

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、同腫瘍細胞の発現プロファイルを網羅的に解析した。その結果、細胞内シグナル伝達分子、細胞表面分子を含む複数の分子が Ewing 肉腫細胞において特徴的に高発現であることが明らかとなった。それとともに本腫瘍に特徴的な遺伝子異常である EWS-ETS キメラ遺伝子の産物によって転写を調節される分子も特定された。さらに、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。

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、同腫瘍の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、本腫瘍の治療標的を探索する。

B. 研究方法

Ewing 肉腫の細胞株 6 種類、その他の小児に好発する小円形細胞腫瘍の細胞株 4 種類、骨髄間質細胞由来細胞株 1 種類の発現プロファイルを Gene Chip U133 2.0 (Affymetrix) にて決定した。さらにその発現プロファイルを GeneSpring (Silicon Genetics) にて解析し、EWS/ETS キメラ遺伝子陽性腫瘍細胞に発現が高い分子、低い分子等を割り出し、その意義付けを行った。

上記、発現プロファイリングの結果、Ewing 肉腫特異的に発現が高いことが判明した分子について、その転写調節領域を単離した。ルシフェラーゼ・アッセイによって、同領域がキメラ遺伝子の産物によって制御されているかどうか検討した。また、同領域の欠失変異体を作製することにより、キメラ遺伝子の産物によって制御されている領域を決定した。

さらに、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 肉腫細胞と tetracycline repressor(tetR)を用いた誘導発現系を作製した。Ewing 肉腫細胞へ tetR ベクターを導入し、tetracycline operon 制御下に shRNA を発現する発現ベクターを導入した。

Ewing 肉腫に特徴的な細胞表面分子を探索するために Ewing 肉腫特異的抗体 5c11 の抗原を解析した。Ewing 肉腫細胞 RD-ES 細胞の膜成分をビオチン化し、Ewing 肉腫特異抗体 5c11 にて免疫沈降を行った。沈降された蛋白を二次元電気泳動法によって展開し、沈降された蛋白を同定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、あらかじめ国立成育医療センター動物実験委員会へ申請し、承認を得て行った。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6種類、その他の小児小円形細胞腫瘍3種類、骨髄間質由来細胞1種類の発現プロファイルをGene Chip法にて決定した。Ewing肉腫の発生母地は、未だに明らかになっていないが、骨髄の間質の未熟細胞と想定されていることから、骨髄間質由来細胞をコントロールとして、発現の比較・検討を行った。その結果、Ewing肉腫で特異的に高発現である分子と低発現である分子が複数同定された。Ewing肉腫で高発現な分子は、細胞膜上の分子やシグナル伝達分子が多い傾向にあった。一方、Ewing肉腫で低発現な分子は、蛋白の代謝に関連した分子が多い傾向にあった。Ewing肉腫で発現が高い分子には、MCF2、CD40、DLG2、cyclin D1、Id2が存在した。一方、発現が低い分子群にはMAPK1、MBP1、ADAM15、BMP1等が含まれていた。いくつかの分子に関してReal Time PCR法にて発現を解析し、Gene chip法と同様の結果を得た。

Ewing肉腫で高発現な分子は、細胞膜上の分子が多数を占めたが、その中でも特に細胞内シグナル伝達に関連する分子群に焦点を当てて解析を進めた。そのうちの一つの分子の約2kBの転写調節領域を単離した。ルシフェラーゼ・アッセイを行い、同領域がキメラ遺伝子の産物によって制御されることが明らかとなった。同転写調節領域には、Etsが認識するconsensus配列が多数、存在するが、同領域の欠失変異体を用いたルシフェラーゼ・アッセイにより、キメラ遺伝子の産物によって転写を調節される領域を決定した。このことから同分子がキメラ遺伝子の産物によって転写レベルで発現を調節されていることが判明した。さらにChromatin免疫沈降法を用いて、*in vivo*でのキメラ遺伝子の産物と同転写調節領域の関連を確認中である。

また、キメラ遺伝子を抑制することによりEwing肉腫細胞の発生機序を解析すること、並びに、本腫瘍の発生母地を明らかにする目的で、Ewing肉腫のコンディショナルなキメラ遺伝子ノックダウン系の作製を開始した。異なるキメラ遺伝子

を発現するEwing肉腫細胞株3種類にtetRを導入し、安定発現細胞株を得た。また、Ewing肉腫特異的キメラ遺伝子に対するshRNA発現ベクターを作製し、導入した。

さらに、Ewing肉腫特異的細胞表面分子の一つである5c11抗原を同定するために、Ewing肉腫細胞RD-ES細胞より免疫沈降を行い約100kDの蛋白を得た。二次元電気泳動で展開し、その分子をMASS spectrometryにて解析中である。

D. 考察

Ewing肉腫細胞の発現プロファイルを明らかにした。そのプロファイルを骨髄間質由来細胞あるいは他の小円形細胞腫瘍と比較・検討した。その結果、Ewing肉腫では、細胞膜上の分子やシグナル伝達に関連した分子が高発現であることが判明した。さらにそれらの遺伝子のうちのあるものが、キメラ遺伝子によって転写を調節されていることをルシフェラーゼ・アッセイにて示した。キメラ遺伝子によって発現を調節される分子は複数存在すると考えられるが、それらの作用が協調しあい、Ewing肉腫の腫瘍発生に関わっていると考えられる。これらのEwing肉腫において高発現な分子をsiRNA等でノックダウンすることにより、その作用を検討することができ、また、治療法開発にもつながると考えられた。

Ewing肉腫細胞においてtetRを用いた誘導発現系を構築した。Ewing肉腫細胞では、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ることが予想される。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と考えられる。

E. 結論

Ewing肉腫細胞の発現プロファイルを明らかにした。その発生母地と想定される

未熟な間質細胞との比較から、Ewing肉腫の遺伝子発現の特徴が明らかとなった。発現プロファイルからは、細胞膜上の分子やシグナル伝達分子が Ewing 肉腫で高発現な傾向があり、細胞表面分子やシグナル伝達分子を標的とした治療法の可能性が考えられた。Ewing 肉腫において高発現な遺伝子の中にはキメラ遺伝子によって発現を調節される遺伝子が存在した。このような分子は多数存在すると考えられるが、その機能を解析することによって Ewing 肉腫発症の機序を解明することができると考えられる。また、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) J Matsui, N Kiyokawa, H Takenouchi, T Taguchi, K Suzuki, Y Shiozawa, M Saito, W-R Tang, YU Katagiri, H Okita, J Fujimoto. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* 19, 573-581, 2005
- 2) YU Katagiri, N Kiyokawa, K Nakamura, H Takenouchi, T Taguchi, H Okita, A Umezawa, J Fujimoto. 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), 1004-1011. 2005
- 3) M Horinaga, 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
- 4) 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*, 2006, in press

2. 学会発表

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

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

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。我々は前年度に引き続き NBCCS の遺伝子解析を行い、18 例中 14 例で遺伝子変異を見出し NBCCS 患者の診断および経過観察に貢献した。また *PTCH* 遺伝子の複雑な選択的スプライシングを解析するマイクロアレイを開発し、組織特異的選択的スプライシングの解析や一部の NBCCS 患者で認められる異常スプライシングの検出に有用であることを示した。

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、前年度に引き続き NBCCS の遺伝子解析を行った。また我々は前年度に見出した *PTCH* 遺伝子の非常に複雑な選択的スプライシングを簡便かつハイスループットに解析することを目的に、エクソン接合部を標的とするオリゴヌクレオチドを搭載するマイクロアレイを開発した。

B. 研究方法

遺伝子診断は患者由来高分子 DNA を用いてエクソン毎に 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 を不死化リンパ球から抽出し、マイクロアレイ解析に用いた。

マイクロアレイの作製とその応用に関する研究は三菱レイヨン株式会社と共同研究で行なった。*PTCH* 遺伝子の各エクソンの塩基配列及び各エクソン-エクソン接合部の塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを搭載する繊維型 DNA チップを開発した。これを用いて先ず、既知の様々な *PTCH* アイソフォームの発現ベクターから作製したハイブリダイゼーションサンプルを解析し、設計し

たマイクロアレイの有用性を確認した。次にヒト各組織及び NBCCS 患者由来 RNA を用いて、組織特異的選択的スプライシングの解析と異常スプライシングの検出を行なった。

(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。

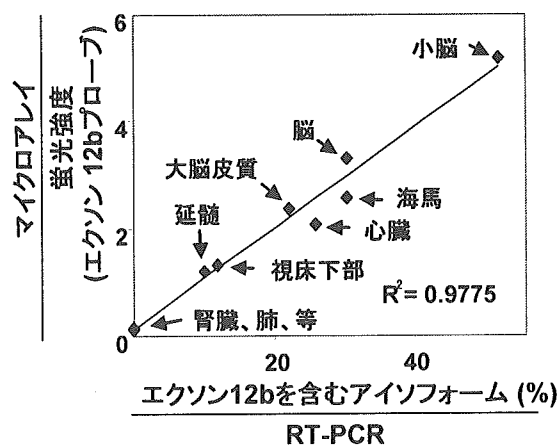


図 1

C. 研究結果

NBCCS の遺伝子解析の結果、14/18 例で *PTCH* 遺伝子に変異が認められた。変異が認められた 14 例中 12 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

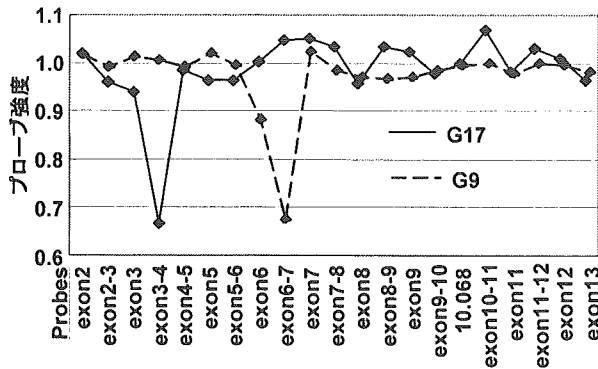


図 2

られなかった。また我々の検出した変異の全てが従来報告のないものであった。

マイクロアレイを用いて得られた各組織由来 RNA の解析の結果、我々が発見したエクソン 12b を含む mRNA アイソフォームは脳(特に小脳)及び心臓で特異的に発現しており、このデータは RT-PCR による解析と定量性の点で高い相関を示した(図 1)。同様にエクソン 10 及びエクソン 4-5 のスキッピングに関しても RT-PCR による解析と高い相関が認められた。

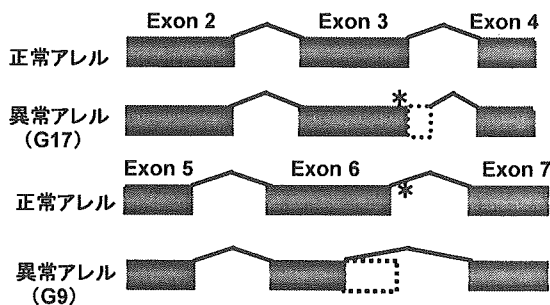


図 3

次に NBCCS 患者由来 RNA を用いて解析を行なった。症例 G17 でエクソン接合部プローブ 6-7 の、G9 でエクソン接合部プローブ 3-4 のシグナル低下を認めた(図 2)。この領域をはさむ PCR プライマーを用いて RT-PCR を行なったところ、予想される産物に加えて G17 ではより高分子量の産物が、G9 ではより低分子量の産物が検出された。これらの産物の塩基配列を決定したところ、G17 で認められた高分子量産物はエクソン 3 の最終塩基 G が A に変異し、更にイントロン 3 の配列を含んでいた。このことから点突然変異によってスプライス供与部位のコンセンサス配列が破壊され、その結果供与部位がイントロン 3 に存在する潜在的コンセンサス配列に移ることによって異常なスプライス産物を生じていることが明らかとなった。また G9 では同様にイントロン 6 に生じた点突然変異によってエクソン 6 内の潜在的スプライス供与部に移動し異常なスプ

ライス産物を生じていた(図 3)。

D. 考察

少なくとも本症候群には異常スプライシングをきたす変異が少なからず存在することが明らかとなった。特に G17 は DNA の解析のみではミスセンス変異との鑑別は不可能であることより、RNA の解析の重要性が示された。また我々はエクソン接合部マイクロアレイを初めてヒト遺伝病の診断に応用し、その有用性を示した。ヒトゲノムの起こる変異の少なくとも 15%ほどが RNA スプライシングに影響を与えるものであるといわれている。従ってこの方法は広く遺伝病、癌の診断、病態生理の解析に応用可能と思われる。今後ともわが国の NBCCS の遺伝子診断の拠点として解析を続ける予定である。将来的にはその関連疾患(全前脳症、髄芽細胞腫)にも研究の対象を広げたい。

E. 結論

NBCCS18 例の遺伝子解析を行ない、14 例で遺伝子変異を検出できた。また、選択的スプライシングを解析するマイクロアレイを開発し、組織特異的選択的スプライシングの解析や一部の遺伝病患者で認められる異常スプライシングの検出に有用であることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nagao,K., Toyoda,M., Takeuchi-Inoue,K., Fujii,K., Yamada,M., and Miyashita,T. (2005) Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, *patched*, having distinct first exons. *Genomics*, 85,462-471.

Nagao,K., Togawa,N., Fujii,K., Uchikawa,H., Kohno,Y., Yamada,M., and Miyashita,T. (2005) Detecting tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the *PTCH* gene with exon junction microarrays. *Hum.Mol.Genet.*, 14,3379-3388.

Tadokoro,K., Yamazaki-Inoue,M., Tachibana,M., Fujishiro,M., Nagao,K., Toyoda,M., Ozaki,M., Ono,M., Miki,N., Miyashita,T., and Yamada,M. (2005) 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.

2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ゲノム刷り込み機構の解明

分担研究者 副島英伸 佐賀大学医学部講師

研究要旨 ゲノム刷り込みは、先天異常疾患や腫瘍の発生に関連する。特に、ヒト11p15.5の刷り込み領域は Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)や Wilms 腫瘍の発症と深く関わっている。Wilms 腫瘍 37 例と BWS43 例について 11p 領域のジェネティック、エピジェネティックな解析を行った。その結果、Wilms 腫瘍の約 90% で 11p 領域の異常を認め、腫瘍発生に関して重要な染色体領域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検討したところ、発症に関するジェネティックあるいはエピジェネティックな異常の起こりやすさが人種間で異なることが示唆された。一方、刷り込み調節領域 *DMR-Lit1* のヒストン修飾の解析より、H3K20 モノメチル化が父性アレル上の遺伝子抑制のための刷り込みマークである可能性が示唆された。

A. 研究目的

ゲノム刷り込みは、一对の対立遺伝子のうち一方の親由来の遺伝子のみが発現する現象で、配偶子形成過程で付けられる印(刷り込みマーク)に基づき遺伝子発現が決定される。ヒト染色体 11p15.5 は、複数の刷り込み遺伝子が存在する刷り込み領域であり、刷り込みの破綻は Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)や胎児性腫瘍(特に Wilms 腫瘍)の発症と関連する。刷り込みマークとして、DNA メチル化と特定のヒストン修飾が考えられている。本研究では刷り込み遺伝子発現調節の分子基盤を明らかにし、疾患発症のメカニズムを解明することを目的とする。

B. 研究方法

今年度は以下の研究を行った。1.と2.の研究に関しては、佐賀大学医学部倫理委員会およびヒトゲノム・遺伝子解析研究委員会において承認されている。

1. Wilms 腫瘍におけるジェネティック、エピジェネティック解析

37 例の孤発 Wilms 腫瘍について、以下のようなジェネティック、エピジェネティックな解析を行った。(1)11p の LOH、(2)*IGF2/H19* 刷り込みドメイン:*IGF2*の刷り込み喪失(loss of imprinting: LOI)、*H19* 両アレル高メチル化、(3)*KIP2/LIT1* 刷り込みドメイン:*KIP2* の発現低下、*DMR-LIT1* の脱メチル化、(4)*WT1* 遺伝子遺伝子変異、発現量、プロモーターメチル化、(5)*β-catenin*: 遺伝子変異。

2. 本邦における Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)の解析

BWS 本邦例 43 例を対象に、11p15.5 のゲノム刷り込みに関わる以下のようなジェネティック、エピジェネティックな解析を行い、欧米例との比較検討を行った。(1)*DMR-LIT1* 脱メチル化、(2)*H19-DMR* 高メチル化、(3)父性ダイソミー(patUPD)、(4)*p57^{KIP2}* 遺伝子変異 (5)染色体異常。

3. 11p15.5 ゲノム刷り込みドメインの刷り込み機構の解析

マウス細胞を用いて *Kip2/Lit1* ドメイン内の刷り込み調節領域(ICR) *DMR-Lit1* のヒストン修飾(H3K9、H3K27、H4K20 のモノ、ジ、トリメチル化)についてクロマチン免疫沈降法(ChIP)にて解析した。

C. 研究結果

1. Wilms 腫瘍におけるジェネティック、エピジェネティック解析

4つの遺伝子座、*IGF2/H19*、*KIP2/LIT1*、*WT1*(以上 11p)、*β-catenin*(p21)の解析の結果、ジェネティックな異常として、11p の LOH 10 例(27%)、*WT1* 変異 5 例(14%)、*β-catenin* 変異 3 例(8%)を認めた。また、エピジェネティックな異常として、*IGF2* の LOI 13 例(37%)、*DMR-LIT1* 脱メチル化 12 例(11%)、*KIP2* 発現低下 10 例(16%)、*WT1* 発現低下 9 例(19%)、*WT1* プロモーターメチル化 1 例(3%)であった。ジェネティックな異常としては LOH が、エピジェネティックな異常としては *IGF2* の LOI がとっとも高頻度であった。また、33 例(89%)に 4 つの遺伝子座に何らかの異常を認めた。このうち、3p21 の *β-catenin* 変異を単独で示す症例はなかったことから、この

89%の症例はすべて11pの異常を示すことが明らかとなった。さらに、19例(51%)が複数の遺伝子座における異常を示した。

2. 本邦における Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)の解析

43例の解析の結果、*DMR-LIT1* 脱メチル化 15例(35%)、*H19-DMR* 高メチル化 0例(0%)、父性ダイソミー(patUPD)6例(14%)、*p57^{IP2}* 遺伝子変異 2例(5%)、染色体異常 5例(転座 3例、トリソミー2例)(12%)、であった。*DMR-LIT1* 脱メチル化は欧米の報告と同頻度で、*H19-DMR* 高メチル化は本邦例が低頻度であった。また、染色体異常は、高い傾向にあった。

3. 11p15.5 ゲノム刷り込みドメインの刷り込み機構の解析

ほとんどのメチル化修飾は母性アレル *DMR-Lit1* に優位に存在していたが、H3K20 モノメチル化のみが父性アレルに存在することが判明した。

D. 考察

11p15.5のゲノム刷り込みが関連する疾患 Wilms 腫瘍と BWS について本邦例を対象にしてジェネティック、エピジェネティックな解析を行った。Wilms 腫瘍の解析結果から、*IGF2/H19*、*KIP2/LIT1*、*WT1* が存在する 11 番染色体短腕は、Wilms 腫瘍発生に最も重要な染色体領域と考えられた。BWS の解析結果からは、BWS 発症に関する人種間におけるジェネティックあるいはエピジェネティックな異常の起こりやすさの違いが存在する可能性が示唆された。また、刷り込み調節流域 *DMR-Lit1* のヒストン修飾については、解析したヒストンメチル化は遺伝子発現抑制に関連すること、父性アレル上では *Lit1* 以外の刷り込み遺伝子は抑制されていることから、H3K20 モノメチル化が遺伝子抑制のための刷り込みマークである可能性が示唆された。

E. 結論

Wilms 腫瘍および BWS のジェネティック、エピジェネティックな解析を行い、これらの疾患の原因となる異常の頻度を明らかにした。その結果、Wilms 腫瘍における 11p の重要性および BWS 発症に関する欧米例と本邦例の遺伝的背景の違いが浮き彫りになった。また、*DMR-Lit1* のヒストン修飾解析から、H3K20 モノメチル化がゲノム刷り込み調節機構に関与する傍証を得た。これらの結果を基に、来年度は刷り込み機序に関わる重要分子の同定に取り組む。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Soejima H, Wagstaff J. Imprinting, Chromatin Structure, and Disease. *J Cell Biochem*, 95(2): 226-233, 2005
- 5) 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
- 6) 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
- 7) Arima T, Tetsuya Kamikihara T, Hayashida T, Kato K, Inoue T, Shirayoshi Y, Oshimura M, Soejima H, Mukai T, Wake N. *ZAC*, *LIT1 (KCNQ1OT1)* and *p57^{IP2} (CDKN1C)* are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res*, 33(8): 2650-2660, 2005
- 8) Soejima H, Zhao W, Mukai T. Epigenetic silencing of the *MGMT* gene in cancer. *Biochem*

Cell Biol, 83(4): 429-437, 2005

- 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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
2. 学会発表
- 1) 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
 - 2) 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
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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
 - 6) 渡辺直樹, 中舘尚也, 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
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

キメラ遺伝子に対する分子標的治療法の開発

(分担) 研究者 黒田 雅彦 東京医科大学・助教授

研究要旨

一部の悪性小児腫瘍は依然として治療成績が不良であり、新たな治療法の確立が急務である。本研究では、腫瘍の原因と考えられるキメラ融合分子に対して siRNA を用いた治療の開発、抗体療法の基礎開発を行った。また、キメラ融合蛋白質の標的となる分子の単離も試みた。

A. 研究目的

一部の小児がんは依然として治療成績が不良であり、新たな治療法の確立が急務である。このような背景から、我々は、腫瘍の原因と考えられるキメラ融合蛋白質に対しての分子標的治療の開発を目指す。具体的には、未だ治療成績が不良の小児固形腫瘍に出現するキメラ遺伝子の発現を siRNA または抗体を用いて抑制する。また、開発に際しては、siRNA の細胞内導入法として、レトロウイルスによるベクターの開発、また従来のカチオン脂質にかわる細胞内導入法の開発も行う。これにより、効率的な siRNA の組織内導入が期待される。以上の研究開発より、小児悪性腫瘍の治療選択が増えると同時に、キメラ遺伝子が関与する腫瘍化のメカニズムとその役割の詳細が明らかになる事が期待される。

B. 研究方法

今年度は以下の検討を行った。

(1)キメラ遺伝子を標的とした siRNA に分子標的治療の開発：

EWS-Fli1 を持つユーイング肉腫/PNET は、EWS 遺伝子に対する DNA アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることにより、EWS-Fli1 遺伝子の発現を抑制し、その結果として細胞増殖を抑制する事が確かめられている。一方、短鎖干渉性二重鎖 RNA(siRNA)は、DNA アンチセンスオリゴヌクレオチドよりもさらに効率よく目的遺伝子をノックダウンすることが明らかになり、多くの悪性腫瘍でその応用が期待されている。今年度は、TLS-CHOP キメラ遺伝子に対する siRNA を設計し、粘液型脂肪肉腫に対する増殖抑制効果を検討するとともに、新規の標的分子の単離を検討した。

(2) 機能性 RNA ライブラリーを用いた難治性小児がんの分子標的治療法の開発：

近年、non-coding RNA (ncRNA) と称される RNA 分子には、構造的または触媒機能や制御機能において非常に多様性があることが示され始めている。ゲノム上に相当数の ncRNA がコードされると推測され、生体機能を理解する上で ncRNA の機能解析は不可欠と言われる。ncRNA は発生や細胞死、細胞増殖、造血や神経経路にまで関与することがわかってきている。そこで新たに、疾患を誘発する要因として ncRNA の変異を視野に入れる必要性が指摘されている。今年度は、小児がんにおける機能性 RNA の理解と小児がんの分子標的治療の標的分子の同定のために、ゲノムワイドな siRNA/miRNA レンチウイルスライブラリーの作製を試みた。

C. 研究結果

(1) キメラ遺伝子を標的とした siRNA に分子標的治療の開発：

本研究では、粘液型及び円形細胞型脂肪肉腫 (MLS/RCLS) の分子標的治療法の確立を目標として、昨年度から今年度にかけて MLS/RCLS の原因遺伝子である TLS-CHOP キメラ遺伝子に対する siRNA を用いた治療法の開発を検討してきた。その結果、TLS-CHOP キメラ遺伝子の発現量を 1/5 に減少させ、腫瘍細胞の増殖を 25%程度抑制することのできる特異的 siRNA 配列を確定した。しかしながら、in vivo の動物モデルにおいては、腫瘍細胞増殖抑制効果は確認されなかった。一方、TLS-CHOP は転写因子として機能することが知られている。そ

の下流分子の一つである *DOL54* も癌遺伝子として作用することが判明しており、*DOL54* 特異的 siRNA は 1 種の MLS/RCLS 由来培養細胞の増殖を顕著に阻害した。しかし、*DOL54* は MLS/RCLS の半数程度でしか発現誘導されない。そこで、TLS-CHOP 発現 vector または control vector を導入した細胞同士、及び、MLS/RCLS 由来の細胞に *TLS-CHOP* siRNA または control siRNA を導入したものとでそれぞれマイクロアレイを行ない、TLS-CHOP の下流で、分子標的治療の標的分子として治療効果の高い分子の検索を行なった。現在、標的分子の候補を 50 遺伝子に絞り込んで腫瘍増殖抑制能を検討している。

(2) 機能性 RNA ライブラリーを用いた難治性小児がんの分子標的治療法の開発：

本年度、我々はまずゲノムワイドな 5 万遺伝子を網羅する siRNA レンチウイルスライブラリーを SBI 社と協同で開発した。そして、本ライブラリーがヒト細胞で機能するかどうか検討した。具体的には、HeLa 細胞に本ライブラリーを感染させ、puromycin で選択後のクローンを単離した。その結果、MOI 1:1 で本ライブラリーを HeLa 細胞に感染させた後、1 万クローンが薬剤耐性クローンとして単離することができた。腫瘍の増殖に関与する分子を単離することは難しいが、本ライブラリーが実用可能であることが示された。

D. 考察

本年度の研究から、キメラ遺伝子を持つ小児腫瘍に対して siRNA が治療に応用できる可能性が示された。本年度は、in vitro における検討を行ったが来年度はさらに in vivo の動物モデルを用いて検討していく必要がある。また、siRNA の in vivo デリバリーに関して、ベクターを用いる方法やアテロコラーゲンを用いることも検討していきたい。さらに、来年度、今年度単離した標的分子について腫瘍増殖抑制能を検討していきたい。

また、機能性 RNA ライブラリーに関しては、まず siRNA ライブラリーを完成させた。来年度は、小児がんの細胞株に感染させて apoptosis を誘導したクローンから、導入された機能性 RNA の標的となる分子を同定していきたい。また、miRNA ライブラリーに関しても来年度中に完成を目指す。にでも可能であるが、我々は本年度 TLS-CHOP キメラ遺伝子に

E. 結論

治療成績が不良な小児悪性腫瘍の新たな治療法として、RNA 干渉による siRNA を用いた分子標的治療の有用性が示された。今後さらに臨床応用に向けた基礎的研究が必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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.
3. 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.
4. Yoshida K, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M: Detection of fusion genes in sarcomas using paraffin-embedded tissues. Neuropathology, 25:263-268,2005.

2. 学会発表

1. 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
2. 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
3. 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

4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

ゲノム情報からみた小児がんの臨床特性の解明に関する研究

分担研究者 大平美紀 千葉県がんセンター生化学研究部 研究員

研究要旨 網羅的遺伝子発現プロファイリングに基づいた小児がんの新しいリスク分類の構築と難治性小児がんの新しい治療標的の同定を目指し、代表的な小児がんである腎芽腫、肝芽腫、神経芽腫由来の遺伝子を大量に収集し、これらを搭載した小児がん DNA チップを作製した。当研究室では、これまでにチップを用いた遺伝子発現解析による神経芽腫の予後予測システムを確立しているが、その手法を肝芽腫、腎芽腫など他の小児がんへの応用を目的に解析サンプルおよび臨床データの収集と発現解析を進めた。

A. 研究目的

近年の治療法向上により、小児がんの治癒率は大幅に改善されてきたものの、有効な治療法が確立していない難治性腫瘍も未だ存在し、それらに対する新しい治療法の開発が急務である。また、将来を担う小児に対する QOL を重視した治療法の提供も合わせて優先すべき事項である。一方で、腫瘍組織における遺伝子発現プロファイルが、悪性度などの個性を規定することが明らかになってきた。そこで本研究では、小児がんの臨床的特性の背景にある分子的特徴を DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析により明らかにし、その成果を臨床でのより正確な早期診断と治療層別化による効率的な治療システムの構築に取り入れることを目的とする。

B. 研究方法

1) 小児がん特化型 DNA チップの作製とチップに搭載した遺伝子の基盤情報の整備

小児腫瘍における遺伝子の発現パターンから層別化を行うには、発生時期に発現する遺伝子を網羅的に揃え整備することが必要と考えられる。小児がん組織そのものがこのような早期に働く遺伝子を豊富に発現していることが予想されるため、本研究ではまず小児がん由来の遺伝子ソースを大量に収集しチップ化することとした。代表的な小児がんである腎芽腫（ウイルス腫瘍）、肝芽腫、神経芽腫由来の複数の腫瘍組織から RNA を調製し、完全長 cDNA に富むオリゴキャッピング cDNA ライブラリーを作製した。これまでに合計約 34,000 個のクローンをランダムにピックアップし、両端塩基配列の決定と、データベースに対する相同性検索を行った。既知遺伝子にヒットしないクローンについては、挿入断片の全塩基配列を決定した。両端塩基配列をライブラリー内で比較することにより遺伝子の重複を除き、約 11,000 種類の独立遺伝子を抽出し、これらをスライドグラ

スに貼り付けた小児がん特化型 DNA チップを作製した。また腫瘍別に腎芽腫ライブラリーからは約 5,000 個の独立遺伝子を搭載した腎芽腫 DNA チップを、肝芽腫ライブラリーからはやはり約 5,000 個の遺伝子を搭載した肝芽腫 DNA チップをそれぞれ作製した。

2) 腫瘍層別化モデルの構築とその応用

上記の小児がん DNA チップを用いて約 160 サンプルの神経芽腫組織について遺伝子発現解析を行った。具体的には、凍結腫瘍組織から total RNA を調製し、うち 10 マイクログラムを用いて Cy3, Cy5 色素による 2 色蛍光標識法によりハイブリダイゼーションを行った。対照コントロールとしては、4 種類の神経芽腫細胞株由来 total RNA を大量に調製し、その等量混合物を常に用いた。各遺伝子の発現データから、患者予後と強く相関する遺伝子をコンピュータ解析により抽出し、それらのみを搭載した診断用チップを新たに作製した。腎芽腫、肝芽腫についても同様の解析を行うため、腫瘍組織より total RNA の抽出と品質のチェックを進めた。

倫理面の配慮としては、遺伝子発現解析に用いるサンプルは、全て組織供与施設において文書によるインフォームドコンセントを得、匿名化された後に当研究室に供与されたものを用いる。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って行い、研究実施にあたっては、千葉県がんセンター倫理審査委員会に諮り、あらかじめ承認を得た後に研究を開始した。

C. 研究結果

小児がんの遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析するため、代表的な小児がんである腎芽腫、肝芽腫、神経芽腫から作製した遺伝子ライブラリーを用いて、約 11,000 個の独立遺伝子を単離し、それらを搭載し

た独自の小児がん特化型 DNA チップを作製した。それぞれの遺伝子については UCSC の Genome Browser データベース等の情報をもとに、染色体マッピングと遺伝子の機能情報である遺伝子オントロジー情報を大規模に検索し、独自の基盤データベースの整備を進めた。本遺伝子データベースには、各種の小児がんの発現プロファイルを順次加えており、独自の小児がん発現データベースを構築していく計画である。

小児がんの遺伝子発現プロファイリングに関しては、これまでに神経芽腫に特化したチップを用いた神経芽腫サンプルの遺伝子発現プロファイルから、患者の予後と強く相関する遺伝子の抽出とそれを用いた予後予測アルゴリズムの構築を行った。上位 200 個の遺伝子を搭載した神経芽腫予後予測チップを作製し、新規症例 50 例について評価したところ、従来予測が困難であった中間予後群を含めたあらゆる病期において高い予後予測能（約 90%）が示され、本システムを用いたがんの層別化が実際に可能であることが示された。そこで本年度に外科的手術を受けた臨床発見例の神経芽腫についてさらに実用化に向けた試行を進めた。これまでに 40 症例を超える試験を終え、臨床経過との対比検証を行っている。最終的な評価には長期のフォローアップが必要であるが、本年度にテストを行った症例については、概ね本システムの有用性が示されている。本研究ではこのシステムを腎芽腫、肝芽腫その他の小児がんにも広く応用すべく、小児がん特化 DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイリングを順次進行中である。現在までに肝芽腫 80 症例について解析が終了している。肝芽腫についても神経芽腫と同様に 100 症例を超すデータが蓄積された後に詳細な解析を行う予定であるが、現在までのデータを用いた統計的解析から、予後に相関する遺伝子の抽出とそれらを用いた予後の判別が可能であることが示唆された。また、ウィルムス腫瘍については、予後の異なる亜型間を遺伝子発現プロファイル解析により分類することを目的として、約 50 検体のインフォームド Consent 取得済みの組織について病理組織情報の収集と RNA サンプル調製を進めている。来年度もこれらの腫瘍を中心に発現解析を継続し、データの蓄積と臨床情報を用いた統計解析を行うとともに、対象とする遺伝子のさらなる充実も図る計画である。

D. 考察

精度の高い統計解析の実施とそれに続く新しいリス

ク分類の構築には、使用する組織バンクおよびそれに付随するデータバンクがいかに整備されているかが最も重要な因子となる。成人腫瘍に比して症例数の少ない小児がんサンプルは特に貴重である。本研究の再現性の高いチップにより得られたデータを組織に付随する遺伝子発現データ情報バンクとして整備し、様々な臨床情報との相関解析に応用する計画である。

E. 結論

網羅的遺伝子発現プロファイリングに基づいた難治性小児がんの新しい層別化法の開発を目的に、小児がん由来遺伝子の大量収集とチップ化を進めた。これらのチップを用いた小児腫瘍の遺伝子発現解析の結果と、実用化に成功した神経芽腫の診断チップの開発に至るまでのノウハウを組み合わせ、より多くの小児がんについて精度の高い腫瘍リスク分類の構築を目指したい。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.*
9. 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 *BMCCI*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene in press.*
10. 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.*
11. 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

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.

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.

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書

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
分担研究
「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」

分担研究者 熊谷昌明 国立成育医療センター 血液科 医長

研究要旨 近年の治療の進歩により小児がん全体の治癒率は70%を超えるに至った。しかし、残る30%の難治例においては、その治癒を阻害している因子を検討、同定することにより有効な対処法を見出す必要がある。本年度の研究では、これまでわが国では施設毎にまちまちの治療が行われてきた小児ホジキンリンパ腫を対象に、先年に施行されたアンケート調査の結果を解析することで、難治群を見出し、また、過剰と考えられる治療法を修正することで、治癒率の向上と晩期障害の軽減を目的とする治療法について検討した。検討は日本小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）リンパ腫委員会において行われた。現時点では最終決定には至っていないが、基本的な治療法として、最も良好な成績が報告されたドイツのレジメン（OPPA/OEPA+COPP+領域照射）を採用することとし、そこに同レジメンと毒性が重ならない化学療法を加えることで、ドイツ方式の問題点である化学療法のみでの完全寛解率の低さ（照射施行対象の割合の高さ）の改善を求めるものとした。また、わが国のアンケート調査結果で示された予後因子である「発症年齢」および「放射線照射の有無」を治療の層別化に加味することを検討している。

A. 研究目的

小児ホジキンリンパ腫は、近年80%以上に治癒が見込まれる疾患となった。しかし、従来のMOPP/ABVD療法と放射線照射の併用という「成人と同様の治療」では、二次がん、不妊、内分泌障害、心障害等が報告され、また、成長期の小児例では照射部位の変形・成長障害が問題となっている。一方、わが国の小児ホジキンリンパ腫は、欧米と比べて非常に症例数が少なく、これまで統一された治療レジメンが作成されてこなかった。今回、初めて行われた全国をほぼカバーするアンケート調査では、患者背景、治療法、結果において、欧米との相違が明

らかとなり、欧米の治療成績を参考にしつつも、わが国の実態に合わせた治療法を早急に確立することが求められている。本研究では、アンケート調査結果と欧米の標準的治療法の問題点を日本小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）リンパ腫委員会で検討し、わが国における小児ホジキンリンパ腫の新しい治療レジメンについて考察した。

B. 研究方法

東京小児がん研究グループ（TCCSG）、小児白血病研究会（JACLS）、白血病・リンパ腫研究グループ（CCLSG）、九州山口小児が

ん研究グループ (KYCCSG) によって行われた過去のホジキンリンパ腫症例についてのアンケート調査の結果¹⁻³⁾と欧米の報告を検討し、わが国の小児ホジキンリンパ腫の治療プロトコールを作成する。

C. 研究結果

【アンケート調査結果】

1. 対象(表 1)

治療年代は 1985 年～2000 年 (各小児がん研究グループにより異なる)、総症例数 157 例、性別では男児が 107 例と 2/3 以上を占めた。同時期の TCCSG における急性リンパ性白血病登録症例数と比較するとホジキンリンパ腫の発生頻度は急性リンパ性白血病の 20～30 分の 1 であり、わが国の小児ホジキンリンパ腫の発生頻度は欧米の 1/5 程度、年間 15～20 例程度と考えられた。

2. 性・年齢・病期別分布 (表 2)

男児に若年発症が多くみられた。病期別では、stage I と II で約 60%、B 症状は 50 例、32%に認められた。男女別では女児に進行期例がやや多く、また、発症年齢別では 10 歳未満で非進行期例の割合が高かった。

3. 組織型別分布 (表 3)

組織型では、米国⁴⁾・ドイツ⁵⁾からの報告と比べると、NS が少なく、LP、MC の割合が高かった。特に若年発症例にその傾向が強くみられた。組織診断については、現在、中央病理医による確認が進行中である。

4. 治療法の内訳 (表 4)

治療法では、化学療法のみが 54%と半数以上を占めていた。これは、放射線照

射の併用が基本的治療である欧米との大きな違いであった。この非照射の割合には年齢、性、病期について大きな差はなかった。

5. 化学療法の内容 (表 5)

化学療法の組み合わせはさまざまであったが、多くの症例で ABVD あるいは COPP が用いられていた。化学療法の回数は平均 6.8 コース、全体の 80%、非進行期例の 70%で 6 コース以上の化学療法が施行されていた。

6. 治療成績 (表 6、図 1)

調査の時点で生存 147 例、うち治療中 5 例、死亡 10 例、うち 1 例は治療後の麻疹肺炎による非腫瘍死であった。再発あるいは寛解に入らなかった症例は 25 例であった。

全体の粗生存率 (Overall Survival : OS) は 5 年 94.8%、10 年 90.0%、再発と死亡をイベントとした無イベント生存率 (Event Free Survival : EFS) は 5 年 81.5%、10 年 80.2%であった。死亡は 9 年目まで生じていたが、再発のほとんどは 5 年以内であった。再発例の予後については、10 年粗生存率が 56.3%であり、約半数が救済されていなかった。

7. 晩期障害 (表 7)

明らかな晩期障害は 13 例 (8.2%) にみられた。そのうち照射が行われた例が 10 例を占めた。二次癌は 1 例のみであった。

8. 予後因子 (表 8)

予後因子として、病期、B 症状の有無、組織型、年齢、治療年代、巨大腫瘍の有無、照射の有無、化学療法の種類、化学療法のコース数を検討した。そのうち単

変量解析で有意であったものは、症例全体では病期（IIB 以上）、発症年齢（10 歳以上）、B 症状あり、であったが、B 症状については、病期 I~IIA と IIB~IV の 2 群に分けた場合には有意差を認めず、IIB の予後不良を反映したものと考えられた。したがって、以後の検討では B 症状を単独の予後因子としては加えなかった。

多変量解析の結果、症例全体では年齢、病期が有意な予後因子であった。しかし、対象を年齢別に 2 群に分けると、10 歳未

満の群では明らかな予後不良因子は確認されず、一方、10 歳以上の群では性(男)、病期、照射なし、が有意な予後不良因子とされた。このうち照射については、10 歳以上の進行期例で、非照射群の 5 年 EFS : 47.3%、照射群 : 83.6% と非照射群の予後が大きく劣っていた（単変量解析で $p=0.04$ 、多変量解析で $p=0.05$ ）。10 歳未満では逆に非照射群 97.2%、照射群 79.3% と非照射群が優っていた（単変量解析で $p=0.03$ 、多変量解析では $p=0.09$ ）。

表 1 : 調査対象

JACLS	(1990~2000 年)	: 66 例
CCLSG	(1985~2000 年)	: 40 例
TCCSG	(1988~1997 年)	: 39 例
KYCCSG	(1990~2000 年)	: 12 例

症例数 157 例 (男 107 女 50)

年齢 1 歳 8 ヶ月~17 歳 8 ヶ月
(中央値 10 歳 1 ヶ月)

表 2 : 性・年齢・病期別分布

発症年齢	1~4 歳	5~9 歳	10 歳~	計
男	16	40	51	107
女	4	12	34	50
計	20 (13%)	52 (33%)	8 (54%)	157
米国での割合 ⁴⁾	5%	21%	74%	
ドイツでの割合 ⁵⁾	7%	29%	64%	(15 歳以下)
病期	I	II	III	IV
男	27	43	26	11
女	10	19	14	7
~9 歳	21	31	13	7
10 歳~	16	31	27	11
計	37 (24%)	62 (39%)	40 (26%)	18 (11%)

表 3 : 組織型別分布

	NS	MC	LP	LD	NLPHL	その他	計
～94年	27	21	22	4	0	5	79
95年～	29	22	20	1	3	3	78
計	56(36%)	43(27%)	42(27%)	5(3%)	3(2%)	8(5%)	157
男	32(30%)	33(31%)	30(28%)	3(3%)	3(3%)	6(6%)	107
女	24(48%)	10(20%)	12(24%)	2(4%)	0	2(4%)	50
～9歳	12(17%)	29(40%)	26(36%)	2(3%)	0	3(4%)	72
10歳～	44(52%)	14(16%)	16(19%)	3(4%)	3(4%)	5(6%)	85
米国での 割合 ⁴⁾	77%	10%	9%	<1%	—	3%	
ドイツでの 割合 ⁵⁾	65%	24%	10%	<1%	—	<1%	

表 4 : 治療法の内訳

	全病期	病期 I ～IIA	病期 IIB～IV	～9歳	10歳～
化学療法のみ	85 (54%)	42	43	40	45
化学療法+放射線	67 (43%)	38	29	31	36
放射線照射のみ	3 (2%)	3	0	0	3
切除のみ	2 (1%)	2	0	1	1
計	157	85	72	72	85

放射線照射線量：平均 29.7Gy（中央値 30Gy：10～80Gy）

化学療法のコース数：平均 6.8 コース（中央値 6 コース：0～20 コース）

表 5 : 化学療法の内容

	あり	単独	COPP/ABVD	+その他
ABVD	103	21	71(+α：12)	12
COPP(MOPP)	104	17	71(+α：11)	16
A-COPP	16	7	9(+ABVD)	0
COPP/ABV	11	11	0	0
OEPA	5	2	1	2(+COPP)
OPPA	4	2	2	0
その他	4	4	0	0

表 6 : 生存率

	全病期	stage I	stage II	stage III	stage IV
例数	157	37	62	40	18
5年 EFS	81.5%	89.4%	86.4%	74.6%	64.4%
10年 EFS	80.2%	89.4%	82.8%	74.6%	64.4%
5年 OS	94.8%	100%	95.8%	91.5%	88.5%
10年 OS	90.0%	100%	95.8%	75.5%	81.1%

	男 107		女 50	
	~9歳	10歳~	~9歳	10歳~
例数	56	51	16	34
5年 EFS	88.8%	68.1%	86.7%	86.0%
10年 EFS	88.8%	63.2%	86.7%*	86.0%
5年 OS	98.0%	93.3%	93.3%	92.6%
10年 OS	98.0%	84.5%	77.8%*	92.6%

*event 数 : EFS、OS 共に 2、症例 1 : 再発 10 ヲ月、死亡 103 ヲ月、症例 2 : 10 ヲ月で非腫瘍死

表 7 : 晩期障害

観察期間 : 平均 72 ± 4 ヲ月 (± SE)

中央値 66 ヲ月 (1 ~ 233 ヲ月)

二次がん : 1 例 desmoid tumor

晩期障害 : あり 13 例 * なし 134 例 無回答 10 例

局所の変形 : 3 例 斜頸、下顎の發育障害、側弯症

内分泌障害 : 7 例 無月経 2、甲状腺機能低下 2、二次性徴遅延、肥満、不妊

心障害 : 2 例 心筋障害 2

神経障害 : 1 例 両側下肢麻痺

C 型肝炎 : 1 例

*放射線照射 (+) : 10 例 (-) : 3 例 (心筋障害、不妊、二次性徴遅延)