第63回日本血液学会総会, 名古屋, 4月19日, 2001.
- 5) 三森 謙一, 清河 信敬, 田口 智子, 鈴木 東洋, 藤本 純一郎
Burkitt's リンパ種細胞のCD20を介するアポトーシス誘導機構の解析.
第63回日本血液学会総会, 名古屋, 4月19日, 2001.
- 6) 片桐 洋子, 関野 貴臣, 清河 信敬, 藤本 純一郎
シガ毒素のGb3結合によるザーク型キナーゼYesの活性化.
第44回日本腎臓学会学術総会, 東京, 5月27-29日, 2001.
- 7) 清河 信敬, 片桐 洋子, 中尾 浩史, 竹田 多恵, 藤本 純一郎
ペロ毒素受容体Gb3の架橋による細胞膜マイクロドメイン(ラフト)を解する細胞内膜刺激伝達.
第48回毒素シンポジウム, 千葉, 7月25-27日, 2001.
- 8) Nobutaka Kiyokawa, Tomoko Taguchi, Kenishi Mimori, Toyo Suzuki, Tetsuya Mori, Yohko U. Katagiri, Junichiro Fujimoto.
Lipids rafts-mediated apoptotic signal in human Burkitt's lymphoma cells
30 th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, Tokyo, August. 25-28, 2001.
- 9) Tomoko Taguchi, Nobutaka Kiyokawa, Kenishi Mimori, Toyo Suzuki, Junichiro Fujimoto.
CD24 induces apoptosis in human pre-B and pro-B acute lymphoblastic leukemia cells via lipids rafts-mediated signaling system
30 th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, Tokyo, August. 25-28, 2001.
- 10) 田口 智子, 清河 信敬, 鈴木 東洋, 三森 謙一, 斎藤 正博, 藤本 純一郎
B前駆細胞性ALL細胞においてCD24はアポトーシス誘導刺激を伝達する.
第43回日本小児血液学会, 北九州, 9月21-22日, 2001.
- 11) 三森 謙一, 清河 信敬, 鈴木 東洋, 斎藤 正博, 田口 智子, 藤本 純一郎
CD20の架橋刺激はパーキット型リンパ腫細胞にアポトーシスを誘導する.
第43回日本小児血液学会, 北九州, 9月21-22日, 2001.
- 12) 田口 智子, 清河 信敬, 藤本 純一郎
細胞性腫瘍におけるraftを介する刺激伝達とアポトーシス誘導.
第60回日本癌学会総会, 横浜, 9月26-28日, 2001.
片桐 洋子, 中島 英規, 清河 信敬, 藤本 純一郎
ラフト/マイクロドメインを認識するモノクローナル抗体の作成.
第74回日本生化学会大会, 京都, 10月26日, 2001.
- 13) 田口 智子, 清河 信敬, 三森 謙一, 鈴木 東洋, 斎藤 正博, 関野 貴臣, 中島 英規, 片桐 洋子, 松尾 良信, 烏山 一, 藤本 純一郎
pre-B細胞のCD24誘導性アポトーシスとpre-BCR刺激によるその抑制/GEM糖脂質マイクロドメインを介するMAPキナーゼ活性化の関与.
第31回日本免疫学会総会, 大阪, 12月11-13日, 2001.
- 14) 三森 謙一, 清河 信敬, 田口 智子, 鈴木 東洋, 斎藤 正博, 関野 貴臣, 中島 英規, 片桐 洋子, 松尾 良信, 藤本 純一郎
B細胞のCD20を介するアポトーシス誘導におけるGEMの関与.
第31回日本免疫学会総会, 大阪, 12月11-13日, 2001.
- (5) 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況
無し
- H. 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

アポトーシス誘導分子の発癌と癌治療に果たす役割の解析

宮下 俊之 (国立成育医療センター研究所)

研究要旨

グルココルチコイド (GC) は生体内で産生されるステロイドホルモンであるが、白血病、リンパ腫の化学療法に必須の薬剤でもある。GC の薬効機序の解明を目的に、ヒト白血病細胞株 697 において、GC によって変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ (以下マイクロアレイ) 法により解析した。その結果 GC によって発現が 3 倍以上増加する遺伝子 93 個と、1/3 以下に減少する遺伝子 28 個がとれた。これらを機能別に分類すると、シグナル伝達、免疫反応、増殖抑制に関与するものがまとまって変動していることがわかった。これらの中に GC によって白血病細胞に誘導される細胞周期の停止やアポトーシスと呼ばれる細胞死に関連するものが含まれると考えられた。

A. 研究目的

GC は幼若なリンパ球や白血病細胞に細胞周期の停止とアポトーシスと呼ばれる細胞死を誘導することが知られており、これが抗がん剤としての作用と考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで我々は、マイクロアレイを用いて GC によって変動する遺伝子を網羅的に解析することから始めて、その標的遺伝子を同定することにより、GC の抗白血病剤としての作用機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

GC によってアポトーシスと細胞周期の停止をおこすヒト白血病細胞株 697 を用いた。細胞死によって二次的に変動する遺伝子を除外するため、抗アポトーシス癌遺伝子 *bcl-2* を高発現する 697 (697-Bcl-2) も用いた。合成 GC であるデキサメタゾン (DEX) 添加後、複数のタイムポイントで RNA を回収し、ビオチン標識 cRNA を合成した後、オリゴ DNA チップを用いて遺伝子の転写レベルを網羅的に解析した。697、697-Bcl-2 両者で 3 倍以上、あるいは 1/3 以下に発現量が変化した遺伝子をスクリーニングし、更に定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロット法を組み合わせて、マイクロアレイより得られたデータの確認を行った。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮が必要な研究は行わなかった。

C. 研究結果

GC によって発現が増加する遺伝子 93 個と、減少するもの 28 個が見出された。これらを機能別に分類するとシグナル伝達、免疫反応、増殖抑制等に関与するものがまとまって変動していることがわかった。そのうち多くの遺伝子の変動が半定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロット法により確認された。発現増加が認められた興味ある遺伝子として SOCS1、SOCS2、FKBP51、DSCR1 (以上シグナル伝達関連)、p19INK4d、BTG1、BTG2、HBP1、BIN1、(以上増殖抑制関連) 等が挙げられた。また GC 受容体自身も GC によって発現が誘導されることがわかった。更に、MAP キナーゼを脱リン酸化して活性を抑制するいくつかの遺伝子 (MKP2 等) の発現が GC によって抑制されることもわかった。

D. 考察

SOCS1、p56lck は GC による免疫抑制に、SOCS2 は成長抑制に、FKBP51、DSCR1 は免疫抑制とアポトーシスの両者に、Granzyme(Gzm)A、GzmK はアポトーシスに、p19INK4d、BTG1、BTG2、HBP1、BIN1 は細胞増殖の抑制にそれぞれ関与すると考えられた。これら遺伝子の変動のもつ生理的意義を解明するには、他の細胞や他の解析法を用いた更なる実験が必要と考えられた。この結果を蓄積することにより、将来新たな GC 誘導体のスクリーニングに用いることが可能であると考えられる。また患者由来の白血

病細胞を用いて同様の解析を行うことにより、個々の担白血病患者の GC を始めとする化学療法の対する反応性を予測することも可能となるであろう。また GC 添加後早期に増加する遺伝子の中には、GC 受容体によって直接転写活性化を受ける標的遺伝子があると考えられ、プロモーターやエンハンサーの解析が必要と思われた。

E. 結論

ヒト白血病患者細胞株 697 を用いて GC によって変動する遺伝子をマイクロアレイ法により解析した結果、GC によって発現が増加する遺伝子と、減少する遺伝子がそれぞれ 93 個と 28 個とれた。これらの中に、GC によって白血病患者細胞に誘導される細胞周期の停止とアポトーシスと呼ばれる細胞死に関連する遺伝子があるものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Cuddeback, S.M., Yamaguchi, H., Komatsu, K., Miyashita, T., Yamada, M., Wu, C., Singh, S., and Wang, H.G. : Molecular Cloning and Characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J. Biol. Chem.* 276: 20559-20565, 2001.

Shikama, Y., U, M., Miyashita, T., and Yamada, M. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.* 264: 315-325, 2001.

U, M., Miyashita, T., Ohtsuka, Y., Okamura-Oho, Y., Shikama, Y., and Yamada, M. Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death Diff.* 8 : 377-386, 2001.

U, M., Miyashita, T., Shikama, Y., Tadokoro, K., and Yamada, M. Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human

Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family. *FEBS Lett.* 509: 135-141, 2001.

Shikama, Y., Shen, L., Yonetani, M., Miyauchi, J., Miyashita, T., and Yamada, M. Death effector domain-only polypeptides of caspase-8 and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 484-493, 2002.

2. 学会発表

川上速人, 松原幸枝, 鹿間芳明, 宮下俊之: GFP 標識したカスパーゼ 10 プロドメインの細胞内局在--電顕組織化学的検討. 第 106 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2001.4.2-4, 高知

鹿間芳明, 宮下俊之, 山田正夫: カスパーゼ 8、10 のプロドメインによる Fas を介する細胞死の抑制. 第 60 回日本癌学会総会, 2001.9.26-28, 横浜

鹿間芳明, 禹麻美, 大塚裕子, 米谷元邦, 宮下俊之, 山田正夫: カスパーゼ 8、10 のプロドメインによる Fas 及び TRAIL を介する細胞死の抑制. 第 24 回日本分子生物学会年会, 2001.12.9-12, 横浜

米谷元邦, 鹿間芳明, 大塚裕子, 宮下俊之, 山田正夫: カスパーゼ 8、10 のプロドメインによる NF- κ B 活性化のメカニズムの検討. 第 24 回日本分子生物学会年会, 2001.12.9-12, 横浜

禹麻美, 鹿間芳明, 宮下俊之, 山田正夫: Bcl-2 ファミリータンパク質 Bim の新規アイソフォームの同定とその機能解析. 第 24 回日本分子生物学会年会, 2001.12.9-12, 横浜

柳澤比呂子, 宮下俊之, 中野芳朗, 山元大輔: キイロシヨウジョウバエ Spin のヒト相同蛋白質による細胞死誘導とその機構. 第 24 回日本分子生物学会年会, 2001.12.9-12, 横浜

Yoshida N., 宮下俊之, 山田正夫, Reed, J. C., 杉田雄二, 押田忠弘: Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. 第 24 回日本分子生

物学会年会, 2001.12.9-12, 横浜

宮下俊之, 押田忠弘; グルココルチコイドによる白血病細胞における遺伝子発現プロファイルの変化. 第 62 回小児血液・腫瘍懇話会, 2001.11.21, 東京

滝田順子, 宮下俊之, 陳 玉彦, 陳 迎章, 花田良二, 山本圭子, 林 泰秀: 神経芽種における 1p36 領域に存在する caspase 9 遺伝子の解析. 第 17 回日本小児がん学会, 2001.12.4-5, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別紙4

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

小児がんの遺伝的背景 関する研究

分担研究者 水谷修紀 東京医科歯科大学教授

研究要旨

小児がんの遺伝的発生要因の解明を目的としてAtaxia Telangiectasia (ATM)遺伝子異常が関与している可能性を解析した。その結果、乳児白血病の一部がATM遺伝子の異常を遺伝的背景として発症していることを明らかにした。この変異のために、DNA障害に対するp53やChk2の反応性が低下していたことから本症におけるATM異常の関与はかなり確実なものと考えられた。

A. 研究目的

一般にがんは生活習慣と遺伝的素因により生じるが、小児がんは遺伝的素因による影響が強いと考えられる。発がんの遺伝的素因を形成する種々の因子が解明されつつあるが、中でもゲノムの安定性の維持にかかわる遺伝子の障害は重要である。

ゲノムが順調に複製、分配されていることを監視するステップとして、細胞周期チェックポイントが存在する。チェックポイント機構が変調をきたせば細胞内で日常的に生じているDNA損傷の修復に障害をきたし、悪性腫瘍の発生に至る。このDNA障害を検知し、チェックポイント機能を発揮するATM遺伝子の存在が明らかにされたが、この分子は免疫不全や小脳障害、高発がんを特徴とする劣性遺伝病であるAraxia telangiectasia(AT)の責任遺伝子であった。欧米におけるATの疫学研究によって発生頻度は4万から10万人に1人、そのキャリアーは100人から300人に1人とされ、またそのキャリアーで乳がんや胃がんの発生率が高いとする報告が見られる。

本研究では小児がん患者における発がん素因としてATM遺伝子異常の関与を明らかにすることを目的にした。

B. 研究方法

AT患者やそのキャリアーの末梢血B細胞をEBウイルスで株化し、細胞生物学的性質を解析した。スクリーニング法の開発に向けてATM分子に対するモノクローナル抗体を作成し、生化学的解析に供した。酵母法を用いたATM遺伝子のストップコドンアッセイを確立し、大規模スクリーニングに供した。ウエスタン法、形質転換細胞の樹立、PCRなどは常法に従った。

(倫理面への配慮)

被験サンプルは患者（代諾者）の了解と学内倫理審査委員会の承認のもとに入手し、実験に供した。

C. 研究結果

AT患者から正常Bリンパ球を株化し、その蛋白量と機能変化の解析を行った。集めた20家系のAT患者ではATM蛋白の発現がほとんどの症例で認められなかった。またヘテロキャリアーにはいずれもノンキャリアーのATM量の半分程度の発現を認めた。これらの細胞株において放射線照射による細胞周期のG0/G1停止誘導能について解析した。その結果患者細胞株のすべてとヘテロ株の一部で障害が認められた。細胞周期制御異常をさらに詳細に解析する目的で、DNAダメージ後のMitoticチェックポイントの制御について解析した。その結果患者株のすべてとヘテロ細胞の一部において放射線照射後顕著な多倍体細胞の出現を認めた。このようにAT患者ならびにキャリアーにおいてはDNAダメージに対するチェックポイント機構の損傷が認められ、このことが発がん体質に寄与していると予想された。これらの方法を用いて種々の小児がん患者より樹立した末梢B細胞株を対象にATM遺伝子異常のスクリーニングを開始した。7例の乳児白血病患者からB細胞株を樹立し、同様の解析を行った。その結果4例においてATM蛋白の発現低下を認め、それらの株においてp53のリン酸化反応の低下を確認した。現在核酸配列の決定を進めているが、1例においてATMのミスセンス変異を発見した。この変異はATMのPI3-Kドメインに位置しており、変異アレルのサブクローニングに成功したので、ATM^{-/-}細胞株に導入し、機能の解析を行った。その結果p53のリン酸化反応が完全に欠如しており、クロノジェニック活性も低下していた。またさらに重要なことにU2OS細胞(ATM^{+/+}, p53^{+/+})に本遺伝子

を導入し、p53のリン酸化アッセイを行ったところ、変異蛋白が野生型p53の機能を抑制するドミナントネガティブ活性を有することが判明した。これらの遺伝子異常の発生頻度を100例の正常臍帯血を用いて解析した。その結果、乳児白血病に見られた変異は1%に見られることが明らかになった。

D. 考察

本研究によって、ゲノムの安定性を保証するATM遺伝子の異常が小児がんへの感受性を決定する可能性が明らかになろうとしている。今後さらに多数の症例における検討と、同様の遺伝子異常をもった健常人の追跡調査、さらにはこれらの遺伝的負荷を負った患者を発がんに導く付加的な遺伝要因や環境要因について明らかにする必要がある。また本邦におけるキャリアーの頻度が一部今回の研究で初めて明らかになった。

E. 結論

小児がんにおける遺伝的素因の研究に新しい扉を明けることができた。遺伝的素因が明らかになれば、発がんを促進する環境要因や生物学的要因も明らかにされる。そのような意味で遺伝的素因の解明は環境要因の解明にも道を開く。今後はこのような視点から発がん研究を進めていく必要がある。一般人口におけるキャリアーの発見は今後倫理的側面に配慮したうえで前方視的コホート研究の必要性を示している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Rika Tsuchida, Takayuki Yamada¹, Masatoshi Takagi, Akira Shimada, Chikashi Ishioka, Takashi Igarashi, Luciana Chessa, Domenico Delia, Hirobumi Teraoka and Shuki Mizutani Detection of ATM Gene Mutation in Human Glioma Cell Line M059J by a Rapid Frame-Shift/ Stop Codon Assay in Yeast. *Rad. Res in press*

2. Hajime Kawasaki, Keiichi Isoyama, Mariko Eguchi, Shigeyoshi Hibi, Naoko Kinukawa, Yoshiyuki Kosaka, Takanori Oda, Megumi Oda, Shin-ichiro Nishimura, Masue Imaizumi, Takayuki Okamura, Teruaki Hongo, Hiroji

Okawa, Shuki Mizutani, Yasuhide Hayashi, Ichiro Tsukimoto, Nanao Kamada, and Eiichi Ishii : Superior outcome of infant acute myeloid leukemia with intensive chemotherapy : results of the Japan Infant Leukemia Study Group *Blood* 98 :3589-94, 2001

3. Giacomo Buscemi, Camilla Savio, Laura Zannini, Francesca Micciche, Debora Masnada, Ma koto Nakanishi, Hiroshi Tauchi, Kenshi Komatsu, Shuki Mizutani, KumKum Khanna, Patrick Concannon, Luciana Chessa, Domenico Delia. : Chk2 Activation Dependence on Nbs1 after DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology* 21(15): 5214-22, 2001

4. Freda E.Alexander, Sherry L.Patheal, Andrea Biondi, Silvia Brandalise, Maria-Elena Cabrera, Li C.Chan, Zhu Chen, Giuseppe Cimino, Jose-Carlos Cordoba, Long-Jun Gu, Hany Hussein, Eiichi Ishii, Azza M.Kamel, Silvia Labra, Isis Q.Magalhaes, Shuki Mizutani, Eleni Petridou, Maria Pombo de Oliveira, Patrick Yuen, Joseph L.Wiemels, Mal F.Greaves. Transplacental Chemical Exposure and Risk of Infant Leukemia with MLL Gene Fusion. *Cancer Res* 61 ; 2542-46,2001

5. Minenori Eguchi-Ishimae, Mariko Eguchi, Eiichi Ishii, Sumio Miyazaki, Kazuhiro Ueda, Nanao Kamada, Shuki Mizutani. Brekage and fusion of the TEL(ETV6) gene in immature B lymphocytes induced by apoptogenic signals. *Blood* 97(3) ; 737-743, 2001

2. 学会発表

1. Shuki Mizutani, Genetic Basis of Childhood Malignancies- A Possible Role of Germline ATM Gene Mutation -台湾小児科学会 特別講演 台湾 2001.11.10-13

2. 浅田穰、絵野沢伸、一條秀憲、大見和宏、鈴木盛一、水谷修紀 p21の細胞質発現機構とASK1の制御第24回日本分子生物学会 横浜 2001.12.9-12

3. 高木正稔、小口薫、土田里香、山田孝之、浅田穰、恒松由起子、別所文雄、水谷修紀 毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (AT) 責任遺伝子ATMの一遺伝子多型 (SNPs) と小児血液悪性腫瘍発症の関係についての関与について 第24回日本分子生物学会 横浜 2001.12.9-12

H. 知的所有権の取得状況

なし