

200400440A

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

難治性小児がんの臨床的特性の分子情報と  
その理論を応用した診断・治療法の開発

(H16・3次がん・009)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 秦 順 一

平成17(2005)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

難治性小児がんの臨床的特性の分子情報と  
その理論を応用した診断・治療法の開発

(H16・3次がん・009)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 秦 順 一

平成17(2005)年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

難治性小児がんの臨床的特性の分子情報とその理論を応用した診断・治療法の開発

秦 順一 . . . . . 1

## II. 分担研究報告

1. 研究総括および小児腫瘍の中央診断・検体保存システム構築

秦 順一 . . . . . 9

2. 白血病再発例の特異性解明と早期予知法の確立

藤本純一郎 . . . . . 11

3. 難治性小児固形腫瘍の臨床特性と新規診断・治療法開発

大喜多 肇 . . . . . 14

4. 小児がん発症における臓器形成関連遺伝子の関与

宮下俊之 . . . . . 16

5. ゲノム刷り込み機構の解明

副島英伸 . . . . . 19

6. キメラ遺伝子に対する分子標的治療法の開発

黒田雅彦 . . . . . 20

7. ゲノム情報からみた小児がんの臨床特性の解明

大平美紀 . . . . . 23

8. 分子情報に基づく小児がん治療研究推進

熊谷昌明 . . . . . 26

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

. . . . . 31

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

. . . . . 37

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
総括研究報告書

難治性小児がんの臨床的特性の分子情報とその理論を応用した診断・治療法の開発

主任研究者 秦 順一 国立成育医療センター研究所 所長

研究要旨：病型特異的な遺伝子変異が小児がんの多くで発見されている。これらの遺伝子情報は正確な診断に応用されつつあるものの、細胞増殖における意義ならびに治療法への応用に関する研究は立ち遅れている。また、特に難治性であるEwing肉腫、横紋筋肉腫、小児腎肉腫などは未だ発生母地が不明であり疾患の本態自体の究明も焦眉の課題である。小児がん、特に年少児に発生する胎児性腫瘍（ウイルス腫瘍、肝芽腫、神経芽腫など）は胎児組織を模倣し、かつ、いわゆる腫瘍・奇形症候群として臓器形成異常を伴うことがある。この事実は、小児がんの発症機序解明には腫瘍細胞そのものの異常解明のみならず、ゲノム刷り込み等のエピジェネティックな修飾や臓器形成関連遺伝子の機能解析を含めたアプローチが必要であることを示している。これらの点を考慮し、本研究ではウイルス腫瘍をはじめとする胎児性腫瘍を合併する腫瘍・奇形症候群（Beckwith-Wiedemann症候群やGorlin症候群等）、Ewing肉腫、横紋筋肉腫、白血病など小児がんの主たる病型および難治性再発例の特徴を含めた病態の特性を表す遺伝子変異の解析、網羅的分子発現プロファイリング、キメラ遺伝子や表面分子を明らかにし、それらを標的とした新規治療モデルを開発する。

本年度網羅的遺伝子発現解析に使用する小児がん検体の調整を開始した。これらはGenechip(Affimetrix社製)解析、約1,100遺伝子からなる独自に開発したcDNAチップ解析に使用した。白血病検体についても同様の解析を実施した。

エピジェネティックな遺伝子修飾については、メチル化酵素を欠損させたマウスES細胞による遺伝子メチル化状態や刷り込み遺伝子発現様式の解析を開始した。

小児がんの研究を推進するためには臨床検体の解析が必須である。そこで、わが国で実施されている小児がん臨床試験と連携し、診断法の標準化による中央診断を実施しつつ検体を保存するシステムの構築を開始した。

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
大喜多肇	国立成育医療センター研究所室長
宮下俊之	国立成育医療センター研究所室長
副島英伸	佐賀大学医学部助手
黒田雅彦	東京医科大学講師
大平美紀	千葉県がんセンター研究員
熊谷昌明	国立成育医療センター医員

にし、分子情報に基づいた新規診断法を開発し、新規診断法ならびに新規治療法を開発する。さらに、これらの研究に応用可能な基盤情報を整備することを目的とする。また、形態学的所見および分子情報に基づいた中央診断システムを確立しつつ、希少疾患である小児がんの検体保存システムの構築を通じて基礎研究、臨床研究を推進することを目的とする。発症機序の解明に役立つ遺伝子異常が各種の難治性小児がんで見られ、正確な診断に応用されつつある。しかしながら、これらの成果は治療法の開発には十分結びついておらず、一部の小児がんは依然として治療成績が不良で予後の改善が得られていないのが現状である。また、治療成績が向上

A. 研究目的

本研究では、遺伝子構造異常、遺伝子修飾様式および各種の分子発現様式の詳細な解析を通じて各種難治性小児がんの臨床的特性を明らか

した腫瘍でも、再発例では根治の困難な病型がある。このような小児がんをめぐる現状を抜本的に克服するためには、従来同一と認識されている腫瘍の中でも生物学的差異に基づいた病型の新たな鑑別法の確立と治療戦略の構築が焦点の課題である。現在、各種の難治性小児がんに対する多施設共同治療研究が進みつつあるが、その基盤となる正確な診断システムの構築も速やかに達成すべき課題である。一方、小児がんでは臓器の形成異常を伴うことも多く、器官形成の破綻として発症するという側面も有する。これらの中には変異遺伝子の機能以外にゲノム刷り込みなどによるエピジェネティックな変化も加わって発症する可能性も示唆されており、臓器形成過程に遡るアプローチも必要である。本研究では以上の点を鑑み、Ewing肉腫など難治性小児肉腫、腫瘍・奇形症候群ならびに再発白血病等を対象として、1) 遺伝子構造異常の詳細解析とそれらの遺伝子を標的とした治療モデルの開発、2) 小児がんの臨床的特性にかかわるエピジェネティックな遺伝子修飾や臓器形成関連遺伝子機能の解析、3) 再発小児がんの生物学的特異性の解明と早期予知法の開発、4) 中央診断システムと検体保存システムの構築による診断法の標準化と臨床研究・基礎研究の推進、を行うことを目的とする。得られる成果によって、小児がんの臨床特性の分子情報に基づいた診断法の標準化および精度の高い臨床研究の推進に役立つ。また、分子基盤に基づいた新たな治療戦略を提案することが可能となり、難治性の小児がんの治療成績向上に貢献できる。これらの成果を通じて、小児死亡原因の第1位である小児がんの予後とQOLを改善し、健全な次世代の育む環境を整備することが可能となる。

## B. 研究方法

本研究では、1) 小児がんにおける遺伝子構造異常の詳細解析と遺伝子標的治療モデルの開発、2) エピジェネティックな遺伝子修飾や臓器形成遺伝子機能の解析、3) 再発小児がんの生物学的特異性の解明と早期予知法の開発、4) 中央診断システムと検体保存システムの構築による診断法の標準化と臨床研究・基礎研究の推

進、を行った。各々の課題における具体的な研究方法の記載は省略する。

(倫理面への配慮)

### 1) 小児がん研究における倫理面への配慮

遺伝的な背景への配慮、未成年者への説明と同意に関する配慮、長期生存を考慮した説明と同意ならびに個人情報の保護のあり方、など課題が多い。基本的には国が定める各種の指針に従うが、上記の課題に関する論議や国民的合意の状況を考慮しながら適切な配慮を行う。

### 2) 倫理申請の状況

国立成育医療センター研究所では「小児血液腫瘍細胞の増殖機構に関する研究」、「PTCH遺伝子に関する疾患の解析」、「日本横紋筋肉腫研究グループにおける検体センター、中央病理診断システムおよび組織バンクの設立」、「日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)における中央診断および検体保存システムの確立」および「東京小児がん研究会(TCCSG)における白血病細胞マーカー中央診断システムおよび検体保存システムの確立」がいずれも承認されている。その他、「ゲノムインプリンティングの制御と疾患発症機構の研究」(副島英伸)が佐賀大学医学部で承認されている。ウイルムス腫瘍の遺伝子発現解析は、現在千葉県がんセンターの倫理審査委員会へ申請中である。

## C. 研究結果

### 1) 小児がんにおける遺伝子構造異常の詳細解析と遺伝子標的治療モデルの開発

Ewing肉腫の90%以上にEWS遺伝子の再構成に伴うキメラmRNAの発現を認めることが判明した。そこで、Ewing肉腫由来細胞株によるキメラmRNAを標的とした分子治療法の開発を目指しsiRNAベクターの構築を開始した。また、粘液型脂肪肉腫で見られるTLS-CHOPキメラ遺伝子を標的としたsiRNAによる細胞株増殖抑制に成功した。ウイルムス腫瘍組織から調整したcDNAを基に約5,000個の遺伝子を含むカスタムメイドcDNAアレイの作製を完了した。

### 2) エピジェネティックな遺伝子修飾や臓器形成関連遺伝子機能の詳細解析

Beckwith-Wiedemann症候群(BWS)では染色体

11p15.5に存在するインプリンティングドメインでのDNAメチル化状態を明らかにした。DMR-LIT1と呼ばれる領域では母由来遺伝子が脱メチル化を受けており、そのことがLIT1遺伝子の機能発現に結びつき、結果的にKIP2等の機能抑制に作用することが判明した。また、同部のDNAメチル化状態はヒストンのメチル化に強く影響を受けていることをマウスES細胞等を用いて明らかにした。Gorlin症候群について遺伝子解析を行ない、14例中11例に責任遺伝子であるPatched (PTCH) 遺伝子の変異を明らかにした。うち2例はmRNAの異常スプライシングによるものであった。PTCH遺伝子のうち選択的に使用される5個のエクソンを明らかにし、その組織発現様式を解析した。

### 3) 再発小児がんの生物学的特異性の解明と早期予知法の開発

小児白血病10例についてGenechip解析を終了した。再発の早期予知に骨髄での微量残存腫瘍(MRD)検出が有用であるが、フローサイトメトリーによるMRD検出はわが国では実績がないためその評価を行うための基礎実験を開始した。

### 4) 中央診断システムと検体保存システムの構築による診断法の標準化と臨床研究・基礎研究の推進

横紋筋肉腫および各種の小児血液腫瘍に対する多施設共同臨床試験における中央病理診断施設ならびに余剰検体保存施設としての活動を開始した。

## D. 考察

1) siRNAによる腫瘍の増殖制御は注目を集めており成果が期待される。また、キメラ分子の標的遺伝子の解析も同時に進めておりsiRNAベクターの標的についても選択枝が広がる可能性もある。小児がんは未熟なものが多くまた発生母地も明確ではなく、特徴解明には網羅的遺伝子発現解析が重要な情報を提供する。今回作成したcDNAアレイによる解析、他の遺伝子チップによる解析と連携させながら病態解明、治療層別化に有用な情報を提供したい。

2) インプリンティングの破綻は悪性腫瘍の発生に関わるのみならず臓器形成異常にも関与す

る点で重要であり、他の方法では達成できないヒト臓器・器官の形成機序解明に重要な情報を提供する。また、成人を含めた癌全般の研究に影響を与える。また、異常スプライシングが形成不全や腫瘍の発生に関わる所見は、新たな疾患発生機序として注目すべきものである。

3) 本研究では小児白血病の治療層別化に役立つ新たな指標、特に早期再発予知が可能な指標を確立することを目的としている。これについて網羅的遺伝子発現解析とフローサイトメトリーのふたつのアプローチを採用しているが順調に進展している。

4) わが国におけるトランスレーショナルリサーチ推進に必須の作業であり、特に正確な診断が下された検体が保存されていることが重要と考える。

## E. 結論

希少疾患である小児腫瘍について中央診断と検体保存システムを構築しつつ研究を推進する体制を整備することが重要であると考えられる。その観点からは種々の重要な進歩が見られた。個々の研究成果は新規性、科学性が高いと考えているが、今後より一層の進展を目指す。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shibata R, Matsufuji H, Morimoto T, Araki A, **Hata J**. Extraovarian primary peritoneal carcinoma in a child. *Pediatr Blood Cancer* 42:292-293, 2004.
- 2) Maeda N, Watanabe M, Okamoto S, Kanai T, Yamada T, **Hata J**, Hozumi N, Katsume A, Nuriya H, Sandhu J, Ushii H, Kohhara M, Hibi T. Hepatitis C virus infection I human liver tissue engrafted in mice with infectious molecular clone. *Liver Int* 4:259-267, 2004.
- 3) Du W, Hattori Y, Hashiguchi A, Kondoh K, Hozumi N, Ikeda Y, Sakamoto M, **Hata J**, Yamada T. Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment. *Pathol Int* 54:285-294, 2004.

- 4) Hino S, Yamaoka T, Yamashita Y, Yamada T, **Hata J**, Itakura M. In vivo proliferation pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependent kinase 4. *Diabetologia* 47: 1819-1830, 2004.
- 5) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, **Okita H**, Matsuo Y, Karasuyama H, **Fujimoto J**. Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma. *Modern Pathol* 17: 423-429, 2004.
- 6) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Katagiri YU, **Okita H**, Nakao H, Takeda T, **Fujimoto J**. Characterization of a Shiga-toxin 1-resistant stock of Vero cells. *Microbiol Immunol* 48: 377-387, 2004.
- 7) Tang W, Kiyokawa N, Eguchi T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Enosawa S, Mimori K, Itagaki M, Taguchi T, Katagiri YU, **Okita H**, Amemiya H, **Fujimoto J**. Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I  $\alpha$  chain. *Hybridoma Hybridom* 23: 187-191, 2004.
- 8) Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, **Okita H**, Okuda K, **Fujimoto J**. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *J Cell Sci* 117: 3911-3922, 2004.
- 9) Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahshi T, Karasuyama H, Matsuo Y, **Okita H**, **Fujimoto J**. Deficiency of BLNK hampers PLC- $\gamma$ 2 phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112: 575-582, 2004.
- 10) Tang W-R, Shioya N, Eguchi T, Ebata T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Takagaki Y, Enosawa S, Itagaki M, Taguchi T, Kiyokawa N, Amemiya H, **Fujimoto J**. Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor  $\delta$ -chains. *Veterinary Immunol Immunopathol* (in press).
- 11) Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, **Okita H**, **Fujimoto J**. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* (in press).
- 12) Miyashita, T. Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins. *Methods Mol. Biol.* 261: 399-410, 2004.
- 13) 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.
- 14) Subramanian, R. R., Zhang, H., Wang, H., Ichijo, H., **Miyashita, T**, and Fu, H. Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. *Exp. Cell Res.* 294: 581-591, 2004.
- 15) U, M., Shen, L., Oshida, T., Miyauchi, J., Yamada, M., and **Miyashita, T**. Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. *Leukemia* 18: 1850-1856, 2004.
- 16) Nagao, K., Toyoda, M., Takeuchi-Inoue, K., Fujii, K., Yamada, M., and **Miyashita, T**. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, Patched, having distinct first exons. *Genomics* in press
- 17) **Soejima H**, Nakagawachi T, Zhao W, Higashimoto K, Urano T, Matsukura S, Kitajima Y, Takeuchi M, Nakayama M, Oshimura M, Miyazaki K, Joh K, Mukai T. Silencing of imprinted CDKN1C gene expression is associated with loss of CpG and histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in esophageal cancer. *Oncogene*, 23(25): 4380-4388, 2004
- 18) **Soejima H**, Joh K, Mukai T. Gene silencing in DNA damage repair. *Cell Mol Life Sci*, 61(17): 2168-2172, 2004
- 19) Satoh A, Toyota M, Ikeda H, Morimoto Y, Akino K, Mita H, Suzuki H, Sasaki Y, Kanaseki T, Takamura Y, **Soejima H**, Urano T, Yanagihara K, Endo T, Hinoda Y, Fujita M, Hosokawa M, Sato N, Tokino T, Imai K. Epigenetic Inactivation of Class II Transactivator (CIITA) is Associated with the Absence of Interferon- $\gamma$ -Induced HLA-DR Expression in Colorectal and Gastric Cancer Cells. *Oncogene*, 23(55): 8876-8886, 2004
- 20) **Kuroda, M**, Oikawa, K, Ohbayashi, T, Yoshida, K, Yamada, K, Mimura, J, Matsuda, Y, Fujii-Kuriyama, Y and Mukai, K: A dioxin

- sensitive gene, mammalian WAPL, is implicated in spermatogenesis. FEBS Lett, 579: 167-172, 2005.
- 21) **Kuroda, M.**, Kiyono, T, Oikawa, K, Yoshida, K and Mukai, K: The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, hWAPL, exhibits potential as a therapeutic target. Br J Cancer, 92: 290-293, 2005.
  - 22) **Kuroda, M.**, Tanabe, H, Yoshida, K, Oikawa, K, Saito, A, Kiyuna, T, Mizusawa, H and Mukai, K: Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. J Cell Sci, 117: 5897-5903, 2004.
  - 23) Oikawa, K, Ohbayashi, T, Kiyono, T, Nishi, H, Isaka, K, Umezawa, A, **Kuroda, M** and Mukai, K: Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. Cancer Res, 64: 3545-3549, 2004.
  - 24) Hattori, H, **Kuroda, M.**, Ishida, T, Shinmura, K, Nagai, S, Mukai, K and Imakiire, A: Human DNA damage checkpoints and their relevance to soft tissue sarcoma. Pathol Int, 54: 26-31, 2004.
  - 25) Shinmura, K, Ishida, T, Goto, T, **Kuroda, M.**, Hattori, H, Nagai, S, Imamura, T, Mukai, K and Imakiire, A: Expression of cyclooxygenase-2 in chondroblastoma: immunohistochemical analysis with special emphasis on local inflammatory reaction. Virchows Arch, 444: 28-35, 2004.
  - 26) **Kuroda, M.**, Oikawa, K, Yoshida, K, Takeuchi, A, Takeuchi, M, Usui, M, Umezawa, A and Mukai, K: Effects of 3-Methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. Cancer Lett, in press, 2004.
  - 27) Oshiro, H, Ebihara, Y, Serizawa, H, Shimizu, T, Teshima, S, **Kuroda, M** and Kudo, M: Idiopathic Retroperitoneal Fibrosis Associated with Immunohematological Abnormalities. Am J Med, in press, 2004.
  - 28) Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, **Ohira M.**, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. Int. J. Cancer 112, 365-75, 2004.
  - 29) Yamada S, **Ohira M.**, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Hirata T, Goto T, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the PLK1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. Oncogene 23, 5901-11, 2004.
  - 30) Hamano S, **Ohira M.**, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas. Int. J. Oncology, 24, 1457-66, 2004.
  - 31) Nakagawara A, **Ohira M.** Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model. Cancer Lett. 204, 213-24, 2004.
  - 32) Abe M, **Ohira M.**, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. Cancer Res. 65, 828-34, 2005.
  - 33) **Ohira M.**, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. Cancer Lett. In press.
  - 34) **秦 順一** : ウイルムス腫瘍総論、細胞 36:262-264,2004
  - 35) **秦 順一** : ウイルムス腫瘍と WT1 遺伝子、細胞 36:269-272,2004
  - 36) **大喜多 肇、秦 順一** : 4. 小児腫瘍、病理と臨床臨時増刊号 22:123-129, 2004
  - 37) **秦 順一** : 神経芽腫新国際分類 INPC について、小児がん 41:11-14,2004
  - 38) **黒田雅彦、及川恒輔、向井 清** : 診断への応用と展望—骨軟部腫瘍—. 病理と臨床、22 (臨増): 100-106, 2004
  - 39) **松林 純、黒田雅彦、向井 清** : キヲ遺伝子と軟部腫瘍の形態形成。「骨・関節・靭帯」17(11): 1261-1267, 2004.
  - 40) **黒田雅彦、吉田恵一、及川恒輔、石田 剛、向井 清** : キヲ遺伝子と形態形成—染色体テトリの関与—. 病理と臨床、Vol. 22 (2), 175-180, 2004.
2. 学会発表
    - 1) **大喜多肇、秦 順一、藤本 純一郎** :

- Ewing/PNET 腫瘍における EWS 関連キメラ遺伝子と標的遺伝子、第 20 回小児がん学会、第 46 回日本小児血液学会、同時期開催、京都、11 月 2004 年
- 2) 清河信敬, 松井 翼, 竹野内寿美, **大喜多肇**, **藤本純一郎**. B 前駆細胞性リンパ芽球性リンパ腫の診断マーカーとしての CD179a/b の有用性. 第 93 回日本病理学会, 札幌, 6 月 9-11 日, 2004.
  - 3) 田口智子, 竹野内寿美, **大喜多肇**, 清河信敬, **藤本純一郎**. B 前駆細胞の分化誘導に対する IGFBP-6 の役割. 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会, 京都, 9 月 17 日, 2004.
  - 4) 塩沢裕介, 清河信敬, 竹野内寿美, 田口智子, 鈴木恭子, 坂口佐知, 斎藤正博, **大喜多肇**, **藤本純一郎**. B 前駆細胞性急性リンパ性白血病細胞に対する Insulin-like growth factor の作用. 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会, 京都, 9 月 17 日, 2004.
  - 5) **藤本純一郎**. 小児がんの中央診断・検体保存システム構築と研究推進基盤 (シンポジウム). 第 63 回日本癌学会学術総会, 福岡, 9 月 29 日-10 月 1 日, 2004.
  - 6) **藤本純一郎**. 小児悪性リンパ腫の病理診断 (モーニングレクチャー). 第 20 回小児がん学会, 第 46 回日本小児血液学会, 同時期開催, 京都, 11 月 21-23 日, 2004.
  - 7) 田口智子, 清河信敬, **藤本純一郎**. ヒト BLNK 陰性 pre-B 細胞株の解析. 第 34 回日本免疫学会総会, 札幌, 12 月 1-3 日, 2004.
  - 8) 長尾和右, 豊田雅士, 井上佳織, 藤井克則, **宮下俊之**, 山田正夫. マウス及びヒト Patched 遺伝子の選択的スプライシングにより生ずるアイソフォームの解析. 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸), 2004 年 12 月, ワークショップ
  - 9) **宮下俊之**, 藤井克則, 豊田雅士, 山田正夫. ヒト、マウス癌抑制遺伝子 Patched アイソフォームの構造・機能解析. 第 63 回日本癌学会総会 (福岡), 2004 年 9-10 月, ワークショップ
  - 10) **副島英伸**, 他. DNA 修復遺伝子 MGMT のエピジェネティックな発現抑制機構. 第 63 回日本癌学会学術総会 2004. 9. 29.-10. 1. 福岡
  - 11) **Soejima H**, et al. Epigenetic regulation of p57KIP2/LIT1 imprinting domain and its implication in human disease. The Fourteenth International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar 2004. 10. 30-31. Hiroshima
  - 12) **Soejima H**, et al. The Essential Role of Histone H3 Lys9 Methylation and MeCP2 Binding in MGMT Silencing with Poor DNA Methylation of the Promoter CpG Island. An American Association for Cancer Research Special Conference, 2004. 11. 10-14. Hawaii, USA
  - 13) **副島英伸**, 他. 刷り込み調節領域のヒストン H3Lys27 メチル化解析. 第 27 回日本分子生物学会年会 2003. 12. 8-11. 神戸
  - 14) **黒田雅彦**: パラフィン包埋検体からのキメラ遺伝子解析法. 日本病理学会病理技術講習会-4、講演、名古屋市、2004 年 12 月.
  - 15) 及川恒輔、高梨正勝、吉田恵一、梅澤明弘、向井 清、**黒田雅彦**: 癌遺伝子 hWAPL の転写活性と mRNA 量に対する環境ホルモンの影響. 第 27 回日本分子生物学会年会、示説、2004 年 12 月.
  - 16) **黒田雅彦**、吉田恵一、田辺秀之、及川恒輔、向井 清: キメラ遺伝子形成における染色体テロメアの関与. 第 63 回日本癌学会総会、シンポジウム、福岡市、2004 年 9 月.
  - 17) 及川恒輔、**黒田雅彦**、吉田恵一、向井 清: 新規遺伝子 hWAPL の発現と子宮頸癌との関連. 第 63 回日本癌学会総会、ワークショップ、福岡市、2004 年 9 月.
  - 18) 吉田恵一、**黒田雅彦**、及川恒輔、向井 清: 脂肪分化における発癌性環境化学物質の影響. 第 63 回日本癌学会総会、福岡市、2004 年 9 月.
  - 19) **黒田雅彦**: DIF-2/h WAPL と環境化学物質-染色体テロメアと減数分裂-. 科学技術振興機構・CREST、「内分泌かく乱物質」第 5 回領域シンポジウム、東京、2004 年 9 月.
  - 20) **黒田雅彦**: siRNA を用いたガン治療への応用. 第 9 回 (東京医科大学) 医科学フォーラム、2004 年 7 月.
  - 21) **黒田雅彦**、及川恒輔、石田 剛、松林 純、吉田恵一、服部宏行、今給黎篤弘、向井 清:

病理切片を用いたキメラ遺伝子産物の検出と軟部腫瘍診断への応用. 第45回日本神経病理学会総会、ワークショップ 3、群馬県前橋市、2004年5月.

- 22) 及川恒輔、黒田雅彦、石田 剛、吉田恵一、向井 清：キメラ遺伝子を標的にしたRNA干渉法による治療法の開発. 第93回日本病理学会総会、ワークショップ、札幌市、2004年6月.
- 23) 吉田恵一、田辺秀之、喜友名朝春、齋藤 彰、水沢 博、黒田雅彦、向井 清：粘液型脂肪肉腫発生における染色体テトリ-の関与. 第93回日本病理学会総会、札幌市、2004年6月.
- 24) 松林 純、黒田雅彦、吉田恵一、及川恒輔、向井 清：マイクロアレイによる乳癌の遺伝子発現解析. 第93回日本病理学会総会、札幌市、2004年6月.
- 25) M. Ohira, S. Oba, Y. Nakamura, E. Isogai, S. Kaneko, T. Hirata, H. Kubo, T. Goto, S. Yamada, Y. Yoshida, S. Ishii, A. Nakagawara Molecular signature to predict the prognosis of neuroblastoma and its application to a diagnostic microarray of clinical use. Advances in Neuroblastoma Research Eleventh Conference, イタリア・ジェノバ, 2004/6/15-18.

26) 大平美紀、大羽成征、中村洋子、磯貝恵理子、金子節子、平田隆洋、久保浩之、山田佐一、吉田安子、石井 信、中川原 章. 神経芽腫の予後に関わる遺伝子発現プロファイルの同定と DNA チップを用いた予後予測システムの開発. 第63回日本癌学会総会、福岡、2004/9/29-10/1.

27) 大平美紀、大羽成征、中村洋子、磯貝恵理子、平田隆洋、久保浩之、金子節子、石井 信、中川原 章. 遺伝子発現解析による新しい神経芽腫予後予測システムの開発. 第20回日本小児がん学会学術総会、京都、2004/11/21-23.

28) 熊谷昌明、他：集中治療室(ICU)と連携した小児がん治療. 日小血会誌 18:382, 2004.

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

## II. 分担研究報告

## 研究総括および小児腫瘍の中央診断・検体保存システム構築

分担研究者 秦 順一 国立成育医療センター研究所 所長

研究要旨：希少疾患である小児腫瘍を正確かつ迅速に診断し、かつ、トランスレーショナルリサーチ推進に向けた余剰検体の利用を図るための検体保存について体制作りを目標とした。これらの目標を達成するには、わが国で実施される小児主要に対する臨床試験と連携すること、診断ならびに検体保存を可能な限り中央化すること、が重要と考えられる。すでに進行中の横紋筋肉腫、悪性リンパ腫ならびに白血病に関する臨床試験実施グループと連携して中央診断システムおよび検体保存システムを構築した。なお、これらの活動を行うにあたっては十分な倫理的配慮が必要である。そこで、分担研究者らが所属する施設での倫理審査を経て活動を実施した。

### A. 研究目的

希少疾患である小児腫瘍の治療成績向上を目的とし、診断の中央化ならびに余剰検体の保存を行うことを具体的な目標とした。

### B. 研究方法

小児腫瘍の中央診断システムについては、特に病理診断に力点を置いた。すなわち、各病型について複数の小児腫瘍を専門とする病理医により構成される診断委員会を作成した。

病理学的診断以外に遺伝子診断の中央化も目指した。これには分担研究者の大喜多らが担当した。

小児白血病については、分担研究者の藤本ならびに国立成育医療センター研究所発生・分化研究部の清河信敬部長らによる中央診断システムを構築した。

（倫理面への配慮）

本研究ではヒト検体を扱うため、倫理面では特に配慮を行った。ヒト検体の本研究への使用にあたっては、患者あるいは家族に内容の説明を行い、同意を得た。これらの説明ならびに同意取得手続きならびに研究内容については、分担研究者らが所属する国立成育医療センターの倫理委員会に申請し承認を得た。

### C. 研究結果

横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、悪性リンパ腫に対する病理中央診断システムを構築した。病型により診断医の氏名および人数等が異なるが、複数病理医によるコンセンサス診断を行う点では共通のシステムである。これらの病型の中央診断体制については、日本横紋筋肉腫研究グループ、日本ユーイング肉腫研究グループ、日本小児白血病リンパ腫研究グループと連携を取りながら確立を進めた。なお、上記研究グループが実施する臨床試験は厚生労働科学研究費補助金等の支援を受けている。

横紋筋肉腫についてはPAX3-FKHRあるいはPAX7-FKHRキメラ遺伝子検出を、ユーイング肉腫についてはEWSが関連する5つのキメラ遺伝子（EWS/FLI1, EWS/ERG, EWS/ETV1, EWS/E1AF, EWS/FEV）検出を同時に行い、遺伝子診断を参照しながら確定診断を下す体制とした。

白血病については、東京小児がん研究会と連携し、急性リンパ性白血病についての細胞マーカー中央診断体制を確立した。

検体保存については、診断確定後の余剰検体を保存することを方針と位置づけた。国立成育医療センター研究所を上記研究グループにおける検体保存施設として位置付け活動を開始した。

これらの活動については、「日本横紋筋肉腫研究グループにおける検体センター、中央病理診断システムおよび組織バンクの設立」（申請

者：秦 順一）、「日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)における中央診断および検体保存システムの確立」(申請者：藤本純一郎)および「東京小児がん研究会(TCCSG)における白血病細胞マーカー中央診断システムおよび検体保存システムの確立」(申請者：藤本純一郎)として国立成育医療センターの倫理委員会に申請し承認を受けた。

#### D. 考察

小児腫瘍は希少疾患であり、成人の腫瘍とは種類、部位、組織像がまったく異なる。従って、正確な診断を行うためには各病型に精通した病理医の関与が必須である。また、適合患者のみが登録・治療されるといった適合性の担保には複数の専門病理医によるコンセンサス診断が必要である。これらを満たす診断システムとして病理中央診断システムを確立した。このシステムは臨床試験を実施するうえで必須であるが、わが国の大多数の小児腫瘍患者が最も正確な診断を受けることができるという、患者側のメリットも大きい。

上記の診断システムは腫瘍形成性腫瘍に対するものであるが、小児腫瘍の中では白血病の数が多いため、すなわち、白血病に対しても診断法の標準化に基づく中央診断が必要である。今回、関東のALL症例を中心に一箇所で診断を行う体制を確立することができた意義は大きい。

中央診断が確定した後の検体は余剰検体と呼ばれ、一定期間保管したのちに廃棄されるのが通常である。本研究ではこれらの余剰検体の保存を継続し、小児腫瘍の研究に供給するための保存システムを同時に構築した。数は少ないものの着実に保存検体数は増加しつつある。

中央診断ならびに検体保存の作業を効率的に実施するにはわが国で展開されつつある臨床試験と連携することが重要である。本研究は、すでに実施されている臨床試験と連携したが、今後計画されている臨床試験とも連携させながら規模の拡大を図る予定である。

#### E. 結論

各種の小児腫瘍に対する病理中央診断システムを構築した。また、診断システムと連動する

余剰検体保存システムを国立成育医療センター研究所内に構築した。これらはわが国で展開されつつある小児腫瘍に対する臨床試験を支援するものであり、またトランスレーショナルリサーチを推進する役割を果たすことになる。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shibata R, Matsufuji H, Morimoto T, Araki A, Hata J. Extraovarian primary peritoneal carcinoma in a child. *Pediatr Blood Cancer* 42:292-293, 2004.
- 2) Maeda N, Watanabe M, Okamoto S, Kanai T, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Katsume A, Nuriya H, Sandhu J, Ushii H, Kohhara M, Hibi T. Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with infectious molecular clone. *Liver Int* 4:259-267, 2004.
- 3) Du W, Hattori Y, Hashiguchi A, Kondoh K, Hozumi N, Ikeda Y, Sakamoto M, Hata J, Yamada T. Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment. *Pathol Int* 54:285-294, 2004.
- 4) Hino S, Yamaoka T, Yamashita Y, Yamada T, Hata J, Itakura M. In vivo proliferation of pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependent kinase 4. *Diabetologia* 47: 1819-1830, 2004.
- 5) 秦 順一：ウイルス腫瘍総論、細胞36:262-264, 2004.
- 6) 秦 順一：ウイルス腫瘍とWT1遺伝子、細胞36:269-272, 2004.
- 7) 大喜多 肇、秦 順一：4. 小児腫瘍、病理と臨床臨時増刊号22:123-129, 2004.
- 8) 秦 順一：神経芽腫新国際分類INPCについて、小児がん41:11-14, 2004.

##### 2. 学会発表

無し

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

無し

##### 2. 実用新案登録

無し

##### 3. その他

無し

## 白血病再発例の特異性解明と早期予知法の確立

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：小児急性リンパ芽球性白血病(ALL)再発例の特徴を網羅的遺伝子発現解析で検討するための検査システム構築に着手した。これに関連し、過去に保存された8例の白血病検体からRNAを抽出し、その品質をチェックするとともに、ジーンチップ解析を行い、これらの検体が網羅的分子発現解析に使用し得ることを確認した。また、フローサイトメトリーを用いた微小残存白血病細胞検出の、早期再発に対する予測因子としての有用性の検討を開始した。1レーザー4カラーのフローサイトメトリーを用いてALL微小残存白血病を検出するのに適した抗体パネルを決定し、これを用いて共同研究施設から送られてきた白血病の初発時および寛解導入療法後の骨髄、末梢血検体について解析を開始した。

### 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。近年、その治療予後は飛躍的に向上しているが、一部には依然として早期再発をきたす予後不良な症例が存在している。そのため、このような早期再発例に対して、その生物学的特異性を明らかにし、その早期予知法を確立することは、今後白血病/リンパ腫の治療予後の一層の向上を目指す上で非常に重要である。そこで本研究では、最も代表的小児急性リンパ芽球性白血病(ALL)を対象として、グループ治療研究の中でGeneChipを用いた網羅的遺伝子発現解析を系統的に行い、その結果をデータベース化するとともに、治療反応性や予後等の臨床情報とリンクさせて総合的に解析することによりALL早期再発例の生物学的特異性を明らかにするとともに早期予知法を確立することを目標とする。また、最近、早期再発の予知因子として国際的に着目されている微小残存白血病細胞(MRD)について、フローサイトメトリーを用いた検出法について検討し、この方法の本邦におけるグループ治療研究の中での有用性について評価を試みる。

### B. 研究方法

過去に液体窒素中に凍結保存したPrec-B ALL、

T-ALL、AML患児計8例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を抽出した。このRNAよりcDNAを合成し、種々の遺伝子に対するRT-PCRを行った。また、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。

白血病細胞株、共同研究実施施設より提供された白血病患児の初発時および寛解導入療法施行後の骨髄、末梢血検体に対して、FITC、PE、PC5、PC7の4種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体を用いた蛍光染色を行い、1レーザー4カラーのフローサイトメトリーを用いて白血病細胞を正常の骨髄細胞から区別するための至適な抗体の組み合わせについて検討した。

### C. 研究結果

1. GeneChipを用いたALLの遺伝子発現解析:小児腫瘍は症例数が少ないため、体系的な研究はグループ治療研究として推進して行くことが不可欠である。そこで、本研究では、東京都小児腫瘍治療研究グループと連携し、同グループのALL治療研究第16次案における登録症例全例の表面マーカー解析、検体保存、ならびにGeneChipによる発現遺伝子解析を施行し、その結果をデータベース化する方向で調整中であり、倫理審

査を含めて実施に向けた手続きの調整を開始した。

また、実施に向けて、保存検体が以上の検討に適しているか否か検討する目的で、過去に凍結しておいたB-precursor ALL、T-ALL、AMLの保存細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成してRT-PCRを行った。この結果、 $\beta$ -アクチン、GAPDH等のhouse keeping 遺伝子および各細胞系統特異的遺伝子双方とも増幅可能であった。さらに、このRNAを用いてGeneChip解析を行い、各病型特異的な遺伝子の発現について解析を行ったところ、十分使用に耐えうることが示唆された。

2. 早期再発予知因子としてのフローサイトメトリーによるMRD検出:白血病患者と健康人ボランティアの末梢血を用いた予備実験を行い、残存白血病患者検出に適した抗体の組み合わせとして、CD58/CD10/CD19/CD34, CD58/CD10/CD19/CD45, 等を選定した。この実験条件を用いてALL症例の初発時、および緩解導入療法施行後、ならびに結果的に非白血病と診断された他の血液疾患患者の骨髄検体に対して1レーザー4カラーのフローサイトメトリー解析を行った結果、0.01%の検出限界でMRDの検出が可能であることが示唆された。

#### D. 考察

1. GeneChipを用いたALLの遺伝子発現解析: GeneChipを用いた網羅的遺伝子発現解析が、特定白血病/リンパ腫の特異的発現遺伝子のスクリーニング方法として有用であることが確認された。現在、グループ治療研究と連携して系統的な解析を行い、その結果をデータベース化する方向で実施に向けた諸問題の調整を行っている。将来的に、このデータベースを治療反応性や予後を含む臨床データおよびマルチプレックスPCRや染色体検査による遺伝子異常等に関する情報と組み合わせで解析していくことによって、早期再発例の層別化に有用な遺伝子発現パターンあるいはマーカー分子が明らかになって行くことが期待される。

2. 早期再発予知因子としてのフローサイトメトリーによるMRD検出:最近、緩解導入療法後のMRDの残存率が、単独でもっとも信頼性の高い予

後判定因子である可能性が明らかになり、その最も簡便迅速な方法としてのフローサイトメトリーによるマルチカラー解析の有用性が、欧米のいくつかのグループから報告されている。そこで、本研究では、本邦におけるグループ治療研究の特殊性を考慮した上でこの方法が適応可能か否かを検討することを目的としている。本邦のグループ治療研究では、多くの場合検体が採取後24時間程度かかって検査施設に送付されてくることによる細胞のviabilityが最も大きな問題であると考えられる。しかしこれまでの検討では、この点に考慮しても、フローサイトメトリーにより $10E^{-4}$ オーダーでのMRD検出が可能と考えられた。今後、さらに症例数を増やすとともに、治療反応性や予後に関するデータとリンクさせた検討を行い、その早期再発予知因子としての有用性について検討して行く。

#### E. 結論

GeneChipを用いた網羅的遺伝子発現解析が、白血病/リンパ腫の早期再発に関する特異性解明に非常に有用な手段となり得ることが示された。また、フローサイトメトリーによるMRD検出の有用性について明らかにし、今後その早期再発予知因子としての有用性について検討を行って行く。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J. Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma. *Modern Pathol* 17: 423-429, 2004.

2) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Katagiri YU, Okita H, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Characterization of a Shiga-toxin

1-resistant stock of Vero cells. *Microbiol Immunol* 48: 377-387, 2004.

3) Tang W, Kiyokawa N, Eguchi T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Enosawa S, Mimori K, Itagaki M, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Amemiya H, Fujimoto J. Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I  $\alpha$  chain. *Hybridoma Hybridom* 23: 187-191, 2004.

4) Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *J Cell Sci* 117: 3911-3922, 2004.

5) Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahashi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK hampers PLC- $\gamma$ 2 phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112: 575-582, 2004.

6) Tang W-R, Shioya N, Eguchi T, Ebata T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Takagaki Y, Enosawa S, Itagaki M, Taguchi T, Kiyokawa N, Amemiya H, Fujimoto J. Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor  $\delta$ -chains. *Veterinary Immunol Immunopathol* (in press).

7) Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J. Dietary bioflavonoids

induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* (in press).

## 2. 学会発表

- 1) 清河信敬, 松井 翼, 竹野内寿美, 大喜多肇, 藤本純一郎. B前駆細胞性リンパ芽球性リンパ腫の診断マーカーとしてのCD179a/bの有用性. 第93回日本病理学会, 札幌, 6月9-11日, 2004.
- 2) 田口智子, 竹野内寿美, 大喜多肇, 清河信敬, 藤本純一郎. B前駆細胞の分化誘導に対するIGFBP-6の役割. 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会, 京都, 9月17日, 2004.
- 3) 塩沢裕介, 清河信敬, 竹野内寿美, 田口智子, 鈴木恭子, 坂口佐知, 斎藤正博, 大喜多肇, 藤本純一郎. B前駆細胞性急性リンパ性白血病細胞に対するInsulin-like growth factor の作用. 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会, 京都, 9月17日, 2004.
- 4) 藤本純一郎. 小児がんの中央診断・検体保存システム構築と研究推進基盤(シンポジウム). 第63回日本癌学会学術総会, 福岡, 9月29日-10月1日, 2004.
- 5) 藤本純一郎. 小児悪性リンパ腫の病理診断(モーニングレクチャー). 第20回小児がん学会, 第46回日本小児血液学会, 同時期開催, 京都, 11月21-23日, 2004.
- 6) 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎. ヒトBLNK陰性pre-B細胞株の解析. 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 12月1-3日, 2004.

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)  
分担研究報告書

難治性小児固形腫瘍の臨床特性と新規診断・治療法開発

分担研究者 大喜多 肇 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 機能分化研究室長

研究要旨: 代表的な小児固形腫瘍である Ewing 肉腫の生物学的特性を解明するために、同腫瘍に特異的な遺伝子異常である EWS-ETS キメラ遺伝子に対する RNAi を用い、腫瘍発生機序の解析に着手した。さらに、Ewing 肉腫細胞に発現する表面分子を各種抗体とフローサイトメトリーを用いて網羅的に解析した。その結果、成長因子受容体を含む複数の分子が Ewing 肉腫細胞において発現していることが明らかとなった。これらの表面分子の細胞の増殖、死に対する機能を解析することにより、新たな治療法が開発されることが期待される。

A. 研究目的

Ewing 肉腫は、小児期～若年成人期に好発する骨軟部の悪性腫瘍である。近年、化学療法をはじめとする治療法の進歩により治療成績は向上しつつあるものの、治癒率は50%程度でありいまだに難治性の腫瘍である。本腫瘍の90%以上では、EWS 遺伝子と ETS ファミリーの転写因子が染色体転座によって融合し、キメラ遺伝子が形成されている。このキメラ遺伝子は、本腫瘍に極めて特異性が高く、確定診断をつける上で重要であり、かつ、腫瘍発生にも重要な役割を演じている。このキメラ遺伝子の機能を明らかにすることが、Ewing 肉腫の発生機序の解明に役立つばかりでなく、新たな治療法の開発の基盤情報を提供するものとなる。また、同腫瘍で細胞表面分子を含む網羅的分子発現プロファイリングを明らかにすることによって、細胞表面分子とそれらからのシグナル伝達を標的とした新たな治療戦略を開発することを目的とする。

B. 研究方法

Ewing 肉腫におけるキメラ遺伝子の機能を詳細にするために、Ewing 肉腫細胞における tetracycline repressor(tetR)を用いた誘導発現系作製に着手した。Ewing 肉腫細胞への tetR ベクターの導入、クローンの選別、siRNA 発現ベクター作製を行った。各種の細胞表面分子に対する抗体を用い、フローサイトメーターを用いて Ewing 肉腫細胞の表面分子マーカーの網羅的解析を行っ

た。現在までのところ、確立された腫瘍細胞を用いた研究のみのため倫理面への配慮は不要であるが、今後、ヒト検体を利用した解析を行うために、患者あるいは代諾者への同意取得、個人情報の保護に配慮して倫理委員会へ、申請する。

C. 研究結果

Ewing 肉腫細胞に tetR vector を導入し安定発現細胞株を得た。同株に tetracycline 存在下に EGFP を発現するベクターを導入したところ、tetracycline 存在下のみで、EGFP が発現した。また、Ewing 肉腫特異的キメラ遺伝子に対する siRNA 発現ベクターを3種類作製した。

Ewing 肉腫細胞4種に対して表面分子解析を行ったところ、CD56, CD65, CD99, CD117, TGF $\beta$  type II receptor が Ewing 肉腫細胞で高発現であることが判明した。

D. 考察

Ewing 肉腫細胞において tetR を用いた誘導発現系が充分、機能しうることが示された。すなわち腫瘍の発症原因となるキメラ遺伝子に対する siRNA を導入すると細胞の増殖が停止する、あるいは細胞死が生じる等、細胞の機能を解析する上で大きな障害が生じうる。tetR を用いた誘導発現系を用いることにより、このような障害を回避し、細胞におけるキメラ遺伝子の機能を解析することが可能となる。

CD99 は、Ewing 肉腫に比較的特異性が

高いとされ、抗体療法の標的となりうると考えられた。CD117(c-kit)は、受容体型のチロシンキナーゼであり、その ligand による刺激を受けて、細胞の増殖にかかわるとされている。チロシンキナーゼ阻害剤である imatinib が c-kit によるシグナルを抑制するとされており、既に CML や GIST で有効なことが示されている。Ewing 肉腫においても imatinib を利用した治療が有効な可能性があると考えられた。TGF $\beta$  の tyrosine receptor に関しては、Ewing 肉腫では低発現であるという報告もあり、更なる検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

tetR を利用した誘導発現系が Ewing 肉腫細胞におけるキメラ遺伝子機能解析において有用な手段となりうることが示された。

また、Ewing 肉腫細胞における表面分子の網羅的発現解析によりいくつかの分子が Ewing 肉腫細胞において高発現であることが明らかとなった。これらの中には、増殖因子の受容体が含まれており、それらを標的とした治療法の開発が可能と考えられる。今後、上記増殖因子の受容体やその他の分子に対して、Ewing 肉腫細胞の細胞増殖、細胞分化、細胞死に関する機能を解明していく必要がある。

#### F. 健康危険情報 該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J. Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma. *Modern Pathol* 17: 423-429, 2004.
- 2) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Katagiri YU, Okita H, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Characterization of a Shiga-toxin 1-resistant stock of Vero cells. *Microbiol Immunol* 48: 377-387, 2004.
- 3) Tang W, Kiyokawa N, Eguchi T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Enosawa S, Mimori K, Itagaki M, Taguchi T, Katagiri YU,

Okita H, Amemiya H, Fujimoto J. Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I  $\alpha$  chain. *Hybridoma Hybridom* 23: 187-191, 2004.

4) Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *J Cell Sci* 117: 3911-3922, 2004.

5) Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahashi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK hampers PLC- $\gamma$  2 phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112: 575-582, 2004.

6) Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* (in press).

#### 2. 学会発表

- 1) 大喜多 肇、秦 順一、藤本 純一郎：Ewing/PNET 腫瘍における EWS 関連キメラ遺伝子と標的遺伝子、第 20 回小児がん学会、第 46 回日本小児血液学会、同時期開催、京都、11 月 2004 年
- 2) 清河信敬、松井 翼、竹野内寿美、大喜多肇、藤本純一郎。B 前駆細胞性リンパ芽球性リンパ腫の診断マーカーとしての CD179a/b の有用性。第 93 回日本病理学会、札幌、6 月 9-11 日、2004。
- 3) 田口智子、竹野内寿美、大喜多肇、清河信敬、藤本純一郎。B 前駆細胞の分化誘導に対する IGFBP-6 の役割。第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会、京都、9 月 17 日、2004。
- 4) 塩沢裕介、清河信敬、竹野内寿美、田口智子、鈴木恭子、坂口佐知、斎藤正博、大喜多肇、藤本純一郎。B 前駆細胞性急性リンパ性白血病細胞に対する Insulin-like growth factor の作用。第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会、京都、9 月 17 日、2004。

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

無し

##### 2. 実用新案登録

無し

##### 3. その他

## 小児がん発症における臓器形成関連遺伝子の関与

分担研究者 宮下 俊之 国立成育医療センター研究所・成育遺伝研究部・室長

### 研究要旨

*PTCH* 遺伝子の変異は母斑基底細胞癌症候群 (NBCCS) (常染色体優性遺伝をする神経皮膚症候群、高発癌性遺伝疾患でもある) や一部の遺伝性全前脳症 (大脳の左右の半球への分裂不全) の原因となる。また基底細胞癌、髄芽細胞腫などで LOH がみられること等から癌抑制遺伝子としてもはたらいっていると考えられる。我々は NBCCS 16 例の遺伝子解析を行った。新たな *PTCH* 遺伝子変異を報告するとともに、遺伝子診断の感度を従来より格段と高めることができた。本研究は NBCCS 患者の診断および経過観察に大きく貢献するものである。更にヒトおよびマウスの *PTCH* 遺伝子できわめて複雑な選択的スプライシングが起こっていることを明らかにし、その結果生じる蛋白質のアイソフォームの発現機能解析を行い、*PTCH* が発生と癌抑制において複雑な役割を果たす分子機序に迫ることができた。

### A. 研究目的

NBCCS は常染色体優性遺伝を呈する小奇形を伴う神経皮膚症候群である。それと同時に基底細胞癌、髄芽腫等を多発する高発癌性遺伝疾患でもある。ショウジョウバエの体節形成時に作用する遺伝子 *ptc* のヒトホモログ *PTCH* がこの疾患の責任遺伝子として同定されている。しかしながら日本人を含む東洋人の NBCCS で精力的に遺伝子解析をした報告はまだないため、*PTCH* の遺伝子解析を行うと共に、いくつか存在することが予想されている *PTCH* のアイソフォームの解析を行った。本研究は NBCCS 患者の正確な診断と、よりの確な経過観察に貢献すると共に、*PTCH* が関与するシグナル伝達の亢進によって発症するきわめて広範な癌の発症機構の解明にもつながると考えられる。

### B. 研究方法

遺伝子診断は患者由来高分子 DNA を用いて各エクソン毎に PCR を行い、その産物の塩基配列を直接解析した。一部の症例においては患者由来 RNA を用いて RT-PCR を行い、異常スプライシングの有無を解析した。

アイソフォームの検出を目的に、5'-RACE を行って mRNA の 5' 端を解析し、選択的に使われる新たな第一エクソンを解析した。その結果明らかとなった 5 個のアイソフォームを特異的に増幅するようなプライマーを設計し、定量的 RT-PCR を行い、ヒト各臓器別の発現プロ

フィールを解析した。米国から供与された *PTCH* 発現ベクターを元に 3 種類の蛋白質アイソフォームの発現ベクターを作成した。いくつかの細胞株にこれら *PTCH* の発現ベクターを導入し、Shh-*PTCH* の活性化の指標となる Gli 蛋白質結合配列をもつルシフェラーゼベクターを用いてレポータージーンアッセイを行うことで *PTCH* の機能解析を行った。

また *PTCH* 遺伝子の上流領域をルシフェラーゼベクターに挿入し、ルシフェラーゼ活性が Gli 蛋白質の発現によって誘導されるかを解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は成育医療センター倫理委員会の承認を得た上 (課題名: *PTCH* 遺伝子に関する疾患の解析、平成 14 年年 11 月 19 日承認)、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して行われた。

### C. 研究結果

NBCCS の遺伝子解析の結果を表 1 に示した。12/16 例で *PTCH* 遺伝子に変異が認められた。変異が認められた 12 例中 10 例がフレームシフトやスプライシングの異常によって短い蛋白質が生ずる変異であった。遺伝子変異の Hot Spot は認められなかった。アイソフォームの解析によりヒトとマウス *PTCH* 遺伝子で異なるエクソン 1 を用いる 7 種類の mRNA アイソフォームと、それらによってコードされる 3 種類の蛋白質アイソフォーム ( $PTCH_L$ ,  $PTCH_M$ ,