

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・一般・009)

平成18年度 総合・総括研究報告書

主任研究者 秦 順 一

平成19(2007)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	- - - - 17
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に関する研究	- - - - 30
太平美紀	
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	- - - - 37
---------------------	------------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	- - - - 43
-----------------	------------

V. 総合研究報告書	- - - - 59
------------	------------

# I. 総括研究報告書

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 総長

研究要旨:本研究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ことを目的とする。

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の44例での解析が終了した。その結果、本邦例ではH19-DMR高メチル化が有意に低く、染色体異常や原因不明が高い傾向にあり、人種での差異が明確になった。Gorlin症候群の遺伝子変異同定を引き続き行ったが、3例で全エクソン欠損例がみつかった。これら全てに9番染色体長腕の欠失が認められ、切断点配列も明らかにできた。神経芽腫、肝芽腫、ALLで遺伝子異常の網羅的な解析を行ったところ、病態の層別化に資する新たな指標を得た。極めて難治性であるEwing肉腫の発生母地をあきらかにするためヒト骨髄間葉系細胞に、本腫瘍に特異的なキメラ遺伝子を導入する系を確立した。その結果、本腫瘍に特異的な形質が認められるようになった。本腫瘍の発生母地とキメラ遺伝子の機能について示唆的な所見である。

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。特に、小児血液腫瘍について寛解期白血球DNAを連結可能匿名化状態で保存するシステムを今年度から稼働させている

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

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、

#### 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

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倫理委員会で以下の研究について審査が終了し、承認を得ている。①「小児血液腫瘍細胞の増殖機構に関する研究」、②「PTCH遺伝子に関する疾患の解析」③「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」④「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」⑤「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」。「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)が佐賀大学医学部倫理委員会で承認されている。ウイル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肉腫に特異発現するEWSキメラ遺伝子の機能をヒト骨髄間葉系細胞への導入により解析した。代表的なキメラ遺伝子であるEWS/FLI1またはEWS/ERGをテトラトキシンによる発現誘導が可能なコンストラクトを作成し、ヒト骨髄間葉系細胞U-TE13細胞に導入した。テトラトキシンに

よるEWS/FLI1またはEWS/ERGの発現により、U-TE13細胞は形態変化のみならず発現遺伝子パターンもEwing肉腫類似のものとなった。このことからEwing肉腫が間葉系細胞を発生母地としていることが明らかになった。機能性RNAの解析による小児がん治療法開発の可能性を検討するため、siRNAライブラリーを完成させ、抗がん剤タキソールへの耐性獲得に関与する6個の遺伝子を同定した。

#### 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)を44例、散発性ウイルス腫瘍35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(LIT1DMRおよびH19DMR)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)の有無を解析した結果、欧米例と比し本邦例ではH19-DMR高メチル化が有意に低く、染色体異常や原因不明が高い傾向にあった。一般にBWSに合併するウイルス腫瘍ではH19-DMR高メチル化を伴うことが知られているため、本邦のBWSでウイルス腫瘍合併が少ない原因のひとつとして低いH19-DMR高メチル化による可能性が考えられた。一方、散発性ウイルス腫瘍でもH19-DMRの高メチル化が40%認められた。同領域が散発性ウイルス腫瘍でもその発生に密接に関連していることが明らかになった。

昨年度、Gorlin症候群の遺伝子診断で18例中14例にPatched (PTCH) 遺伝子変異を発見した。同症候群については多種類のスプライス異常が検出されるため、それらを効率よく検出できるマイクロアレイを開発し、診断にあたってその有用性をあきらかにできた。本年度、3例で全エクソン欠損例が見つかった。詳細解析の結果、すべてに9番染色体長腕の欠失が検出され、切断点配列も明らかにできた。

#### 3) 小児がんの網羅的遺伝子解析

昨年度までに小児がん特化型DNAチップを完成させ肝芽腫80例、神経芽腫136例の解析を

終了し、神経芽腫ではこのDNAチップの結果が高い予後予測能を示すことを報告した。本年度は、肝芽腫80例についてはアレイCGHによるゲノム構造異常解析もあわせて行った結果、遺伝子異常が殆どない群と頻発する群とに分かれた。それぞれの群と病態を対比させて結果、予後と相関(前者が予後良好群。後者が予後不良群)することが明らかとなった。小児血液腫瘍については、新鮮ALL約200例の500K高密度ゲノムアレイ解析を開始した。解析途中であるが、多数の微小欠損や増幅の集積点が存在することが明らかとなり、この中にはTCR- $\alpha/\delta$  (14q11)、TCR- $\beta$  (7q34)、TCR- $\gamma$  (7q14)のTCR再構成に関係したlocus や、TCL(14q22)等の既知のlocusの他、1q21や10q23等のこれまでに報告がない多数の異常の集積点が確認された。さらに、解析を続行する。

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

昨年度までに複数の小児がん臨床研究グループと連携し、組織・細胞・遺伝子に関する中央診断体制ならびに検体保存体制を国立成育医療センター内に整備した。現在、小児血液腫瘍、神経芽腫、Ewing肉腫、横紋筋肉腫、ウイルス腫瘍について上記活動を実施中である。小児血液腫瘍については患者の寛解期白血球DNAを連結可能匿名化状態で保存するシステムを今年度から稼働させている

#### D. 考察

1) Ewing肉腫は未だ発生母地が不明であるものの、EWS/FLI1等の特異的キメラ遺伝子が高頻度に認められる。キメラ遺伝子そのものの機能解析は十分には進んでいなかったが、今年度の研究で、幼弱な間葉系細胞におけるキメラ遺伝子発現のみでEwing肉腫類似の表現型を獲得させることに成功した。未分化な形質を持つ小児がん全体の特徴を考察する上で重要な所

見と思われる。

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。本年度、腫瘍発生を伴う奇形症候群で本邦例と欧米例でのメチル化状態の差異が腫瘍合併頻度と関連している可能性を示唆する所見を得た。腫瘍発生の機序を考察する上で有用な知見と思われる。

3) 本研究では小児がんに対する網羅的遺伝子発現解析ならびに網羅的遺伝子構造解析が進み、小児がんの病態層別化に重要な知見が得られた。

4) 臨床試験と連携した中央診断と検体保存のシステムは定着した。全国規模の小児AMLの臨床試験もスタートしており、年間約100例の患者検体が収集できると考えられる。また、小児血液腫瘍については寛解期の患者末血白血球DNAを保存するための準備を整えている。これらは副作用を含めた薬剤感受性、二次がん発生、その他体質的な素因等を研究するために用いられる。小児がん患者のDNA Signatureの体系的な保存は新たな治療戦略を考案する上でも重要な情報になると考えられる。

#### 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が整備された。それに基づく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) Maeda, M, Tsuda, A, Yamanishi, S, Uchikoba, Y, Fukunaga, Y, Okita H, Hata, J; Ewing sarcoma/primitive

neuroectodermal tumors of the kidney in a child. *Pediatric Blood and Cancer*. 2006(in press)

2) Hamazaki, M, Okita, H, Hata, J, Shimizu, S, Kobayashi, H, Aoki, K, Nara, T; Desmoplastic small cell tumor of soft tissue: Molecular variant of EWS-WT1 chimeric fusion. *Pathol Int*. 56 : 543-8, 2006

3) Watanabe, N, Nakadate, H, Haruta, M, Sugawara, W, Sasaki, F, Tsunematsu, Y, Kikuta, A, Fukuzawa, M, Okita, H, Hata, J, Soejima, H, Kaneko, Y; Association of 11q loss, trisomy 12 and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor in Wilms tumor. *Genes, Chromosome & cancer*. 45: 592-601, 2006

4) Morimoto A, Ikushima S, Kinugawa N, Ishii E, Kohdera U, Sako M, Fujimoto J, Bessho F, Horibe K, Tsunematsu Y, Imashuku S; Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group. Improved outcome in the treatment of pediatric multifocal Langerhans cell histiocytosis: Results from the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 protocol study. *Cancer*. 107:613-619, 2006.

5) Ishii R, Morimoto A, Ikushima S, Sugimoto T, Asami K, Bessho F, Kudo K, Tsunematsu Y, Fujimoto J, Imashuku S. High serum values of soluble CD154, IL-2 receptor, RANKL and osteoprotegerin in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 47:194-199, 2006.

6) Kiuchi S, Yamada T, Kiyokawa N, Saito T, Fujimoto J, Yasue H. Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues. *Cytogenet Genome Res*. 115:51-61, 2006.

7) Kato I, Manabe A, Aoyama C, Kamiya T,

- Morimoto T, Matsufuji H, Suzuki K, Kitagawa Y, Horii T, Tsurusawa M, Kiyokawa N, Fujimoto J, Hosoya R. Development of diffuse large B cell lymphoma during the maintenance therapy for B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. [Jun 8; Epub ahead of print], 2006.
- 8) Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang WR, Itagaki M, Shiozawa Y, Suzuki K, Sakaguchi S, Ktagiri 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*. 34:508-518, 2006.
- 9) 塩沢裕介, 北村紀子, 竹野内寿美, 田口智子, 大喜多肇, 林泰秀, 小原明, 花田良二, 土田昌宏, 藤本純一郎, 清河信敬. 4カラーデジタルフローサイトメトリーを用いた小児白血病マーカー中央診断の試み. *Cytometry Research*. 16:11-17, 2006.
- 10) 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. 細胞膜マイクロドメイン(ラフト)を免疫原とした抗体作成法. *THE LUNG perspectives*. 14 :220-223, 2006.
- 11) Kosaka T, Miyajima A, Takayama E, Kikuchi E, Nakashima J, Ohigashi T, Asano T, Sakamoto M, Okita H, Murai M, Hayakawa M.: Angiotensin II type 1 receptor antagonist as an angiogenic inhibitor in prostate cancer. *Prostate*. 2007 Jan 1;67(1):41-9
- 12) Uchikawa, H., Toyoda, M., Nagao, K., Miyauchi, H., Nishikawa, R., Fujii, K., Kohno, Y., Yamada, M., and Miyashita, T. (2006) Brain- and heart-specific *Patched-1* containing exon 12b is a dominant negative isoform and is expressed in medulloblastomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349, 277-283.
- 13) Zhang Z, Joh K, Yatsuki H, Wang Y, Arai Y, Soejima H, Higashimoto K, Iwasaka T, Mukai T. Comparative analyses of genomic imprinting and CpG island-methylation in mouse *Murr1* and human *MURR1* loci revealed a putative imprinting control region in mice. *Gene*, 366(1): 77-86, 2006
- 14) Higashimoto K, Soejima H, Saito T, Okumura K, Mukai T. Imprinting disruption of the *KIP2/LIT1* domain: the molecular mechanism causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer. *Cytogenet Genome Res*, 113(1-4): 306-312, 2006
- 15) Satoh Y, Nakadate H, Nakagawachi T, Higashimoto K, Joh K, Masaki Z, Uozumi J, Kaneko Y, Mukai T, Soejima H. Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumors. *Brit J Cancer*, 95(4): 541-547, 2006
- 16) Nakano S, Murakami K, Meguro M, Soejima H, Higashimoto K, Urano T, Kugoh H, Mukai T, Ikeguchi M, Oshimura M. Expression profile of *LIT1/KCNQ1OT1* and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers. *Cancer Science*, 97(11): 1147-1154, 2006
- 17) Yamasaki-Ishizaki Y, Kayashima T, Mapendano CK, Soejima H, Ohta T, Masuzaki H, Kinoshita A, Urano T, Yoshiura KI, Matsumoto N, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Kishino T. Role of DNA methylation and histone H3 Lysine 27 methylation in tissue-specific imprinting of mouse *Grb10*. *Mol Cell Biol*. 27(2):732-742, 2007



- 18) 副島英伸, 太田 亨, 向井常博. 第5章 エピジェネティクスと疾患. 4. インプリンティング関連疾患. 実験医学増刊ゲノムワイドに展開するエピジェネティクス医科学. 中尾光善, 塩田邦郎, 牛島俊和, 佐々木裕之編集, 羊土社, 東京. 24(8): 186-192(1206-1212), 2006
- 19) 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*, 30:351-6, 2006.
- 20) 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.* 15, 1281-5, 2006.
- 21) 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* 25, 1931-42, 2006.
- 22) 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.* 580, 627-32, 2006.
- 23) 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* 25, 5046-55, 2006.
- 24) Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, Nakagawara A, Kaneko M. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 133, 185-92, 2007.
- 25) Oba S, Tomioka N, Ohira M, Ishii S. Combfit: a normalization method for array CGH data. *IPSJ Transactions on Bioinformatics* in press.
- 26) Takenaga K, Nygren J, Zelenina M, Ohira M, Iuchi T, Lukanidin E, Sjoquist M, Kozlova NE. Modified expression of S100A4/Mts1 protein in C6 glioma cells or surrounding astrocytes affects migration of tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Neurobiol Dis* in press.
2. 学会発表
- 1) 川村尚久, 内田 寛, 芦田 明, 玉井 浩, 清河 信敬, 藤本 純一郎.: EHEC 感染後 HUS は早期発見が可能だが、発症した HUS は阻止できず、支持療法が最善である. 第 109 回日本小児科学会学術集会, 金沢. 4 月 21-23 日, 2006.
- 2) 片桐 洋子, 北村 紀子, 竹野内 寿美, 宮川 世志幸, 田口 智子, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬.: デイタージェント不溶性マイクロドメイン/ラフトは効果的な免疫源となりうる. 第 95 回日本病理学会, 東京. 4 月 30 日-2 月 2 日, 2006.

- 3) Miyagawa Y, Okita H, Katagiri YU, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Kiyokawa N.: Identification of the candidate genes involved in the defect of cell regulatory systems in Ewings family tumor. 20th IUMBC International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan. June 18-23, 2006.
- 4) Katagiri YU, Kitamura N, Miyagawa Y, Takenouchi H, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N.: The advantages of using detergent-insoluble microdomains, rafts as immunogens. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan. June 18-23, 2006.
- 5) 宮川 世志幸, 大喜多 肇, 梅澤 明弘, 藤本 純一郎, 秦 順一, 清河 信敬.: ヒト間葉系幹細胞培養系を用いた Ewing 肉腫病態関連候補因子群に関する網羅的解析. 第 65 回日本癌学会総会, 横浜. 9 月 28-30 日, 2006.
- 6) 宮川 世志幸, 大喜多 肇, 梅澤 明弘, 藤本 純一郎, 秦 順一, 清河 信敬.: ヒト間葉系幹細胞培養系による Ewing 肉腫ファミリー腫瘍群発症機構の解析. 第 22 回日本小児がん学会, 大阪. 11 月 24-25 日, 2006.
- 7) 田口 智子, 宮川 世志幸, 今留 謙一, 堀内 保臣, 竹野内 寿美, 大河原 明美, 松井 淳, 北村 紀子, 佐藤 伴, 片桐 洋子, 大喜多 肇, 藤原 成悦, 藤本 純一郎, 清河 信敬.: EBV 感染によってヒト B 細胞に誘導される遺伝子発現の変化の解析. 第 48 回日本小児血液学会学会, 大阪. 11 月 25-26 日, 2006.
- 8) 清河 信敬, 宮川 世志幸, 堀内 保臣, 竹野内 寿美, 田口 智子, 佐藤 伴, 大河原 明美, 片桐 洋子, 大喜多 肇, 藤本 純一郎.: 培養系を用いたヒト造血幹細胞の放射線照射による遺伝子発現の変化の解析. EBV 感染によってヒト B 細胞に誘導される遺伝子発現の変化の解析. 第 48 回日本小児血液学会学会, 大阪. 11 月 25-26 日, 2006.
- 9) 中村 宏紀, 柿島 裕樹, 渡辺 紀子, 大喜多 肇, 松岡 健太郎, 小野田 登, 中川 温子: 神経芽腫における免疫細胞化学的診断—骨髄液を中心として—, 第 47 回日本臨床細胞学会総会, 横浜, 2006 年 6 月
- 10) 新生児期肝疾患における肝内リンパ管の組織学的検討 松岡健太郎, 渡辺紀子, 大喜多 肇, 中川温子 第 26 回日本小児病理研究会, 札幌, 2006 年 9 月
- 11) 腎移植後リンパ増殖性疾患の 2 例 中川温子, 渡辺紀子, 大喜多 肇, 松岡健太郎, 中山真紀子, 飯島一誠 第 26 回日本小児病理研究会, 札幌, 2006 年 9 月
- 12) 難治性横紋筋肉腫への Irinotecan, Nogitecan の使用経験 越野もえ子, 大木健太郎, 関水匡大, 植木英亮, 河野陽一, 大出貴士, 原純一, 秦 順一, 大喜多 肇 第 22 回日本小児がん学会, 大阪, 2006 年 11 月
- 13) ウィルムス腫瘍グループスタディーにおけるコンサルトシステム構築 越永従道, 福澤正洋, 大喜多 肇, 金子安比古, 北野良博, 陳基明, 恒松由記子, 中舘尚也, 野崎美和子, 秦 順一, 樋之津史郎, 堀江弘, 麦島秀雄, 横森欣司 第 22 回日本小児がん学会, 大阪, 2006 年 11 月
- 14) Uchikawa, H., Nagao, K., Toyoda, M., Fujii, K., Kohno, Y., Yamada, M., Miyashita, T. Identification and characterization of the novel human and mouse patched-1 isoform containing exon 12b. An AACR Special Conference in Cancer Research; Cancer Susceptibility and Cancer Susceptibility Syndromes, 2006, 3.1-5, Maui, USA, Poster.
- 15) Nagao, K., Uchikawa, H., Fujii, K.,

- Yamada, M., Miyashita, T. Detecting tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the *PTCH* gene with exon junction microarrays. An AACR Special Conference in Cancer Research; Cancer Susceptibility and Cancer Susceptibility Syndromes, 2006, 3.1-5, Maui, USA, Poster
- 16) Miyashita, T. Spectrum of mutations in the tumor suppressor gene, *patched-1*, in patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. 12th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology 2006, 2006. 6. 6-9, Nara, Japan, Invited Speaker
- 17) Nagao, K., Uchikawa, H., Fujii, K., Yamada, M. Miyashita, T. Modification of the Patched-1 protein by ubiquitin. the 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006. 6. 18-23, Kyoto, Japan, Poster
- 18) Uchikawa, H., Nagao, K., Toyoda, M., Fujii, K., Kohno, Y., Yamada, M., Miyashita, T. Novel brain- and heart-specific patched-1 isoform containing exon 12b has a dominant negative effect on the wild type patched-1. the 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006. 6. 18-23, Kyoto, Japan, Poster
- 19) Miyashita, T., Uchikawa, H., Nagao, K., Toyoda, M., Fujii, K., Kohno, Y., Yamada, M. The dominant negative isoform of *patched-1* containing exon 12b generated by alternative splicing EMBO Workshop on Hedgehog-Gli Signaling in Cancer and Stem Cells, 2006. 9.30-10.4, Rome, Italy,
- Poster
- 20) Soejima H., Sasaki K, Higashimoto K, Joh K, Niikawa N, Mukai T: Different incidence of epigenetic and genetic alterations between Japanese and Caucasian patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. 11th International Congress of Human Genetics, Brisbane, Australia, 2006. 8. 6-10.
- 21) 春田雅之, 中舘尚也, 渡辺直樹, 福澤正洋, 副島英伸, 金子安比古: Wilms腫瘍における *IGF2* の loss of imprinting (LOI) と *WT1* 構造異常. 第 65 回日本癌学会学術総会 2005. 9. 28.-30. 横浜
- 22) 副島英伸, 佐々木健作, 東元 健, 新川 詔夫, 向井常博: Beckwith-Wiedemann 症候群本邦例の包括的解析. 日本人類遺伝学会第 51 回大会 2006.10.17.-20. 米子
- 23) 中野星児, 村上和弘, 目黒牧子, 副島英伸, 東元 健, 浦野健, 久郷裕之, 向井常博, 池口正英, 押村光雄: 大腸がんにおける刷り込み遺伝子 *LIT1/KCNQ1OT1* の発現状態と KvDMR1 のエピジェネティクス. 日本人類遺伝学会第 51 回大会 2006.10.17.-20. 米子.
- 24) Soejima H., Sasaki K, Higashimoto K, Yatsuki H, Joh K, Niikawa N, Mukai T: Different incidence of some epigenetic and genetic alterations between Japanese and Caucasian patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. International Genomic Imprinting Workshop 2006, Tokyo, Japan, 2006.11.30-12.1.
- 25) 田中正視, 及川恒輔, 黒田雅彦 定量的 real time PCR における内在コントロール遺伝子による標準化は常に定量的か?

- 日本分子生物学会 2006 フォーラム 名古屋 2006 年 12 月
- 26)徐 明利、高梨正勝、及川恒輔、黒田雅彦 siRNA ライブラリーを用いたパクリタキセル感受性分子の単離と解析 日本分子生物学会 2006 フォーラム 名古屋 2006 年 12 月
- 27)及川恒輔、高梨正勝、田中正視、秋好歩美、黒田雅彦 様々な特異的 siRNA の抗腫瘍効果の検討 日本分子生物学会 2006 フォーラム 名古屋 2006 年 12 月
- 28)水谷隆之、及川恒輔、黒田雅彦 がん治療のための核酸医薬品とそのDDS 第 16 回アンチセンスシンポジウム 京都 2006 年 11 月
- 29)黒田雅彦、水谷隆之、及川恒輔、高梨正勝、工藤玄恵、向井 清 パイオインフォマティクスと機能性RNA 第 52 回日本病理学会秋期特別総会 和歌山 2006 年 11 月
- 30)Kawaura H, Fujita M, Hattori W, Someya H, Sano T, Tabuse Y, Miyazaki K, Minagawa H, Kuroda M, Kamijo K : Two-dimensional Mapping (pI and m/Z) of Human Serum Using Microchips Combined with MALDI-TOF-MS HUPO 5th Annual World Congress, Long Beach, California, USA, October 28th to November 1st 2006
- 31)及川恒輔、高梨正勝、黒田雅彦 粘液型脂肪肉腫における DOL54 を標的分子とした分子治療の可能性 第 65 回日本癌学会 学術総会 横浜、2006 年 9 月
- 32)徐明利、高梨正勝、及川恒輔、黒田雅彦 siRNA ライブラリーを用いたパクリタキセル感受性分子の単離 第 65 回日本癌学会 学術総会 横浜、2006 年 9 月
- 33)高梨正勝、及川恒輔、黒田雅彦 脂肪細胞分化におけるクロマチン制御分子の役割 第 65 回日本癌学会学術総会 横浜、2006 年 9 月
- 34)Kuroda M, Oikawa K. siRNA applications for gene therapies. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 2006
- 35)Oikawa K, Ohbayashi T, Takanashi M, Akiyoshi A and Kuroda M. Characterization of the hWAPL gene that has oncogenic characteristics. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 2006
- 36)Morikawa, A., Kudo, A., Kuroda, M., Tsuji, M., M., Higashi, N., Kawakami, H., and Irimura, T. Cloning and analysis of three CRD-type MGLs expressed in germ cells. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 2006
- 37)Fujita M, Hattori W, Someya H, Sano T, Tabuse Y, Miyazaki K, Minagawa H, Kuroda M, Kawaura H, Kamijo K Two-dimensional mapping (pI and m/Z) of human serum by combining microchip and MALDI-TOF-MS American Society for Mass Spectrometry Seattle, Washington, USA, May 2006
- 38)藤田 真知子、服部 渉、染谷 浩子、佐野 亨、田伏 洋、宮崎 賢司、皆川 宏貴、黒田 雅彦、川浦 久雄、上條 憲一 : 等電点分離チップと MALDI 質量分析計の統合シスによる未調整ヒト血清のハイスループット二次元解析 日本ヒトプロテオーム機構 第4回 大会 東京、2006 年 7 月
- 39)及川恒輔、黒田雅彦、高梨正勝、吉田恵一、秋好歩美、向井 清 : 必須遺伝子 hWAPL のスプライスバリエントの解析 第 95 回日本病理学会 東京、2006 年 4 月
- 40)徐 明利、黒田雅彦、高梨正勝、吉田恵一、及川恒輔、加賀谷伸治、小杉好紀、工藤玄恵 : 子宮内膜症の指標となる HRF の測定

- 系の開発と診断・治療への応用 第 95 回日本病理学会、東京、2006 年 4 月
- 41) 黒田雅彦、及川恒輔、高梨正勝、吉田恵一、秋好歩美、松崎正晴、向井 清: 子宮頸部悪性病変におけるhWAPL遺伝子と病期との関連 第 95 回日本病理学会 東京、2006 年 4 月
- 42) 高梨正勝、黒田雅彦、及川恒輔、吉田恵一、向井 清: 脂肪細胞分化におけるクロマチン制御分子の役割 第 95 回日本病理学会 東京、2006 年 4 月
- 43) 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 95 回日本病理学会 東京、2006 年 4 月
- 44) 大平美紀、大羽成征、中村洋子、磯貝恵理子、平田隆洋、吉田安子、瀧岡美佐、石井 信、中川原 章  
「Gene expression profiling to predict the prognosis of neuroblastoma and its application to a diagnostic microarray of clinical use」ポスター  
第 97 回米国癌学会総会 (American Association for Cancer Research 97th Annual Meeting (AACR)) 2006、ワシントン DC、2006.4.3.
- 45) 大平美紀、大羽成征、中村洋子、磯貝恵理子、平田隆洋、吉田安子、瀧岡美佐、石井 信、中川原 章  
「Practical application and validation of a microarray-based diagnostic system for aiming at the new risk classification of neuroblastoma」口演  
国際神経芽腫学会 2006(Advances in Neuroblastoma Research (ANR) 2006) 12th conference、ロサンゼルス、2006.5.19.
- 46) 大平美紀、大羽成征、中村洋子、磯貝恵理子、好田忠行、吉田安子、瀧岡美佐、石井 信、中川原 章  
「神経芽腫のカスタム化予後予測ミニチップの clinical validation: 48 症例の検討」口頭発表  
第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006.9.30.
- 47) 大平美紀、大羽成征、中村洋子、磯貝恵理子、好田忠行、瀧岡美佐、吉田安子、石井 信、中川原 章  
「神経芽腫の DNA ミニチップに基づいた新しい診断法の開発と clinical validation」ポスター  
第 22 回日本小児がん学会学術総会、大阪、2006.11.24.
- 48) 森川信行、黒田達夫、本名敏郎、熊谷昌明、北野良博、渡邊宏治、寺脇幹、正木英一: 当院における神経芽腫 stage III 症例 23 例の検討. 日本小児血液学会雑誌 20:383, 2006
- 49) 清谷知賀子、塩田曜子、崎山美知代、森鉄也、本名敏郎、黒田達夫、正木英一、松岡健太郎、中川温子、熊谷昌明: TEPA+L-PAM による大量化学療法を行った stage4 神経芽細胞腫の 8 例. 日本小児血液学会雑誌 20:378, 2006
- 50) 大木健太郎、越野もえ子、伊藤久美子、植木英亮、落合秀匡、角田治美、沖本由理、堀江弘、熊谷昌明: OEPA, COPP, ABVD 各 2 クール施行後、放射線治療併用を計画して治療を行ったホジキンリンパ腫の 2 例. 日本小児血液学会雑誌 20:429, 2006
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## II. 分担研究報告書

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

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。本年度、中央病理診断が期待通りの運用がなされているか否かを検証するため、日本横紋筋肉腫研究グループ（JRSG）と日本ウイルス腫瘍研究グループ（JWiTS）に関して解析した。その結果、治療法の選択に重大な影響を与える診断の相違が横紋筋肉腫では20数%、ウイルス腫瘍で10数%認められた。施設病理医に対する小児がんの病理診断の啓蒙、標準化が必要であることが明らかとなった。中央診断に送られてきた検体の余剰分を組織バンクに保存する試みは順調に運用されている。既にこれら検体を用いる研究が申請され承認された。

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おいた。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。病理学的診断ととも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1月27日承認）、

「東京小児がん研究会（TCCSG）における白血球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）および日本ウイルス腫瘍スタディーグループにおける中央病理診断及び分子遺伝学的研究（受付番号 299）」（申請者：大喜多 肇）の審査も今年度承認された

C. 研究結果および考察

ウイルス腫瘍、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既に確立され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、日本ウイルス腫瘍スタディーグループ（JWiTS）、日本横紋筋肉腫研究グループ（JRSG）、日本ユーイング肉腫研究グループ（JESS）、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である。

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。また、JWiTSにおいては本邦のウィルムス腫瘍の分子遺伝学的な特異性を明らかにするためWT1遺伝子の変異を解析している。

JRSGでは発足時から2006年12月31日までに中央病理診断に登録された症例は72例である。そのうち41例は遺伝子解析用の凍結検体が提供された。72例のうち13例は横紋筋肉腫が否定された。59例の横紋筋肉腫のうち32例が胎児型、24例が胞巣型であった。その他、混合型2例、亜型分類不能1例であった。胞巣型24例中20例でキメラ遺伝子PAX3/7-FKHRの同定が試みられた。キメラ遺伝子が同定されたのは18例であった。胎児型は21例で遺伝子解析が行われたがキメラ遺伝子は検出されなかった。PAX3/7-FKHRの同定が予後の悪い胞巣型横紋筋肉腫の確定診断に極めて有力な手段であることが明らかとなった。施設診断と中央病理診断との不一致率は72例中16例(22%)と高率であった。そのうち胞巣型を施設診断で胎児型と診断したのが7例あり、予後の悪い亜型の不一致率が高かった。施設診断で横紋筋肉腫とした8例が横紋筋肉腫以外の腫瘍であった。今後、診断の標準化に向け施設病理医とのより密接な関連が必須である。なお、余剰検体を横紋筋肉腫の生物学的特異性や新たな診断・治療法の開発を行うトランスレーショナルリサーチのソースとして活用する組織バンクに関して、本年度2件の研究申し込みがあり、研究審査委員会ならびに研究委員会で審査され検体の使用が承認された。

JWiTSでは本年度41例が登録されたが、中央病理診断に検体が送られたのは33例(80.4%)であった。全例中央病理診断を施行できなかったことは極めて遺憾である。33例中20例が腎芽腫、腎芽型であった。腎明細胞肉腫が5例(15%)であり、NWTSなどの報告に比し明らかに高率であった。JWiTSでも

明らかに治療法が異なる肉腫型(腎ラブドイド腫瘍、腎明細胞肉腫)について施設病理診断との不一致が10数%認められた。

診断確定後の余剰検体を国立成育医療センター研究所で保存するシステムは前年度に引き続き運用されている。

#### 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須である。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が運営されているが、本年度詳細に検討した横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍では、いずれでも施設診断と中央病理診断との間に、看過できないほどの不一致をみた。今後小児がん全体の病理診断の標準化を行う必要があることが明確になった。なお、横紋筋肉腫の中央診断にキメラ遺伝子の導入を世界に先駆けて取り入れた。より予後の悪い胞巣型の確定診断に有力な手段である。

#### E. 結論

- 1) 昨年度までに確立した小児がんに対する病理中央診断システムをは順調に運用されている。施設診断と中央診断との間で治療の選択にクリティカルな診断の差異が認められた。
- 2) 中央診断に遺伝子診断の導入を図っているが、確定診断に極めて有用であることが明らかとなった

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1, Maeda, M, Tsuda, A, Yamanishi, S, Uchikoba, Y, Fukunaga, Y, Okita H, Hata, J: Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumors of the kidney in a child. *Pediatric Blood and Cancer* (in press)



2, Hamazaki, M, Okita, H, Hata, J, 592-601, 2006

Shimizu, S, Kobayashi, H, Aoki, K, Nara, T; Desmoplastic small cell tumor of soft tissue: Molecular variant of EWS-WT1 chimeric fusion. Pathol Int. 56:543-8, 2006

2. 学会発表  
省略

3, Watanabe, N, Nakadate, H, Haruta, M, Sugawara, W, Sasaki, F, Tsunematsu, Y, Kikuta, A, Fukuzawa, M, Okita, H, Hata, J, Soejima, H, Kaneko, Y: Association of 11q loss, trisomy 12 and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor in Wilms tumor. Genes, Chromosome & cancer 45:

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 ALL のマーカー中央診断と検体保存を行い、デジタル4カラーフローサイトメトリーによる MRD 検出が、治療早期の芽球消失率の確認に有用であることを確認し、その予後判定における有用性について検討を行った。高感度アレイ CGH によるゲノム構造解析が小児 T-ALL のゲノム異常の解析に有用であることが明らかにし、多数のゲノム構造異常の集積点が存在することを明らかにした。

### 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について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やゲノム構造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し、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、 $2 \times 10^5$  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。

高感度アレイ CGH によるゲノム構造解析：過去に液体窒素中に凍結保存した T-ALL 患児計 10 例の末梢血あるいは骨髄血から分離した白血病細胞より Dneasy 抽出キットを用いてゲノム DNA を抽出した。この DNA に対して、Agilent 社の高感度アレイ CGH を用いてゲノム構造解析を行い、専用のソフトウェアによる解析を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 小児血液腫瘍のマーカー中央診断と検体保存

昨年度に引き続き、東京都小児がん研究グループの急性リンパ性白血病(ALL)のマーカー中央診断と検体保存を行った。155 例の登録症例のうち、151 例(97.4%)の検体送付があり、このうち150例(96.7%)のマーカー診断と検体保存を行った。このうち、127 例が前駆 B 細胞性 ALL、1 例が成熟 B-ALL、19 例が T-ALL、1 例が分類不能 ALL、2 例が AML であった。このうち、前駆 B 細胞性 ALL 症例10例に対して、治療開始 15 日目、29 日目、43 日目の骨髄での残存白血病細胞(MRD)検出をデジタル4カラーフローサイトメトリーによって行ったところ、症例によって芽球消失率に差があり、15 日目、29 日目で芽球の微小残存を認める症例が一部存在することが明らかになった。

#### 2. 高感度アレイ CGH によるゲノム構造解

析：T-ALL、10例のゲノム構造解析を行った結果、多数の微小欠損や増幅の集積点が存在することが明らかとなった。この中には TCR- $\alpha/\delta$  (14q11)、TCR- $\beta$  (7q34)、TCR- $\gamma$  (7q14) の TCR 再構成に関係した locus や、TCL(14q22)等の既知の locus の他、1q21 や 10q23 等のこれまでに報告が無い多数の異常の集積点が確認された。

#### D. 考察

##### 1. 小児血液腫瘍のマーカー中央診断と検体保存：

昨年度に引き続き、小児 ALL の治療研究におけるマーカー中央診断、検体保存を実施し、MRD 検出のパイロットスタディーを行った。今後、さらに症例を増やすとともに、MRD 検出に関しては各症例の治療経過との比較解析を行うことにより、治療初期における芽球残存率と予後との関係について検討を行い、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。

2. 高感度アレイ CGH によるゲノム構造解析：T-ALL、10例のゲノム構造解析を行った結果、多数の異常の集積点が認められ、この中には TCR- $\alpha/\delta$  (14q11)、TCR- $\beta$  (7q34)、TCR- $\gamma$  (7q14) の TCR 再構成に関係した locus や、TCL(14q22)等の既知の locus が含まれていることは、検査の感度や信頼性が十分であることを示唆している。さらに、1q21 や 10q23 等のこれまでに報告がない異常の集積点の中には、未知の T-ALL に特徴的なゲノム遺伝子の異常が含まれている可能性があり、さらに解析を進めている。今後の研究の進展によって、病態解明や、診断、予後判定法への応用が期待される。

#### E. 結論

小児 ALL のマーカー中央診断と検体保存を行い、デジタル4カラーフローサイトメトリーによる MRD 検出が、治療早期の芽球消失率の確認に有用であることを確認した。今後、その予後判定における有用性について検討を行う。また、高感度アレイ CGH によるゲノム構造解析が小児 T-ALL のゲノム異常の解

析に有用であることが明らかにした。今後さらにその解析を進めて、同 ALL のゲノム構造異常の特性を明らかにして行く。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Morimoto A, Ikushima S, Kinugawa N, Ishii E, Kohdera U, Sako M, Fujimoto J, Bessho F, Horibe K, Tsunematsu Y, Imashuku S; Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group. Improved outcome in the treatment of pediatric multifocal Langerhans cell histiocytosis: Results from the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 protocol study. *Cancer*. 107:613-619, 2006.

2) Ishii R, Morimoto A, Ikushima S, Sugimoto T, Asami K, Bessho F, Kudo K, Tsunematsu Y, Fujimoto J, Imashuku S. High serum values of soluble CD154, IL-2 receptor, RANKL and osteoprotegerin in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 47:194-199, 2006.

3) Kiuchi S, Yamada T, Kiyokawa N, Saito T, Fujimoto J, Yasue H. Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues. *Cytogenet Genome Res*. 115:51-61, 2006.

4) Kato I, Manabe A, Aoyama C, Kamiya T, Morimoto T, Matsufuji H, Suzuki K, Kitagawa Y, Hori T, Tsurusawa M, Kiyokawa N, Fujimoto J, Hosoya R. Development of diffuse large B cell lymphoma during the maintenance therapy for B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. [Jun 8; Epub ahead of print], 2006.

5) Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang WR, Itagaki M, Shiozawa Y, Suzuki K, Sakaguchi S, Ktagiri 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*. 34:508-518, 2006.

6) 塩沢裕介, 北村紀子, 竹野内寿美, 田口智子, 大喜多肇, 林泰秀, 小原明, 花田良二, 土田昌宏, 藤本純一郎, 清河信敬. 4カラーデジタルフローサイトメトリーを用いた小児白血病マーカー中央診断の試み. *Cytometry Research*. 16:11-17, 2006.

7) 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. 細胞膜マイクロドメイン(ラフト)を免疫原とした抗体作成法. *THE LUNG*

perspectives. 14 :220-223, 2006.

## 2. 学会発表

- 1)川村尚久, 内田 寛, 芦田 明, 玉井 浩, 清河 信敬, 藤本 純一郎.: EHEC 感染後 HUS は早期発見が可能だが、発症した HUS は阻止できず、支持療法が最善である. 第 109 回日本小児科学会学術集会, 金沢. 4 月 21-23 日, 2006.
- 2)片桐 洋子, 北村 紀子, 竹野内 寿美, 宮川 世志幸, 田口 智子, 大喜多 肇, 藤本 純一郎, 清河 信敬.: デイタージェント不溶性マイクロドメイン/ラフトは効果的な免疫源となりうる. 第 95 回日本病理学会, 東京. 4 月 30 日-2 月 2 日, 2006.
- 3)Miyagawa Y, Okita H, Katagiri YU, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Kiyokawa N.: Identification of the candidate genes involved in the defect of cell regulatory systems in Ewings family tumor. 20th IUMBC International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan. June 18-23, 2006.
- 4)Katagiri YU, Kitamura N, Miyagawa Y, Takenouchi H, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N.: The advantages of using detergent-insoluble microdomains, rafts as immunogens. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan. June 18-23, 2006.
- 5)宮川 世志幸, 大喜多 肇, 梅澤 明弘, 藤本 純一郎, 秦 順一, 清河 信敬.: ヒト間葉系幹細胞培養系を用いた Ewing 肉腫病態関連候補因子群に関する網羅的解析. 第 65 回日本癌学会総会, 横浜. 9 月 28-30 日, 2006.
- 6)宮川 世志幸, 大喜多 肇, 梅澤 明弘, 藤本 純一郎, 秦 順一, 清河 信敬.: ヒト間葉系幹細胞培養系による Ewing 肉腫ファミリー腫瘍群発症機構の解析. 第 22 回日本小児がん学会, 大阪. 11 月 24-25 日, 2006.
- 7)田口 智子, 宮川 世志幸, 今留 謙一, 堀内 保臣, 竹野内 寿美, 大河原 明美, 松井 淳, 北村 紀子, 佐藤 伴, 片桐 洋子, 大喜多 肇, 藤原 成悦, 藤本 純一郎, 清河 信敬.: EBV感染によってヒトB細胞に誘導される遺伝子発現の変化の解析. 第48回日本小児血液学会学会, 大阪. 11月25-26日, 2006.
- 8)清河 信敬, 宮川 世志幸, 堀内 保臣,

竹野内 寿美, 田口 智子, 佐藤 伴, 大河原 明美, 片桐 洋子, 大喜多 肇, 藤本 純一郎.: 培養系を用いたヒト造血幹細胞の放射線照射による遺伝子発現の変化の解析. EBV 感染によってヒト B 細胞に誘導される遺伝子発現の変化の解析. 第 48 回日本小児血液学会学会, 大阪. 11 月 25-26 日, 2006.

## 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