

20030152

厚生労働科学研究費補助金

がん克服戦略事業

研究分野 2

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

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 恒松 由記子

平成 15 (2004) 年 4 月

目 次

I 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・・・・・・1

II 分担研究報告書

1. 小児がん研究の基盤整備に関する研究；小児の治療関連二次性白血病の全国調査・・・11
恒松 由記子
2. 進行神経芽細胞腫における局所治療の意義に関する研究・・・・・・16
佐伯 守洋
2. 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・・・・・・18
藤本 純一郎
4. 高発がん性遺伝病 Gorlin 症候群の遺伝子解析・・・・・・23
宮下 俊之
5. 小児がんの遺伝的背景に関する研究・・・・・・27
水谷 修紀
6. RNA干渉を応用した神経芽細胞腫におけるN-myc蛋白発現抑制に関する研究・・・30
宮内 潤
7. 小児がんの遺伝疫学的研究・・・・・・33
谷村 雅子
8. 網膜芽細胞腫全国登録（1995-2003）・・・・・・39
東 規行

厚生労働省科学研究費補助金(がん克服戦略研究事業)

総括研究報告書

主任研究者 恒松由記子 国立成育医療センター小児腫瘍科医長

研究要旨 1) 小児がん研究の基盤整備 (恒松) : 小児がん後の二次性白血病が03年までに162例登録された。国立小児病院の二次性白血病症例9例のうち2例にp53胚細胞変異が認められた。二次性白血病研究は小児がんの原因研究にも寄与するところが大きい。2) 神経芽細胞腫 (佐伯) : 進行神経芽細胞腫(NSS4期24例、3期9例を対象に関して「局所の外科的根治性」が重要な臨床的予後決定因子であることが示された。3) B前駆細胞性ALL (藤本) : 本ALLに発現する分子CD179a/bが診断マーカーとして有用であることを明らかにした。4) NBCCS (Gorlin症候群) (宮下) : 日本人の13例(家族発症を含む)で10例のPTCHの変異が認められた。9/10例はフルームシフトあるいはスプライシングの異常から短い蛋白が生ずる変異でホットスポットは認められなかった。5) ArtemisとATM (水谷) : ATM異常を胚細胞レベルで解析し、乳児白血病や小児ホジキン病の発症においてATMが重要な役割を担っていることを明らかにした。またATMシグナル伝達機構の研究においてATMの下流に原発性免疫不全症原因遺伝子であるArtemisのATM依存性リン酸化が存在することを明らかにした。6) RNA干渉による神経芽腫のN-myc蛋白発現抑制効果の検討(宮内) : N-mycに対する短鎖RNAを作製して神経芽腫細胞株に導入し、RNA干渉作用を介したN-myc蛋白発現の抑制によって、N-myc蛋白の機能解析を試みたがN-myc蛋白量の変化は検出しえなかった。7) 小児がん全国登録(極小低出生体重児と肝芽腫) (谷村) : 極小低出生体重児に肝芽腫が多く発生する。体重が低いほど頻度が高い。出生体重1000g以下で相対危険度48.5, 1000gから1500gで6.9, 1500から2000で2.8であった。危険因子を酸素投与日数と推察。新生児尿の8-OHdG量測定し、1500g以下の児は高値であった。8) 網膜芽細胞腫全国登録(東) : 95-03の674例を検討した。75-82年で保存療法24%であったのに比べて、最近では56%で保存療法特に化療へ傾いている。

分担研究者 : 佐伯守洋 (国立成育医療センター) 藤本純一郎 (国立成育医療センター研究所) 宮下俊之 (国立成育医療センター研究所) 水谷修期 (東京医科歯科大学) 宮内潤 (国立成育医療センター) 谷村雅子 (国立成育医療センター研究所) 東範行 (国立成育医療センター)

A. 研究目的

本研究の目的は小児がんの遺伝学的・発生生

物学的な特性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、社会心理学的アプローチにより明らかにすることにある。1) 二次性白血病調査(恒松) : 小児がんの二次性白血病の実態調査を行い、その治療的・遺伝的背景を明らかにすること。2) 神経芽細胞腫(佐伯) : 進行性神経芽細胞腫における術中開窓照射併用手術の有効性を明らかにすること。3) 小児血液腫瘍、B前駆細胞性ALL(藤本) : 本ALL

に発現する分子の診断的有用性

を検討すること。4) NBCCS 母斑性基底細胞癌症候群の遺伝子解析(宮下):日本人におけるNBCCSの遺伝子変異の特徴を明らかにすること。5) p53 関連分子の探索(水谷): Artemis の ATM との関連を明らかにすること。6) RNA 干渉による神経芽腫の N-myc 蛋白発現抑制効果の検討(宮内): N-myc に対する短鎖 RNA を作製して神経芽腫細胞株に導入し、RNA 干渉作用を介した N-myc 蛋白発現の抑制によって、N-myc 蛋白の機能を解析すること。7) 小児がん全国登録(極小低出生体重児と肝芽腫)(谷村): 極小低出生体重児に肝芽腫が多く発生することの危険因子を探る事。8) 網膜芽細胞腫全国登録(東): 登録症例の傾向を探り今後の治療方針の参考にすること。

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) 二次性白血病調査: 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詳しい二次調査をおこなった。2) 進行性神経芽腫: INSS4 期 24 例、3 期 9 例を対象に治療成績、予後に影響を与えた臨床的因子などについて、各々の群にわけて Kaplan-Meier 法で生存率を計算し、検討した。3) 小児血液腫瘍、B 前駆細胞性 ALL: 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プロット解析を行った。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。4) NBCCS: PTCH 遺伝子の 23 エクソン全てについて各エクソンをはさむようにプライマーを作成し、ゲノム DNA を鋳型に PCR 反応を行い、PCR 産物を用いて直接シーケンス反応を行った。PTCH 遺伝子のアイソフォームの解析は 5' RACE 法、定量的 RT-PCR 法、レポータージーンアッセイ法等を駆使して行った。5) Artemis と ATM: 正常、ATM 欠損、NBS 欠損、DNA-PK 欠損細胞を用いて種々のドースの放射線を照射し、蛋白を抽出の後ゲル電気泳動にかけ、Artemis に対する抗体でウエスタンブロット解析を行った。また抗 NBS 抗体で免疫沈降し、沈降物を同様に電気泳動ののち抗 Artemis 抗体、抗 Mre11 抗体などでウエスタンブロット解析を行った。6) N-myc 蛋白発現抑制効果: N-myc 遺伝子の塩基配列に対応する 21 mer の siRNA を 4 種類合成し、二本鎖化した後にリポフェクション法によって細胞に導入を試みた。標的細胞として N-myc 遺伝子

の増幅を伴った神経芽腫細胞株を使用した。ウェスタンブロット法にて蛋白発現に対する影響を解析した。7) 小児がん全国登録:1985-2001年診断例 11, 742 例の資料を用いて、小児がんの種類別に低出生体重児の比率を調べた。極低出生体重児と肝芽腫のリスクについて新生児尿の 8-OH dG 量測定した。8) 網膜芽細胞全国登録: 95-03 の 674 例を検討した。

B. 研究結果

1) 二次性白血病: 国立小児病院の二次性白血病症例 9 例のうち 2 例に p53 胚細胞変異が認められた。2) 神経芽細胞腫: 進行神経芽細胞腫に関して「局所の外科的根治性」が重要な臨床的予後決定因子であることが示された。3) 小児血液腫瘍の遺伝子発現解析: ALL の新たな診断マーカーとして CD179a/b が加えられた。4) NBCCS の遺伝子解析: 遺伝性腫瘍症としての Gorlin 症候群の遺伝子診断が可能となり、非定型例や小児例でも早期に変異原への暴露をさけることが可能となった。種々のがんにおける Sonic hedgehog-PTCH シグナル伝達の活性化の程度がわかり、またこのシグナル伝達を特異的に阻害する薬剤のスクリーニングにも貢献すると考える。5) Artemis と ATM: 乳児白血病や小児ホジキン病の発症において ATM が重要な役割を担っていることを明らかにした。6) 神経芽腫 N-mycRNA 干渉: N-myc 蛋白量の変化は検出しえなかった。7) 極低出生体重児と肝芽腫のリスク: 新生児尿の 8-OH dG 量測定して酸素投与日数と関連していることが示唆された。数少ない小児がんの環境因子が考えられる例と

して興味もたれている。8) 網膜芽細胞全国登録: Grade5(54%)とまだ依然進行例が多く、最近では保存療法特に化療へ傾いている。

C. 考察

二次性白血病: 発生要因には遺伝的・治療的因子の双方が絡んでいて小児がんの原因研究にも寄与するところが大きい。多施設共同で小児がん原因研究を行うためには population based の登録とフォローアップ研究、家系登録を勧めるための基盤整備が必要である。進行神経芽腫: 現行では開窓照射併用外科手術が局所根治性を確保する最も徹底した治療技術であり、その有用性が示された。3) 小児血液腫瘍の遺伝子発現解析: バイオフラボノイドの ALL に対する治療効果が期待され、大量摂取に対する安全性の検討が必要である。4) NBCCS の遺伝子解析: 種々のがんにおける Sonic hedgehog-PTCH シグナル伝達の活性化の程度がわかり、またこのシグナル伝達を特異的に阻害する薬剤のスクリーニングにも貢献すると考える。5) Artemis と ATM: 分子の生理機能を明らかにする視点として DNA 損傷修復における Artemis の ATM 依存性リン酸化という新たな経路の存在が示された。6) 神経芽腫 N-mycRNA 干渉: negative data を得たが今後も検討する必要がある。7) 極低出生体重児と肝芽腫のリスク: 数少ない小児がんの環境因子が考えられる例として興味もたれている。8) 網膜芽細胞全国登録: Grade5(54%)とまだ依然進行例が多く、最近では保存療法特に化療へ傾いているので二次性白血病などの監視が必要である。

E. 結論 以上の各分担研究者の研究成果や登録事業、小児がんが多く集積する病院における院内データベースにもとづく研究は今後も小児がんの原因研究において重要なものであると考えられる。また、今後も成育医療センターを中心として特に受けた医療が及ぼす晩期障害や遺伝的な影響について、研究とすることが必要とされている。それには、小児がんの基礎研究、疫学的情報の収集を行う上での基盤づくりが重要で、全国登録と網膜芽細胞腫登録事業は地域がん登録事業と連携して互いにより登録率を上げて精度の高い登録を行っていくことが重要である。そのためには、わが国においてもデータベースの医療情報と患者由来資料の管理と保護の倫理的問題が重要になってくる。

F. 健康危害情報

今年度の登録調査により、小児の二次性白血病は減少しているものも依然として報告があること、網膜芽細胞腫からの二次性白血病は今年度は新たな症例はいなかったが今後も監視が必要であることが示唆された。

G. 研究発表

1. Fujii, K., Kohno, Y., Sugita, K., Nakamura, M., Moroi, Y., Urabe, K., Furue, M., Yamada, M., and Miyashita, T. Mutations in the human homologue of *Drosophila patched* in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum. Mutat.*, *21*: 451-452, 2003.
- 2.
3. Fujii, K., Miyashita, T., Omata, T., Kobayashi, K., Takanashi, J., Kouchi, K., Yamada, M., and Kohno, Y. Gorlin syndrome with ulcerative colitis in a Japanese girl. *Am. J. Med. Genet.*, *121A*: 65-68, 2003.
4. Miyahara, A., Okamura-Oho, Y., Miyashita, T., Hoshika, A., and Yamada, M. Genomic structure and alternative splicing of the insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53-kDa protein. *J. Hum. Genet.*, *48* 410-414, 2003.
5. Okamura-Oho, Y., Miyashita, T., Nagao, K., Shima, S., Ogata, Y., Katada, T., Nishina, H., and Yamada, M. Dentatorubral-pallidolucylian atrophy protein is phosphorylated by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Hum. Mol. Genet.*, *12* 1535-1542, 2003.
6. Shikama, Y., Yamada, M., and Miyashita, T. Caspase-8 and caspase-10 activate NF- κ B through RIP, NIK and IKK kinases. *Eur. J. Immunol.*, 1998-2006, 2003.
7. Wu, Z., Shen, L., Inatomi, Y., U M, Miyashita, T., Toyama, K., and Miyauchi, J. Effects of TNF alpha

- on the growth and sensitivity to cytosine arabinoside of blast progenitors in acute myelogenous leukemia with special reference to the role of NF-kappaB. *Leuk. Res.*, 27: 1009-1018, 2003.
8. Yanagisawa, H., Miyashita, T., Nakano, Y., and Yamamoto, D. HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death Differ. Cell.* 10: 798-807, 2003.
 9. Nagao, K., Fujii, K., Yamada, M., and Miyashita, T. Identification of a novel polymorphism involving a CGG repeat in the PTCH gene and a genome-wide screening of CGG-containing genes. *J. Hum. Genet.*, 49: 97-101, 2004.
 10. Delia, D., Fontanella, E., Ferrario C., Chessa, L., and Mizutani, S. DNA damage-induced cell cycle-phase regulation of p53 and p21waf1 in normal and ATM-defective cells. *Oncogene*.2003; 22(49): 7866-9.
 11. Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, Yata JI, Mizutani S. Ochs HD, Nonoyama S. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood*. 103(2): 456-64. 2004
 12. Takagi M, Tsuchida R, Oguchi K, Shigeta T, Nakada S, Shimizu K, Ohki M, Delia D, Chessa L, Taya Y, Nakanishi M, Tsunematsu Y. Bessho F, Isoyama K, Hayashi Y, Kudo K, Okamura J, Mizutani S. Identification and characterization of polymorphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease. *Blood*. 103(1): 283-90.2004
 13. Yagi T, Morimoto A, Eguchi M, Hibi S, Sako M, Ishii E, Mizutani S. Imashuku S, Ohki M, Ichikawa H. Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood*. 2003 ; 102(5):1849-56.
 14. Yamaguchi M, Yamamoto K, Miki T, Mizutani S. Miura O. T-cell prolymphocytic leukemia with der(11)t(1:11)(q21;q23) and ATM

- deficiency. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 ; 146(1) : 22-26.
15. Imai M, Mizutani S, Morio T. Coordinated regulation of the promoter and enhancer regions of human CD23 gene by signal through IL-4R and CD40, and the role of Ku70/80 in the enhancer activity. *J Med Dent Sci.* 2003 ; 50(2): 155-65.
16. Lin L, Nonoyama S, Oshiba A, Kabasawa Y, Mizutani S. TARC and MDC are produced by CD40 activated human B cells and are elevated in the sera of infantile atopic dermatitis patients. *J Med Dent Sci.* 2003 ; 50(1): 27-33.
17. Mizutani S. Recent Advances in Study of Genetic and Environmental Risk Factors of Childhood Leukemia. *Acta Paediatr Tw.* 2003 ; 44 (3) : 130-134.
18. Oguchi K, Takagi M, Tsuchida R, Taya Y, Ito E, Isoyama K, Ishii E, Zannini L, Delia D, Mizutani S. Missense mutation and defective function of ATM in a childhood acute leukemia patient with MLL gene rearrangement. *Blood.* 2003 ; 101(9) : 3622-27.
19. Zhu Y, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu M, Honjo T, Mizutani S. Type Two Hyper-IgM Syndrome caused by Mutation in Activation-Induced Cytidine Deaminase. *J Med Dent Sci.* 2003 ; 50 (1) : 41-46
20. Taguchi, T., Kiyokawa, N., Mimori, K., Suzuki, T., Sekino, T., Nakajima, H., Saito, M., Katagiri, YU., Matsuo, N., Matsuo, Y., Karasuyama, H., Fujimoto, J Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *J Immunol.*, 170: 252-260, 2003.
21. Taguchi, T., Kiyokawa, N., Mimori, K., Suzuki, T., Sekino, T., Nakajima, H., Saito, M., Katagiri, YU., Matsuo, N., Matsuo, Y., Karasuyama, H., Fujimoto, J.: Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *J Immunol.*, 170: 252-260,

22. Mimori, K., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Suzuki, T., Sekino, T., Nakajima, N., Saito, M., Katagiri, YU., Isoyama, K., Yamada, K., Matsuo, Y., Fujimoto, J.: Co-stimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia.*, 17: 1164-1174, 2003.
23. Mori, T., Kiyokawa, N., Shimada, H., Miyauchi, J., Fujimoto, J.: Anaplastic large cell lymphoma in Japanese children.: Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research Institute for Child Health and Development. *Br J Hematol.*, 121: 94-96, 2003.
24. Furusawa, T., Hosoe, M., Ohkoshi, K., Takahashi, S., Kiyokawa, N., Fujimoto, J., Amemiya, H., Suzuki, S., Tokunaga, T.: Catalytic RAG1 mutants obstruct V(D)J recombination in vitro and in vivo. *Mol Immunol.*, 39: 871-878, 2003.
25. Honma, D., Uenishi, H., Hiraiwa, H., Watanabe, S., Tang, W., Kiyokawa, N., Fujimoto, J., Yause, H., Sakimura, K.: Cloning and characterization of porcine common chain gene. *J Interf Cytok Res.*, 23: 101-111, 2003.
26. Ohtomo, Y., Kawamura, R., Kaneko, K., Yamashiro, Y., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Mimori, K., Fujimoto, J.: Nephrotic syndrome associated with human parvovirus B19 infection. *Pediatr Nephrol.*, 18: 280-282, 2003.
27. Ohkoshi K, Takahashi S, Koyama S, Akagi S, Adachi N, Furusawa T, Fujimoto J. Izaike Y, and Tokunaga T. Caprine somatic cell nuclear transfer using in vivo matured oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Animal Science J* 74: 269-276. 2003.
28. Ohkoshi K, Takahashi S, Koyama S, Akagi S, Adachi N, Furusawa T, Fujimoto J. Takeda K, Kubo M, Izaike Y, Tokunaga T. In vitro oocyte culture and somatic cell nuclear transfer used to produce a live-born cloned goat. *Cloning Stem Cells* 5: 109-115. 2003.
29. Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang WR, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Karagiri YU,

- Okita H, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Characterization of a Shiga-toxin 1-resistant Stock of Vero cells. *Microbiol Immuno* (in press).
30. Mori, T., Sugita, K., Kimura, K., Fuke, T., Miura, T., Kiyokawa, N., Fujimoto, J.: Isolated central nervous system relapse in a case of childhood systemic anaplastic large cell lymphoma without initial involvement. *J Pediatr Hematol Oncol.*, 25: 975-977, 2003.
31. Kiyokawa, N., Sekino, T., Matsui, T., Takenouchi, H., Mimori, K., Tang, W., Matsui, J., Taguchi, T., Katagiri, YU., Okita, H., Matsuo, Y., Karasuyama, Y., Fujimoto, J.: Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-Cell lymphoblastic lymphoma. *Mod Pathol* (*in press*).
32. Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li X-K, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharoidosis VII. *Gene Therapy*, 10:406-414, 2003.
33. Ohtake Y, Tanino T, Suzuki Y, Miyata H, Taomoto M, Azuma N, Tanihara H, Araie M, Mashima Y. Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (CYP1B1) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 87:302-304, 2003.
34. Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M. Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic nerve malformations. *Am J Hum Genet*, 72:1565-1570, 2003.
35. Siozawa N, Tazima S, Azuma N, Hiroki K, Kono T, Itou M. Histological study of the hypertrophic placentas and open eyelid observed in cloned fetuses. *J Reprod. Dev*, 49:221-226, 2003.
36. Kanaji A, Kosuga M, Li X-K, Fukuhara Y, Tanabe A, Kamata Y, Azuma N, Yamada M, Sakamaki T, Toyama Y, Okuyama T. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharoidosis type vii by

- neonatal adenoviral gene transfer.
Molecular Therapy, In press.
37. Nishitai G, Shimizu N, Negishi T, Kishimoto H, Nakagawa K, Kitagawa D, Watanabe T, Momose H, Ohata S, Tanemura S, Asaka S, Kubota J, Saito R, Yoshida H, Mak TW, Wada T, Penninger JM, Azuma N, Nishina H, Katada T. Stress induces mitochondria-mediated apoptosis independent of SAPK/JNK activation in ES cells. *J. Biol. Chem.* In press.
38. Nishina H, Nakagawa K, Azuma N, Katada T. [review] Activation mechanism and physiological roles of stress-activated protein Kinase/c-Jun NH2-terminal kinase in mammalian cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* In press.
39. Azuma N, Kawase E, Suzuki Y, Yamada M. Mutation of PAX6 gene detected in patients with congenital optic nerve anomalies. European Society of Ophthalmology, 337-343, 2003. (*in press*).
40. Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li X-K, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyana T. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharoidosis Gene Therapy; *in press*
41. Watanabe N, Kobayashi H, Ichji O, Yoshida MA, Kikuta A, Komada Y, Sekine I, Ishida Y, Horiukoshi Y, Tsunemastu Y, Yamo M, Nakadade H, Kaneko Y. Cryptic insertion and translocation or nondividing leukemic cell disclosed by FISH analysis in infant acute leukemia with discrepant molecular and cytogenetic findings. *Leukemia.* 2003 17:876-882, 2003.
42. Kuroda, T., Saeki, M., Honna, T. Masaki, H., Tsunematsu Y: Clinical significance of intensive surgery with intraoperative radiation for advanced neuroblastoma; Does it really make Sense? *J of Pediatr Surg*, 38(12): 1735-1738, 2003

邦文 (2003-2004)

1. 恒松由記子, 佐々木祥子: 今日の
がん治療と看護 小児がん, が
ん看護 8(1): 59-69, 2003.
2. 恒松由記子: 小児血液・腫瘍性疾患
プロトコール研究実施前のコミュニ
ケーションとインフォームドコンセ
ント. 小児血液・腫瘍疾患治療プロ
トコール集. 月本一郎編著, p.
316-326, 医薬ジャーナル社, 2003.
3. 恒松由記子: 小児の治療関連二次性
白血病—最近の動向と小児二次性白
血病登録 149 例の分析—. 小児白血
病診療ハンドブック. 月本一郎編著,
p.205-218, 中外医学社, 2003.
4. 恒松由記子: 小児への情報伝達とケ
ア. 緩和医療学. Vol.5,no.4,p.38-p48,
先端医学社, 2003.
5. 恒松由記子, 熊谷昌明, 味木和
喜子: 小児固形がん. 臨床腫瘍
学 46. 日本臨床腫瘍学会編, p.
912- p. 932, 癌と科学療法社.
2003.
6. 恒松由記子, 村上好恵, 武田祐
子, 菅野康吉, 小杉真司, 権藤
延久, 齋藤有紀子, 田村智英子,
横山士郎, 田村和朗: 総説 癌
遺伝カウンセリングにおけるコ
ミュニケーション. 家族性腫瘍
第4巻 第1号,p33-p38,2004.
7. 宮内 潤: 幼児の唾液腺原発腺
房細胞癌の1例. 小児がん
39:586, 2003
8. 高場恵美, 松岡健太郎, 宮内 潤:
幼児の唾液腺原発粘表皮癌の1例.
小児がん 39:587, 2003
8. 松岡健太郎, 宮内 潤: 後腹膜腫
瘍の1例. 小児がん 39:593,
2003
9. 松岡健太郎, 宮内 潤: 肺過誤腫
の一例. こども医療センター医
学誌 32:101, 2003
10. 黒田 達夫, 本名 敏郎, 田中 潔,
森川 信行, 北野 良博, 瀧本 康
史, 田中 圭一朗, 川島 憲子,
町頭 成郎, 恒松 由記子, 熊谷 昌
明, 正木 英一, 宮内 潤, 松岡 健
太郎, 佐伯 守洋: 当院における
乳児神経芽細胞腫の治療ならび
に長期経過の検討. 小児がん
41(1), 2004 (印刷中)

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略事業）

小児がんの基盤整備に関する研究：小児の治療関連二次性白血病の全国調査

分担研究報告書 国立成育医療センター小児腫瘍科医長

研究要旨：小児科領域では 94 年より全国調査が開始され（長尾班）現在も続けられている。エトポシドの使用について筆者らは、白血病発生のリスクを上回る便益がなければ使用しないという原則を提言してきた。小児がん後の二次性白血病が 03 年までに 162 例登録された。国立小児病院の二次性白血病症例 9 例のうち 2 例に p53 胚細胞変異が認められた。本年度は 2001 年までに集計された 149 例の解析を報告した。二次性白血病研究は小児がんの原因研究にも寄与するところが大きい。最近の登録例では、多剤大量療法を重ねて生存を続けていた難治性・再発性小児がん患者から二次性白血病発生が続いている。筆者の施設でもこのところ毎年数人づつ発症し P53 胚細胞変異等遺伝的背景をもつ場合には遺伝カウンセリングも必要とされてきて、深刻な事態となっている。

A 目的：わが国の小児がん治療後の二次性白血病発生の実態をあきらかにすること

B 研究方法：厚生労働省がん研究助成金小児の難治性白血病研究班（水谷班・旧月本班・長尾班）では「二次性白血病調査研究グループ」をつくり、国立成育医療センター小児腫瘍科（旧国立小児病院）から全国173の小児血液学会会員所属施設に94年9月から毎年1回調査票を送付し回収して登録を行った。一次がんの発症年齢は15歳未満とし、81年以降に発生した悪性リンパ腫を含む二次性造血器腫瘍とした。二次性白血病は前述のSEERの定義に従った。一次腫瘍が白血病の場合、二次調査票に記載された免疫マーカーや染色体核型等から二次性白血病と判定した。同種骨髄移植後の血液腫瘍にはドナー由来の腫瘍やBPLなど特殊なものが含まれるため集計からは除外した。TRLの経過

中MDSの相を経過したものはすべてMDSとした。MDSの中の細分類については省略した。

C 研究結果：1981年から01年7月までに発生した症例のうち149例（男78女71、不明3）が72施設より適格例として解析された。134例で染色体検査結果が確認された。以下に 2001年までの149例の集計結果を述べる。

一次腫瘍の内訳（括弧内数）は、ALL（30）NHL（27）ANLL（12）LCH（6）等と造血器腫瘍から79例、NBL（27）RMS（9）GCT胚細胞性腫瘍（9）等と固形腫瘍から70例でわが国ではNBLからの発症が多い。神経芽細胞腫では1歳以下の発症が27例中11例（うち4例がマススクリーニング例）であった。表1に一次腫瘍別に二次性白血病/MDSのFAB分類を示した。（表1）M3はすべてLCHから発症していた。表2に一次腫瘍別に発生したTRLの核型のパター

ンを示した。(表2) 複数の複雑な核型を保有するものが多かったが(データは示さず)2症例以上に認められた後述する6種類の均衡転座型と5q-, 7/7q-などを主とする欠失型およびその他の核型パターンに分類した。核型パターンでは欠失型が46例で最も多く、均衡転座型では11q23転座が42例と大部分を占め、ついで21q22転座が5例うち t (8 ; 21) が 例, t (3 ; 21) が1例、 t (16 ; 21) が1例、t(15;17)が4例 (4例ともLCH続発22) 23)) ついで11 p 15 24) が3例inv16とt(9 ; 22)(q34 ; q11)が2例ずつであった。

D 考察：神経芽細胞腫 では1歳以下の発症が27例中11例で予後のよい集団に不必要に化学療法が行われた母集団が多くここから二次性白血病が発生したことが推察される。

月本らによる調査で1985～95年11年間の de novoの小児白血病3,415例の中ではALLが67%と多い。残りのCMLも含めたde novo ANLLの内訳を見るとMDSが9%であるが、TRLでは、MDSが46%と多くALLは6%と少ないのがわかる。TRLのFAB分類ではMDS, M4, M5 M2が多いがde novoで小児に多いM7は一例もないのが特徴である。全般的に今回調査によるTRLではde novo 白血病/MDSに比較して染色体異常が複雑で何種類もの付加的異常があるものが多かった。

以下に一次がんの治療法からみたわが国小児のTRLの特徴を考えてみる。前述のよう

に、本調査からはTRLのリスクファクターを分析、特定することはできないが、登録症例が、今までに示されてきた傾向があるかどうかをみることは重要である。登録例は外科治療のみの群または放射線治療のみの群はなく、化学療法単独あるいは放射線治療と化学療法との併用のいずれかである。化学療法は多くの例で多剤併用療法が長期間行なわれている。11q23転座のすべての例でトポIIが使われておりトポIIが使用されていない例には11q23転座例は含まれていなかった。すなわち、11 q 23転座TRLでエトポシドが関連していない群ではそれ以外のトポII阻害剤が関与していた。アルキル化剤と放射線の治療の有無により核型パターンの頻度分布を見ると、欠失型の染色体異常を持つものでは、アルキル化剤と放射線が併用されているものが多かった。また、一例をのぞき欠失型にはすべてにアルキル化剤が使用されていて、欠失型TRLの発生にアルキル化剤と放射線の双方が関連していることがわかった。以上欧米での調査と一致する点が多い。

二次がんの要因には治療的要因のほかに遺伝的ながん罹患のハイリスク者であることが多い。本調査では、家族歴や本人の遺伝的・先天的な異常を記載する欄があるが、149例のうち、3例の両眼性網膜芽細胞腫、一例のFanconi 貧血、一例のp53胚細胞変異が記載されていた。

E 結論：TRLの発生はエトポシドが発売された87年から数年してからピークを迎え

表 1 一次腫瘍の種類で分けた二次性白血病 /MDS 149 例の FAB 分類別分布 (1981~2001 年発生)

	ALL	ANLL	NHL	LCH	LHL/ML	subtotal	NB	RMS	GCT	ES/PNET	HT	RB	OS	WT	BT	other	subtotal	total	
NHL	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
M0	1	0	2	0	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5
M1	1	0	2	1	0	4	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	3	7
M2	2	2	3	0	0	7	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	5	12
M3	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
M4	0	1	5	0	0	6	1	0	1	2	1	2	0	0	1	0	0	8	14
M5	10	1	2	0	0	13	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	4	17
M6	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
M7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AML nos	2	0	2	0	2	6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	8
ALL	0	0	0	1	0	1	4	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	8	9
CML	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MDS	13	8	11	0	1	33	17	7	3	1	2	0	1	0	2	2	2	35	68
Total	31	12	27	6	3	79	27	9	9	5	5	4	3	2	3	3	70	149	

nos: not other specified, NB: neuroblastoma, RMS: rhabdomyosarcoma, GCT: germ cell tumor, ES: Ewing sarcoma, BT: brain tumor

表 2 一次腫瘍の種類で分けた二次性白血病 /MDS 134 例の核型パターン別分布 (81~01 年発生)

	ALL	ANLL	NHL	LCH	LHL/ML	subtotal	NBL	RMS	GCT	ES/PNET	HT	RB	OS	BT	other	subtotal	total
normal	2	0	1	1	2	6	1	0	1	0	0	1	1	0	0	4	10
deletion	9	4	10	0	1	24	10	4	2	2	1	0	1	1	1	22	46
11q23 転座	12	5	8	0	0	25	8	0	2	1	2	1	1	0	2	17	42
21q22 転座	0	1	1	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	3	5
t(15;17)	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
11q15 転座	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
inv16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	2
t(9;22)(q34;q11)	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
other	3	2	4	0	0	9	2	1	2	0	2	1	0	1	2	11	20
total	29	12	24	6	3	74	24	5	7	5	5	3	3	3	5	60	134

nos: not other specified, NB: neuroblastoma, RMS: rhabdomyosarcoma, GCT: germ cell tumor, HT: hepatic tumor, RB: retinoblastoma, OS: osteosarcoma, BT: brain tumor

たが、その後は減少しているかに見える。潜伏期間は多剤併用している例が多いのでいつ現れるかは予測が困難である。すなわち、12ヶ月から15年以上に及ぶ。難治性の一次腫瘍や再発性の腫瘍の生存率が上がっている中で、今後も二次性白血病の発生は続くものと考えられ、監視を怠ることはできない。

F. 健康危害情報

今年度の登録調査により、小児の二次性白血病は減少しているものも依然として報告があること、網膜芽細胞腫からの二次性白血病は今年度は新たな症例はいなかったが今後も監視が必要であることが示唆された。

G 研究発表

1. Takagi M, Tsuchida R, Oguchi K, Shigeta T, Nakada S, Shimizu K, Ohki M, Delia D, Chessa L, Taya Y, Nakanishi M, Tsunematsu Y, Bessho F, Isoyama K, Hayashi Y, Kudo K, Okamura J, Mizutani S. Identification and characterization of polymorphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease. *Blood*. 103(1): 283-90.2004
2. Watanabe N, Kobayashi H, Ichji O, Yoshida MA, Kikuta A, Komad Y, Sekine I, Ishida Y, Horiukoshi Y, Tsunemastu Y,

Yamo M, Nakadade H, Kaneko Y.:Cryptic insertion and translocation or nondividing leukemic cell disclosed by FISH analysis in infant acute leukemia with discrepant molecular and cytogenetic findings. *Leukemia*.2003 17:876-882,2003.

3. Kuroda, T., Saeki M., Honna, T. Masaki, H., Tsunematsu Y: Clinical significance of intensive surgery with intraoperative radiation for advanced neuroblastoma; Does it really make Sense? *J of Pediatr Surg*, 38(12): 1735-1738, 2003
4. 恒松由記子, 佐々木祥子: 今日のがん治療と看護 小児がん. *がん看護* 8(1): 59-69, 2003.
5. 恒松由記子: 小児血液・腫瘍性疾患プロトコール研究実施前のコミュニケーションとインフォームドコンセント. *小児血液・腫瘍疾患治療プロトコール集*. 月本一郎編著, p. 316-326, 医薬ジャーナル社, 2003.
6. 恒松由記子: 小児の治療関連二次性白血病—最近の動向と小児二次性白血病登録 149 例の分析—. *小児白血病診療ハンドブック*. 月本一郎編著, p.205-218, 中外医学社, 2003.

7. 恒松由記子：小児への情報伝達と
ケア．緩和医療学．
Vol.5,no.4,p.38-p48、先端医学社、
2003.

8 恒松由記子、熊谷昌明、味木和
喜子：小児固形がん．臨床腫瘍学 46．
日本臨床腫瘍学会編、p．912-p．
932、癌と科学療法社．2003.

9 恒松由記子、村上好恵、武田祐子、
菅野康吉、小杉眞司、権藤延久、齋藤有
紀子、田村智英子、横山士郎、田村和朗：
総説 癌遺伝カウンセリングにおける
コミュニケーション．家族性腫瘍 第4
巻 第1号、p33-p38、2004.

研究要旨

進行神経芽細胞腫症例 33 例（INSS4 期 24 例、3 期 9 例）を対象とした検討より、術中開窓照射併用腫瘍全切除術後の N-myc 増幅進行神経芽細胞腫の無病生存率は 55.9%であった。予後因子として N-myc 増幅、幹細胞移植の有無や微小転移巣の有無では生存率に有意差が出なかったが、外科手術における肉眼的遺残腫瘍の有無では有為差（ $p < 0.01$ ）をもって腫瘍全摘症例の生存率が高かった。進行神経芽細胞腫に関して「局所根治性」が重要な臨床的予後決定因子であり、局所根治性を確保する医療技術として「開窓照射併用手術」の有用性が示された。

（倫理面への配慮）

A. 研究の背景・目的

われわれはがん遺伝子や微小転移の検索など小児がん治療の細胞・遺伝子レベルでのテーラーメイド化について検討してきた。今回はその結果として、転移細胞の動態を勘案し、進行神経芽細胞腫の局所根治性を高めた「術中開窓照射併用外科治療」についてその効果を評価し、臨床的予後因子についても検討することを目的とした。

B. 研究の対象と方法

われわれの施設において術中開窓照射併用手術を行った進行神経芽細胞腫症例 33 例（INSS4 期 24 例、3 期 9 例）を対象に治療成績、予後に影響を与えた臨床的因子などについて、各々の群にわけて Kaplan-Meier 法で生存率を計算し、検討した。臨床結果より進行神経芽細胞腫の転移動態を考察した。

1) 個人情報に関してはいっさい研究のための情報に含めていない。

2) ゲノムや SNPs などの情報を扱った研究ではない。

C. 研究結果

術中開窓照射を併用した手術後に照射野からの局所再発例はなく、本治療法の導入により N-myc 増幅進行神経芽細胞腫の無病生存率は 55.9%であった。

肉眼的遺残腫瘍のある症例では、開窓照射併用により局所再発はなかったが全例が遠隔転移巣再発で亡くなっていた。その結果、N-myc 増幅の有無、幹細胞移植の有無や微小転移巣の有無では生存率に有意差が出なかったが、外科手術における肉眼的遺残腫瘍の有無では有為差（ $p < 0.01$ ）をもって腫瘍全摘症例の生存率が高かった。

D. 考察

本研究結果とこれまでの微小転移動態の研究結果より、神経芽細胞腫において原発巣より腫瘍細胞が常到大循環系へ入り、全身へまわる腫瘍細胞動態が示唆された。これは本腫瘍の生物学的な特徴と考えられた。

さらに臨床的に重要な予後因子として「外科的根治性」が同定された。現在集計中のマイクロアレイを利用した遺伝子発現結果との突き合わせにより、外科的根治性と相関する遺伝子発現プロファイルをさらに詳細に検討してゆく必要がある。

E. 結論

進行神経芽細胞腫に関して「局所の外科的根治性」が重要な臨床的予後決定因子であることが示された。現行では開窓照射併用外科手術が局所根治性を確保する最も徹底した治療技術であり、その有用性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tatsuo Kuroda, Morihiro Saeki, Toshiro Honna, Hidekazu Masaki, Yukiko Tsunematsu: Clinical Significance of Intensive Surgery with Intraoperative Radiation for Advanced Neuroblastoma;

Does It Really Make Sense? *Journal of Pediatric Surgery*, 38(12): 1735-1738, 2003

- 2) 黒田 達夫、本名 敏郎、田中 潔、森川 信行、北野 良博¹⁾、瀧本 康史¹⁾、田中 圭一朗、川島 憲子、町頭 成郎、恒松 由記子、熊谷 昌明、正木 英一、宮内 潤、松岡 健太郎、佐伯 守洋: 当院における乳児神経芽細胞腫の治療ならびに長期経過の検討. *小児がん* 41(1), 2004 (in press)

2. 学会発表

- 1) Tatsuo Kuroda, Morihiro Saeki, Toshiro Honna, Hidekazu Masaki, Yukiko Tsunematsu: Clinical Significance of Intensive Surgery with Intraoperative Radiation for Advanced Neuroblastoma; Does It Really Make Sense? The 36th Annual Meeting of Pacific association of Pediatric Surgeons, Sidney, 2003.5
- 2) 黒田達夫、本名敏郎、中野美和子、田中潔、森川信行、北野良博、松田博光、川島憲子、田中圭一郎、正木英一、恒松由記子、熊谷昌明、宮内潤、松岡健太郎、佐伯守洋: Tumor board の機能; 神経芽細胞腫に関する術中開窓照射併用手術の成績. 第 40 回日本小児外科学会総会、京都、2003.5

厚生労働科学研究費補助金（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 国立成育医療センター研究所 副所長

研究要旨： 小児白血病/リンパ腫の各病型ごとの特性について、細胞膜表面分子を介する刺激伝達や、遺伝子の発現様式の観点から明らかにするための試みとして、GeneChip を用いてB前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病（Prec-B ALL）の発現遺伝子の網羅的解析を行い、他の病型のそれと比較することによって、同 ALL に特徴的に発現すると考えられる遺伝子群をカタログ化した。また、B前駆細胞に特異的に発現する分子 CD179a/b が Prec-B ALL および B 細胞型リンパ芽球性リンパ腫の診断マーカーとして有用であることを明らかにし、いわゆる健康食品に含まれるバイオフィラボノイドが Prec-B ALL 細胞にアポトーシスを誘導することを示した。

A. 研究目的

白血病/リンパ腫は小児腫瘍において最も頻度が高く重要な疾患であるが、近年、その治療予後は飛躍的に向上している。しかし、一部には依然として予後不良な症例が存在しており、また、発症機構の詳細については未だ不明な部分が多い。そのため、このような予後不良症例に対する効果的な治療法開発には、白血病/リンパ腫の特性について、各病型ごとに、分子レベルで明らかにしてゆくことが不可欠と考えられる。そこで本研究では、白血病/リンパ腫の各病型を遺伝子の発現様式の観点から比較解析するとともに、細胞膜表面分子を介する刺激伝達、特にアポトーシス誘導関連に着目し、その特性について明らかにすることを目的とする。本年度は、GeneChip を用いた網羅的解析によって白血病各病型ごとの発現遺伝子カタログを作成し、その比較検討を行って、特にB前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病（Prec-B ALL）の遺伝子発現様式からみた特性の解明を試みた。また、Prec-B ALL および B 細胞型リンパ芽球性リンパ腫（B-LBL）の特異的マーカーとしての CD179a/b の特性について検討し、さらに同 ALL 細胞に対するバイオフィラボノイドのアポトーシス誘導作用について検討した。

B. 研究方法

Prec-B ALL、T-ALL、AML 患児の末梢血あるいは骨髄血から分離した白血病細胞および白血病由来培養細胞株より RNA を抽出し、Affimetrix 社の GeneChip を用いた網羅的発現遺伝子解析を行い、各病型ごとの発現遺伝子の比較解析を行った。また、この結果に基づき、分子発現の差について RT-PCR およびイムノプロットによる解析を行った。

種々の白血病/リンパ腫症例検体および白血病由来培養細胞株における CD179a/b の発現について、組織切片標本については免疫組織化学的検索により、また浮遊細胞については膜透過処理-免疫蛍光染色を用いたフローサイトメトリー（FCM）解析により、それぞれ検討した。

種々の白血病由来細胞株に、Flavone, Fisetin, Quercetin, Luteolin 等のバイオフィラボノイド（BFN）を投与し、その結果誘導されるアポトーシス細胞を以下の方法で検出した。

1) 蛍光標識 Annexin V を反応させ、結合細胞を FCM により検出した。

2) MitoCapture を用いて、ミトコンドリア膜透過性の変化した細胞を FCM により検出した。

3) 核 DNA を抽出してアガロース電気泳