

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

(H17・3次がん・009)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 秦 順 一

平成18(2006)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	- - - - 1
	秦 順一	
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	- - - - 11
	秦 順一	
	2. 白血病再発例の特異性解明と早期予知法の確立	- - - - 14
	藤本純一郎	
	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	- - - - 18
	大喜多 肇	
	4. 小児がん発症における臓器形成関連遺伝子の関与	- - - - 21
	宮下俊之	
	5. ゲノム刷り込み機構の解明	- - - - 24
	副島英伸	
	6. キメラ遺伝子に対する分子標的治療法の開発	- - - - 27
	黒田雅彦	
	7. ゲノム情報からみた小児がんの臨床特性の解明	- - - - 30
	大平美紀	
	8. 難治性小児がんの特定とその治癒率向上に有用な臨床および生物学的情報の検討	- - - - 33
	熊谷昌明	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	- - - - 43
IV.	研究成果の刊行物・別刷	- - - - 49

# 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

主任研究者 秦 順一 国立成育医療センター 総長

研究要旨：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。

Beckwith-Wiedemann症候群におけるエピジェネティックな遺伝子修飾や遺伝子変異についてわが国最大の症例数での解析が進み種類や頻度が明らかになったが、欧米での報告との差異も明らかになった。Gorlin症候群の遺伝子変異同定を引き続き行ったが、本症候群で特徴的に生じるスプライス異常を網羅的に同定するDNAチップを開発した。

小児ALLの層別化指標として骨髄MRDのフローサイトメトリー検出のシステム構築を開始し、精度0.01%を達成した。小児がんの特化したDNAチップは開発が終了し、一部小児がんの中間危険群同定に役立つ可能性が示された。

小児腫瘍で生じるキメラ遺伝子を標的とした増殖制御法のモデル開発を継続したが、細胞株で有効であってもヒト腫瘍異種移植系では効果が見られないなどの問題点も浮かび上がった。現在、細胞の刺激伝達回路でキメラ遺伝子の下流に位置する遺伝子を網羅的に解析し、治療標的遺伝子を絞り込みつつある。なお、細胞起源が未知のEwing肉腫について発現遺伝子の特徴に関する検討を開始した。

小児がん研究推進に必須の中央診断と検体保存が本格化した。わが国で実施されている主な臨床研究と連携して作業が進められている。特に、小児ALLでは年間約150例のペースで細胞マーカー診断と検体保存が達成できている。

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長

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

### 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

略の構築が焦眉の課題である。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。ウィルムス腫瘍の遺伝子発現解析は、千葉県がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。

## 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遺伝子再構成関連キメラmRNA発現を認めることをすでに報告したが、そのキメラmRNAを標的とした増殖抑制法の開発研究は今年度も継続した。また、今年度は、Ewing肉腫細胞の遺伝子発現プロファイル解析を実施し、他の小児がんと比較して発現の高低がある遺伝子を整理した。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細胞株で成功したものの、異種移植腫瘍系では効果がなかった。そこで、現在、TLS-CHOPの下流に位置する分子の探索を行っている。腎芽腫、肝芽腫および神経芽腫から調整したcDNAを基に小児がんDNAチップを完成した。従来の方法では検出できなかった新たな層別化指標を多数例の小児がん検体を使用して実施できる基盤となる。

### 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) を43例、孤発性Wilms腫瘍37例について、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遺伝子変異の有無ならびにエピジェネティックな調節 (DNAメチル化) の有無を解析したところ、Wilms腫瘍の90%で同領域に何らかの異常を認めた。従って、同領域が腫瘍発生に重要であることが明らかとなった。また、BWSの発症原因に関して欧米例と比較した結果、発症に関与するジェネティック、エピジェネティックな異常の起こりやすさに人種差があることが示唆された。Gorlin症候群については遺伝子診断を継続し18例中14例にPatched (PTCH) 遺伝子変異を見つけた。また、本症候群ではPTCH遺伝子の複雑な選択的スプライシングが生じることを明らかにしたが、本年度はそれらを効率よく検出できるマイクロアレイを開発した。

#### 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

再発の早期予知に応用可能なフローサイトメトリーによる骨髄微量残存腫瘍 (MRD) 検出法の開発を進めている。4カラー解析により10,000分の1の感度で検出できるシステムを構築することができた。この方法を10例のALL症例に対して経時的に実施したところ、治療開始2週では4例でMRD陽性だったのに対し、4週以降では全例でMRDが陰性化していることが判明した。

#### 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、ユーイング肉腫、悪性リンパ腫ならびに白血病に対する多施設共同臨床試験における中央病理診断ならびに余剰検体保存を集中化させひとつの施設での実施体制を目指している。すでに200を超える小児がん症例の中央診断と検体保存を国立成育医療センターで実現しており、日々、症例数は伸びている。

#### D. 考察

1) siRNAによる腫瘍の増殖制御は注目を集めているものの、効果が限定される等の制限もある。粘液型脂肪肉腫におけるTLS-CHOPキメラ遺伝子

を標的としてsiRNAによる腫瘍の増殖制御を試み細胞株での効果は証明したが、異種移植系では効果が明らかではなかった。そこで、TLS-CHOP遺伝子シグナル伝達系の下流に位置する分子群を網羅的に探索し標的候補分子同定を目指している。いくつかの候補分子が上がっており来年度はその機能の詳細解析を開始できる状態となった。また、難治性のEwing肉腫については、その特徴を遺伝子の網羅的発現解析を通じて他の小児がんと比較する検討に入り、いくつかの候補遺伝子を絞り込みつつある。

2) 小児がんの治療層別化に有用な情報提供として本年度はテーラーメイドDNAチップの完成とその応用開始、精度0.01%のMRD検出法の確立が達成できた。今後はこの方法を多数例に応用し、臨床研究に組み込むことができるか否かの検証が必要となる。

3) 腫瘍・奇形症候群では、遺伝子変異やエピジェネティックな遺伝子修飾ならびに選択的スプライシングについて、わが国の最大規模の解析が進んだ。今後、明らかになった変異や調節異常が病態形成にどのように関与するのかを解明することが重要である。

4) 中央診断と保存検体は十分に機能することが明らかになった。今後は、トランスレーショナルリサーチ推進に必須の凍結検体の保存件数を増加させることが重要である。

#### 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ていたが、その観点からは多大な進歩が見られた。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) Moritani, M, Yamasaki, S, Kamagi, M, Suzuki, T, Yamaoka, T, Sano, T, Hata, J,

- Itakura, M. Hypoplasia of endocrine and exocrine pancreas in homozygous transgenic TGF- $\beta$ 1. *Molec Cellular Endocrinol* 229:175-184, 2005.
- 2) Mori, T, Kiyono, T, Imabayashi, H, Takeda, Y, Tsuchiya, K, Miyoshi, S, Makino, H, Matumoto, K, Saito, H, Ogawa, S, Sakamoto, M, Hata, J, Umezawa, A. Combination of hTERT and Bmi-1, E6 or E7 induce prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol* 25(12):5183-95, 2005.
- 3) Ukiyama, E, Endo, M, Tezuka, T, Kudo, K, Sato, S, Akatsuka, S, Hata, J. Recurrent yolk sac tumor following resection of a neonatal immature gastric teratoma. *Pediatr Surg Int* 21(7):585-8, 2005.
- 4) Shiozawa, Y, Kiyokawa, N, Saito, M, Fujimoto, J, Hata, J, Yamashiro, Y. Granulocytic sarcoma of the spine in a child without bone marrow involvement: a case report and literature review. *Eur J Pediatr* 164:616-620, 2005.
- 5) 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 d-chains. *Veterinary Immunol Immunopathol* 103:113-127, 2005.
- 6) Nakajima H, Cocquerel L, Kiyokawa N, Fujimoto J, Levy S. Kinetics of HCV envelope proteins' interaction with CD81 large extracellular loop. *Biochem Biophys Res Commun.* 328(4):1091-1100, 2005.
- 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* 29(5):573-81, 2005.
- 8) Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J. Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2. *Biochem Biophys Res Commun.* 332(4):1004-11, 2005.
- 9) Yamamoto R, Isobe T, Eguchi T, Tang WR, Kiyokawa N, Amemiya H, Fujimoto J, Sato E, Takagaki Y, Yasue H. Porcine TCR CD3zeta-chain and eta-chain. *Mol Immunol.* 42(12):1485-93, 2005.
- 10) Shiozawa Y, Kiyokawa N, Fujimura J, Suzuki K, Yarita Y, Fujimoto J, Saito M, Yamashiro Y. Primary Malignant Lymphoma of the Central Nervous System in an Immunocompetent Child: A Case Report. *J Pediatr Hematol Oncol.* 27:561-564, 2005.
- 11) Miwa S, Misumi Y, Yoshimura S, Nakamura N, Fusano T, Sakisaka S, Ogata S, Fujimoto J, Kiyokawa N, Ikehara Y. Depletion of vesicle-tethering factor p115 causes mini-stacked Golgi fragments with delayed protein transport. *B. B. R. C.*, 338(2):1268-74, 2005.
- 12) Ishii R, Morimoto A, Ikushima S, Sugimoto T, Asami K, Bessho F, Kudo K, Tsunematu Y, Fujimoto J, Imashuku S. High serum values of soluble CD154, IL-2 receptor, RANKL and osteoprotegerin in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2005 Dec 15; [Epub ahead of print]
- 13) Kiuchi S, Yamada T, Kiyokawa N, Saito T, Fujimoto J, H Yasue. Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues. *Cytogenetic and Genome Research*, in press.
- 13) Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Itagaki M, Shiozawa Y, Suzuki K, Sakaguchi S, Katagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Involvement of Insulin-like Growth Factor-I and Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Pro-B-cell Development. *Exp Hematol*, in press.
- 14) MHorinaga, H Okita, J Nakashima, K Kanao, M Sakamoto, M Murai. Clinical and pathologic significance of activation of

- signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer. *Urology*, 66(3):671-5, 2005
- 15) M Maeda, A Tsuda, S Yamanishi, Y Uchikoba, Y Fukunaga, Hajime Okita, J Hata Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney in a child *Pediatric Blood and Cancer*, in press
- 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*, 85, 462-471, 2005.
- 17) Nagao, K., Togawa, N., Fujii, K., Uchikawa, H., Kohno, Y., Yamada, M., and Miyashita, T. Detecting tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the PTCH gene with exon junction microarrays. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 3379-3388, 2005.
- 18) Tadokoro, K., Yamazaki-Inoue, M., Tachibana, M., Fujishiro, M., Nagao, K., Toyoda, M., Ozaki, M., Ono, M., Miki, N., Miyashita, T., and Yamada, M. Frequent occurrence of protein isoforms with or without a single amino acid residue by subtle alternative splicing: the case of Gln in DRPLA affects subcellular localization of the products. *J. Hum. Genet.*, 50, 382-394, 2005.
- 19) Wang Y, Joh K, Masuko S, Yatsuki H, Soejima H, Nabetani A, Beechey CV, Okinami S, Mukai T. Mouse Murr1 gene is imprinted in the adult brain, presumably due to transcriptional interference by the antisense-oriented U2af1-rs1 gene. *Mol Cell Biol*, 24(1): 270-279, 2004
- 20) Yamada Y, Watanabe H, Miura F, Soejima H, Uchiyama M, Iwasaka T, Mukai T, Sakaki Y, Ito T. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q. *Genome Res*, 14(2): 247-266, 2004
- 21) Zhao W, Soejima H, Higashimoto K, Nakagawachi T, Urano T, Kudo S, Matsukura S, Matsuo S, Joh K, Mukai T. The Essential Role of Histone H3 Lys9 Methylation and MeCP2 Binding in MGMT Silencing with Poor DNA Methylation of the Promoter CpG Island. *J Biochem (Tokyo)*, 137(3): 431-440, 2005
- 22) Soejima H, Wagstaff J. Imprinting, Chromatin Structure, and Disease. *J Cell Biochem*, 95(2): 226-233, 2005
- 23) Sato K, Kitajima Y, Nakagawachi T, Soejima H, Miyoshi A, Koga Y, Miyazaki K. Cisplatin represses transcriptional activity from the minimal promoter of the O(6)-methylguanine methyltransferase gene and increases sensitivity of human gallbladder cancer cells to 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea. *Oncol Rep*, 13(5): 899-906, 2005
- 24) Koga Y, Kitajima Y, Miyoshi A, Sato K, Kitahara K, Soejima H, Miyazaki K. Tumor progression through epigenetic gene silencing of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human biliary tract cancers. *Ann Surg Oncol*, 12(5): 354-363, 2005
- 25) Arima T, Tetsuya Kamikihara T, Hayashida T, Kato K, Inoue T, Shirayoshi Y, Oshimura M, Soejima H, Mukai T, Wake N. ZAC, LIT1 (KCNQ10T1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res*, 33(8): 2650- 2660, 2005
- 26) Soejima H, Zhao W, Mukai T. Epigenetic silencing of the MGMT gene in cancer. *Biochem Cell Biol*, 83(4): 429-437, 2005
- 27) Yamasaki Y, Kayashima T, Soejima H, Kinoshita A, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Urano T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Kishino T. Neuron-specific relaxation of Igf2r imprinting is associated with neuron-specific histone modifications and lack of its antisense transcript Air. *Hum Mol Genet*, 14(17): 2511-2520, 2005
- 28) 副島英伸, 太田 亨, 木住野達也, 新川詔夫, 向井常博. 4. インプリントドメインの異常と疾患, V. エピジェネティクスと疾患, エピジェネティクス. 佐々木裕之編, シュプリン



- ガー・フェアラーク. 東京. pp213-220, 2004
- 29) 副島英伸, 東元 健, 向井常博. Beckwith-Wiedemann 症候群の分子遺伝学. 細胞, 36(7): 278-281, 2004
- 30) 副島英伸, 東元 健, 城圭一郎, 向井常博. 第7章 non-coding RNA の構造と機能. わかる実験医学シリーズ. 注目のエピジェネティクスがわかる. 押村光雄編, 羊土社, 東京. pp71-79, 2004
- 31) 副島英伸, 東元 健, 向井常博. インプリンティングと先天異常、癌. Molecular Medicine, 42(2): 201-208, 2005
- 32) Oikawa, K, Ishida, T, Imamura, T, Yoshida, K, Takanashi, M, Hattori, H, Ishikawa, A, Fujita, K, Yamamoto, K, Matsubayashi, J, Kuroda, M, Mukai, K. Generation of the novel monoclonal antibody against TLS/EWS-CHOP chimeric oncoproteins that is applicable to one of the most sensitive assays for myxoid and round cell liposarcomas. Am J Surg Pathol in press
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) Yoshida K, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Detection of fusion genes in sarcomas using paraffin-embedded tissues. Neuropathology, 25:263-268, 2005.
- 36) Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. Cancer Lett., 228, 5-11, 2005.
- 36) 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.
- 37) Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. Cancer Cell, 7, 337-50, 2005.
- 38) Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. Cancer Res. 65, 4587-97, 2005.
- 39) Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. Am. J. Pathol. 167, 213-22, 2005.
- 40) Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of FBN2 in human non-small cell lung cancer. Lung Cancer 50, 43-9, 2005.
- 41) Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction. J. Clin. Oncol. 23, 5205-10, 2005.
- 42) Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Suenaga Y, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. Oncol. Rep. in press.
- 43) Machida T, Fujita T, Oo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Increased expression of pro-apoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. Oncogene in press.

- 44) Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. FEBS Lett. in press.
- 45) Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. Oncogene in press.

## 2. 学会発表

- 1) 塩沢裕介, 清河信敬, 竹野内寿美, 田口智子, 大喜多肇, 林泰秀, 藤本純一郎. 4 カラーデジタルフローサイトメーターを用いた小児白血病マーカー中央診断の試み. 第15回日本フローサイトメトリー学会, 名古屋, 7月1-2日, 2005.
- 2) Shiozawa Y, Saito M, Kiyokawa N, Fujimura J, Hata J-I, Yamashiro Y, Yanai T, Yamataka A. Three cases of mesoblastic nephroma: two parental diagnosed cases and an adolescent case. 37th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. Vancouver, 21-24 September, 2005.
- 3) 片桐洋子, 清河信敬, 唐巍然, 竹野内寿美, 田口智子, 大喜多肇, 藤本純一郎: 抗 sialylGb5 単クローン抗体 raft.2 によって検出される EC 細胞上の SSEA-4 抗原, 第94回日本病理学会総会, 横浜, 4月, 2005年
- 4) Uchikawa, H., Fujii, K., Miyashita, T., Yamada, M., Kohno, Y. Gamma-irradiation deregulates cell cycle control and apoptosis in nevoid basal cell carcinoma syndrome-derived cells. Keystone Symposia, Cancer and Development. Banff, Canada, 2002年2月
- 5) Miyashita, T., Nagao, K., Togawa, N., Fujii, K., Yamada, M. Detection of tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the Patched gene with exon junction microarrays. Human Genome Variation Society, Scientific Meeting, Kyoto, 2002年4月
- 6) Uchikawa, H., Fujii, K., Kohno, Y., Yamada, M., Miyashita, T. Mutation in the tumor suppressor patched in 17 Japanese cases with Gorlin's syndrome. 1st Congress of Asian Society for Pediatric Research. Tokyo, Japan 2005年11月
- 7) 藤井克則, 宮下俊之, 内川英紀, 河野陽一. Gorlin 症候群におけるスプライシング変異: 潜在的スプライス部位の活性化とその発症機構. 第47回日本小児神経学会総会(熊本), 2005年5月
- 8) 宮下俊之, 藤井克則, 山田正夫. エクソン接合部オリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイを用いた Patched-1 遺伝子の選択的スプライシングの解析. 第64回日本癌学会総会(札幌)2005年9月, ワークショップ
- 9) 長尾和右, 外川直之, 内川英紀, 藤井克則, 山田正夫, 宮下俊之. エクソン接合部マイクロアレイを用いた Patched 遺伝子における組織特異的及び点突然変異による異常スプライシングの検出. 第28回日本分子生物学会年会(福岡), 2005年12月
- 10) Soejima H, Zhao W, Nakagawachi T, Higashimoto K, Joh K, Mukai T. The Essential Role of Histone H3 Lys9 Methylation and MeCP2 Binding in MGMT Silencing with Poor DNA Methylation of the Promoter CpG Island. Gordon Research Conference, Cancer Genetics and Epigenetics (poster #23). 2005. 1. 23-28. Holiday Inn, Ventura, California, USA
- 11) Yamada Y, Shirakawa T, Taylor T, Okamura K, Soejima H, Mukai T, Sakaki Y, Muramoto KI, Ito T. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 11q. HUGO's 10th Human Genome Meeting. (poster). 2005. 4. 18-21. Kyoto, Japan
- 12) Soejima H, Satoh Y, Kaneko Y, Mukai T. Genetic and epigenetic alterations at chromosomal region 11p in sporadic Wilms tumors. Annual Meeting of The American Society of Human Genetics (poster #457). 2005. 10. 25-29. Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, Utah, USA
- 13) Nakano S, Meguro M, Murakami K, Kugoh H, Soejima H, Higashimoto K, Urano T, Mukai T, Oshimura M. Loss of imprinting of LIT1 in colorectal cancers. Annual Meeting of The

- American Society of Human Genetics (poster #327). 2005. 10. 25-29. Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, Utah, USA
- 14) **副島英伸**, 趙衛, 向井常博: DNA 修復遺伝子 MGMT のサイレンシングにおける DNA メチル化とヒストン修飾の役割. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「染色体 DNA のメチル化修飾の形成、維持とその異常」(招待口演)2005. 6. 27. -6. 28. 大阪
- 15) 渡辺直樹, 中館尚也, 春田雅之, 小林泰文, 佐々木文章, 恒松由記子, 菊田敦, **副島英伸**, 福澤正洋, 金子安比古: ウィルムス腫瘍(WT)における WT1 および IGF2 異常と染色体異常. 第 64 回日本癌学会学術総会 (ワークショップ, W-147) 2005. 9. 14. -9. 16. 札幌
- 16) **副島英伸**, 佐藤勇司, 金子安比古, 向井常博: Wilms 腫瘍関連遺伝子座のジェネティックおよびエピジェネティック解析. 第 64 回日本癌学会学術総会 (ワークショップ, W-183) 2005. 9. 14. -9. 16. 札幌
- 17) 中野星児, 村上和弘, **副島英伸**, 浦野健, 久郷裕之, 押村光雄: 大腸癌における刷り込み遺伝子 LIT1 の発現異常. 第 64 回日本癌学会学術総会 (ポスター, PA1-0195) 2005. 9. 14. -9. 16. 札幌
- 18) 矢ヶ部伸也, **副島英伸**, 向井常博: MGMT 発現抑制におけるヒストンリジン残基のメチル化の役割. 第 64 回日本癌学会学術総会 (ポスター, PA1-0209) 2005. 9. 14. -9. 16. 札幌
- 19) 朴明子, 嶋田明, 小笠原水穂, 設楽利二, **副島英伸**, 林泰秀: Beckwith-Wiedemann 症候群に合併する先天性胞巣型横紋筋肉腫の遺伝子解析. 第 64 回日本癌学会学術総会 (ポスター, PA2-0701) 2005. 9. 14. -9. 16. 札幌
- 20) **副島英伸**, 佐藤勇司, 金子安比古, 向井常博: Wilms 腫瘍における 11 番染色体短腕のジェネティックおよびエピジェネティックな異常. 日本人類遺伝学会第 50 回大会 (若手ワークショップ, WS-4) 2004. 9. 20. -9. 22. 倉敷
- 21) 及川恒輔, 高梨正勝, 吉田恵一, 秋好歩美, **黒田雅彦**: 必須遺伝子 hWAPL のスプライスバリエントの解析 第 28 回日本分子生物学会年会福岡, 2005 年 12 月
- 22) **黒田雅彦**: 子宮頸部悪性病変における hWAPL 遺伝子と病期との関連 第 28 回日本分子生物学会年会 福岡, 2005 年 12 月
- 23) 吉田恵一, 及川恒輔, **黒田雅彦**, 高梨正勝, 向井 清: 粘液型及び円形細胞型脂肪肉腫の分子標的治療の検討 第 64 回日本癌学会学術総会 北海道, 2005 年 9 月
- 24) 高梨正勝, **黒田雅彦**, 及川恒輔, 向井 清: 細胞分化におけるクロマチン制御分子の役割 第 64 回日本癌学会学術総会 北海道, 2005 年 9 月
- 25) 岩屋啓一, 及川恒輔, 仙波征太郎, 泉 美貴, 長尾俊孝, 松林 純, 永井 毅, 芹沢博美, **黒田雅彦**, 向井 清: 予後不良な乳癌に高頻度にみられる Arp2 と WAVE2 の共発現 第 64 回日本癌学会学術総会 北海道, 2005 年 9 月
- 26) 松林 純, **黒田雅彦**, 高梨正勝, 及川恒輔, 吉田恵一, 向井 清: DNA マイクロアレイによる乳癌の遺伝子発現解析, 第 64 回日本癌学会学術総会 北海道, 2005 年 9 月
- 27) 及川恒輔, **黒田雅彦**, 吉田恵一, 高梨正勝, 向井 清: 新規 TLS/EWS-CHOP 特異的モノクローナル抗体の作成と診断・研究への応用 第 64 回日本癌学会学術総会 北海道, 2005 年 9 月
- 28) **黒田雅彦**: 細胞診検体を用いた子宮頸癌ガン遺伝子 hWAPL の発現解析 第 64 回日本癌学会学術総会 北海道, 2005 年 9 月
- 29) **黒田雅彦**: siRNA のガン治療への応用 特別講演 第 24 回分子病理研究会 北海道, 2005 年 6 月. 吉田恵一, 田辺秀之, 及川恒輔, 黒田雅彦: 脂肪肉腫の原因キメラ遺伝子形成における染色体テリトリーの関与 第 5 回核ダイナミクス研究会, 箱根, 2005 年 5 月.
- 30) **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, 山田佐一, 吉田安子, 瀧岡美佐, 神野一郎, 石井 信, 中川原 章. 「腫瘍特化型 DNA チップによる新しい神経芽腫予後予測システムの開発」シンポジウム. 第 12 回日本遺伝子診療学会大会, 松本, 2005. 8. 6.
- 31) **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, 山田佐一, 吉田安子, 瀧岡美佐, 神野一郎, 石井 信, 中川原 章. 「ミニ DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイルによる神経芽腫予後予測システムの開発」口頭発表. 第 64 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2005. 9. 16.
- 32) **大平美紀**, 大羽成征, 富岡伸元, 中村洋子, 磯貝恵理子, 平田隆洋, 石井 信, 中川原 章. 「神経芽腫のリスク分類にむけて: マイクロアレイ

技術による新戦略」合同ワークショップ口演.  
第 21 回日本小児がん学会学術総会、宇都宮、  
2005. 11. 26.

33) 熊谷昌明、他：晩期障害の軽減を目的とした小児ホジキンリンパ腫の標準的治療法の確立に関する研究. 日小血会誌 19：480, 2005

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

H. 知的所有権の取得状況

## 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 総長

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、小児がん臨床研究推進の基盤となる中央診断システム、ならびに、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の体制作りを目標とした。小児がんに対する臨床試験を実施している複数の臨床研究グループと連携し、中央診断システムおよび余剰検体保存システム構築を推進しつつある。横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、ウィルムス腫瘍、悪性リンパ腫ならびに白血病に関する臨床試験の中央診断を、病理、細胞マーカーあるいは遺伝子の夫々のレベルでの実施した。複数の専門医によるコンセンサス診断形成を基本方針としたが、十分に機能していると考えられた。余剰検体保存については急性リンパ芽球性白血病での臨床試験関連の保存が進み年間約150例ペースでの保存体制が整備されつつある。

### 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）

本研究に係る倫理申請については、「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（受付番号75）」（申請者：秦 順一、平成16年2月20日承認）、「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（受付番号126）」（申請者：藤本純一郎、平成16年12月27日承認）、「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（受付番号142）」（申請者：藤本純一郎、平成17年3月18日承認）の3件についてすでに国立成育医療センター倫理委員会で承認済みである。現在、「日本ユーイング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（受付番号188）」（申請者：大喜多 肇）の審査を受けているところである。

### 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については昨年度に構築したシステムを継続して運用した。すなわち、病理診断については複数病理医によるコンセンサス診断をプロトコル適格性の判断基準とするシステムをいずれの臨床試験においても採用している。連携した臨床研究グループは、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および東京小児がん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

グループが実施する臨床試験の多く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、東京小児がん研究グループと連携し、急性リンパ芽球性白血病(ALL)についての細胞マーカー中央診断体制を確立した。このシステムについては分担研究者・藤本が詳細を報告するが、年間150例以上の小児ALLの診断を実施した。悪性リンパ腫については日本小児白血病リンパ腫研究グループと連携し、本年度97例の症例を中央診断した。

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した。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。上述の小児ALL中央診断システムに付随する余剰検体保存ではすでに130例以上の小児ALLの保存が完了している。

本年度は、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、悪性リンパ腫ならびに白血病について総数で300例程度を中央診断した。また、本年度までに、凍結組織として小児白血病150例、悪性リンパ腫20例、横紋筋肉腫50例、ユーイング肉腫70例、腎腫瘍60例程度の余剰検体保存を完了している。

他の小児がん病型の臨床試験については、研究グループに参加しながら、中央診断ならびに検体保存についてのシステム構築に貢献しつつある。特に、小児固形腫瘍の中ではとりわけ重要な神経芽腫の臨床試験が効率的に進行するよう働きかけを行った。

また、日本小児白血病リンパ腫研究グループでは、急性骨髄性白血病(AML)に関する複数の臨床試験を計画しており、その検体保存も国立成育医療センター研究所で行うことになっている。同研究グループは寛解期の末血白血球の体系的保存も計画しており、それについても同研究所が保存を実施することになる。

#### 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昨年度確立した。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。

本年度から中央診断ならびに余剰検体保存が本格化した。来年度は、施設での臨床試験倫理審査通過に伴い中央診断実施症例数も増加が見込まれる。このような中でも東京小児がん研究グループが実施したALL治療試験のごとく、全ての登録例について中央診断が実施され、予定期間に予定患者数登録を達成し、かつ、余剰検体が保存されたことは快挙と言える。

#### E. 結論

- 1) 昨年度までに確立した小児腫瘍に対する病理中央診断システムを本年度は本格稼働させた。昨年度は、300例程度の小児がんを中央診断した。
- 2) 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。すでに360例程度の凍結検体を収集している。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Moritani, M, Yamasaki, S, Kamagi, M, Suzuki, T, Yamaoka, T, Sano, T, Hata, J, Itakura, M. Hypoplasia of endocrine and exocrine pancreas in homozygous transgenic TGF- $\beta$ 1. *Molec Cellular Endocrinol* 229:175-184, 2005.
- 2) Mori, T, Kiyono, T, Imabayashi, H, Takeda, Y, Tsuchiya, K, Miyoshi, S, Makino, H, Matumoto, K, Saito, H, Ogawa, S, Sakamoto, M, Hata, J, Umezawa, A. Combination of

- hTERT and Bmi-1, E6 or E7 induce prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol* 25(12):5183-95, 2005.
- 3) Ukiyama, E, Endo, M, Tezuka, T, Kudo, K, Sato, S, Akatsuka, S, Hata, J. Recurrent yolk sac tumor following resection of a neonatal immature gastric teratoma. *Pediat Surg Int* 21(7):585-8, 2005.
- 4) Shiozawa, Y, Kiyokawa, N, Saito, M, Fujimoto, J, Hata, J, Yamashiro, Y. Granulocytic sarcoma of the spine in a child without bone marrow involvement: a case report and literature review. *Eur J Pediat* 164:616-620, 2005.
2. 学会発表  
省略
- 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)のマーカー中央診断と検体保存の効率的なシステムを確立した。また、フローサイトメトリーにより、10,000分の1の精度で微小残存白血病細胞 MRD を検出するシステムを確立し、その白血病治療における有用性についての検討を開始した。今後、保存検体を用いて、多数症例を対象とする GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施する予定である。

### 研究協力者

清河信敬 国立成育医療センター研究所

### 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、最も代表的な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、その結果をデータバンク化するとともに、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

白血病細胞のマーカー解析：骨髄液あるいは末梢血液を培養液で1回洗浄後、

2x10E5 個の細胞を1テストに用いた。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のセットによる全血法の蛍光染色を行った。溶血後、Digital flow cytometry (EPICS XL および FC-500, Beckman Coulter 社)を用いて1レーザー4カラー解析を行った。

GeneChip 解析：白血病細胞株および健康ヒト末梢血より、複数の異なる RNA 抽出試薬 (RNAeasy - Qiagen 社, Isogene - NipponGene 社、等)を用いて RNA を抽出した。Total RNA 5  $\mu$ g を用いて Affimetrix 社 GeneChip を用いて網羅的遺伝子発現を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring (Agilent 社)を用いて解析した。

### C. 研究結果

1. 白血病細胞のマーカー診断と残余細胞保存を行うシステムの確立：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、東京都小児がん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 (TCCSG L0416)における登録症例全例の表面マーカー解析と検体保存を担当することにより、実践的に小児白血病マーカーの中央診断システムおよび検体保存システムの確立を試みた。平成17年に TCCSG L0416 にはインフォームドコンセントを得た上で137例の ALL 症例が登録さ

れ、このうち 133 例の検体送付があり、全例にマーカー診断を行った。また、芽球の割合が非常に少なかった 1 例を除き、132 例の残余検体を保存した。

4 カラー解析を行うことにより、検体数を減らしながらも検査項目を増やすことが可能であった。また、抗体の組み合わせを工夫することによって aberrant な抗原の発現について各抗原の発現の関係を明確に解析することが可能であった。最新機種 of FC-500 を用いた解析では、Listmode compensation system によって一端データを取得後であっても、検体を測定し直すことなく蛍光補正を行うことが可能であり、より正確な測定と検体量の節約に有用であった。

保存検体 10 検体について、試験的に解凍し、その質について検討したところ、いずれも RT-PCR に使用し得る RNA を抽出可能であった。しかし一部の検体では細胞の凝集がみられ、細胞学的な検討には使用できない場合があった。

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：白血病症例 133 例のマーカー解析の結果、最も頻度の高い B-precursor ALL において、26.0% の症例で aberrant な Myeloid 抗原の発現が、また 7.0% の症例で aberrant な T 細胞抗原の発現が認められ、これらの症例は aberrant マーカーの検出により骨髄中の微小残存白血病細胞の検出が可能と考えられた。一方、aberrant マーカーを持たない症例について、種々のマーカーの組み合わせについて検討した結果、CD38/CD10/CD19/CD34、CD58/CD10/CD19/CD34 および CD44/CD45RA/CD10/CD19 の 3 つの組み合わせが、抗原発現量の差から正常細胞と白血病細胞を区別するのに有用であることが明らかになり、上記マーカーを組み合わせることによって、90% 以上の症例でフローサイトメトリーを用いた微小残存白血病細胞の検出が可能と考えられた。

白血病患児の初診時検体と寛解期の骨髄検体を一定の割合で混ぜて希釈系列をつくり、検討した結果、 $1 \times 10^{-4}$  の感度で

MRD を検出可能と考えられた。

そこで実際に、10 例の B-precursor ALL 症例に対して治療開始 2W, 4W, 6W, 15W の骨髄検体について MRD 検出を試みた。この結果、2W の時点においては、10 例中 4 例で 23%~2.5% の残存白血病細胞が検出されたが、全例とも 4W 以降は MRD は検出感度以下であった。

3. ALL 保存検体の GeneChip 解析への使用に関する検討：様々な RNA 抽出法を比較した結果、GeneChip 解析に用いる RNA については一端凍結した細胞から抽出するよりも保存の際に RNA 抽出試薬に溶解してしまう方が劣化が少なく、高品質であると考えられた。また、RNA 抽出法について比較した結果、GeneChip 解析ではデータを比較する上で多くの検体を一定した条件で処理することが重要であり、より簡便で操作が単純な方法が適していると考えられた。また、検体採取後の時間と RNA の劣化、データの誤差との関係について検討した結果、採取後 24 時間から 36 時間の間ではほとんど差は認められず、48 時間後でも多少の劣化は認められるものの、比較可能な許容範囲であることが示唆された。

#### D. 考察

1. 白血病細胞のマーカー診断と残余細胞保存を行うシステムの確立：検体の流れを一元化し、高度な技術と合理的な方法論によるマーカー診断を行うことによって、より効率的な白血病細胞の余剰検体の保存が可能である。白血病をはじめとする小児腫瘍は稀少な疾患であり、今後のトランスレーショナルリサーチには効率的な残余検体の保存が重要と考えられる。

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：Digital flow cytometry による 1 レーザー 4 カラー解析で 10000 分の 1 の精度で微小残存白血病細胞の検出が可能であることが確認された。今後、多数症例を対象とした治療研究の中で、フローサイトメトリーによる MRD 検出が予後予測因子、あるいは

は治療層別化の因子としてどのような意義をもつのか検討が必要である。

3. ALL 保存検体の GeneChip 解析への使用に関する検討：本年は、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行うにあたっての、実際の症例検体の処理の方法について検討を行った。現在、TCCSG ALL 治療プロトコールへの登録症例全例に対する発現遺伝子解析を行うための施設間の調整手続きを行っており、平成 18 年 4 月より実施の見通しとなっている。

#### E. 結論

小児白血病の中央診断と検体保存の効率的なシステムを確立し、フローサイトメトリーによる MRD 検出の白血病治療における有用性についての検討を開始した。今後、多数症例を対象とする GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施する予定である。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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 d-chains. *Veterinary Immunol Immunopathol* 103:113-127, 2005.

2) Nakajima H, Cocquerel L, Kiyokawa N, Fujimoto J, Levy S. Kinetics of HCV envelope proteins' interaction with CD81 large extracellular loop. *Biochem Biophys Res Commun*. 328(4):1091-1100, 2005.

3) 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* 29(5):573-81, 2005.

4) Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J. Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2. *Biochem Biophys Res Commun*. 332(4):1004-11, 2005.

5) Yamamoto R, Isobe T, Eguchi T, Tang WR, Kiyokawa N, Amemiya H, Fujimoto J, Sato E, Takagaki Y, Yasue H. Porcine TCR CD3zeta-chain and eta-chain. *Mol Immunol*. 42(12):1485-93, 2005.

6) Shiozawa Y, Kiyokawa N, Saito M, Fujimoto J, Hata JI, Yamashiro Y. Granulocytic sarcoma of the spine in a child without bone marrow involvement: a case report and literature review. *Eur J Pediatr*. 164(10):616-20. Epub Jul 13, 2005.

7) Shiozawa Y, Kiyokawa N, Fujimura J, Suzuki K, Yarita Y, Fujimoto J, Saito M, Yamashiro Y. Primary Malignant Lymphoma of the Central Nervous System in an Immunocompetent Child: A Case Report. *J Pediatr Hematol Oncol*. 27:561-564, 2005.

8) Miwa S, Misumi Y, Yoshimura S, Nakamura N, Fusano T, Sakisaka S, Ogata S, Fujimoto J, Kiyokawa N, Ikehara Y. Depletion of vesicle-tethering factor pl15 causes mini-stacked Golgi fragments with delayed protein transport. *B. B. R. C.*, 338(2):1268-74, 2005.

9) Ishii R, Morimoto A, Ikushima S, Sugimoto T, Asami K, Bessho F, Kudo K, Tsunematu Y, Fujimoto J, Imashuku S. High serum values of soluble CD154, IL-2 receptor, RANKL and osteoprotegerin in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2005 Dec 15; [Epub ahead of print]

10) Kiuchi S, Yamada T, Kiyokawa N, Saito T, Fujimoto J, H Yasue. Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues. *Cytogenetic and Genome Research*, in press.

11) Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J,

Tang W, Itagaki M, Shiozawa Y, Suzuki K, Sakaguchi S, Katagiri YU, Takahshi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Involvement of Insulin-like Growth Factor-I and Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Pro-B-cell Development. Exp Hematol, in press.

## 2. 学会発表

1) 塩沢裕介, 清河信敬, 竹野内寿美, 田口智子, 大喜多肇, 林泰秀, 藤本純一郎. 4カラーデジタルフローサイトメーターを用いた小児白血病マーカー中央診断の試み. 第15回日本フローサイトメトリー学会, 名古屋, 7月1-2日, 2005.

2) Shiozawa Y, Saito M, Kiyokawa N, Fujimura J, Hata J-I, Yamashiro Y, Yanai T, Yamataka A. Three cases of mesoblastic nephroma: two parental diagnosed cases and an adolescent case. 37<sup>th</sup> Congress of the International Society of Pediatric Oncology. Vancouver, 21-24 September, 2005.

## 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