

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、同腫瘍の発生母地と想定される骨髄間質細胞にコンディショナルに Ewing 肉腫特異的キメラ遺伝子を発現する Ewing 肉腫発症モデル系を作製した。本培養系では、キメラ遺伝子発現に伴って骨髄間質細胞の形態、発現プロファイルが Ewing 肉腫様に変化した。これらの結果からキメラ遺伝子が骨髄間質細胞に Ewing 肉腫様の性質を与えることが明らかとなった。更に、本培養系を利用してキメラ遺伝子によって発現を調節される標的遺伝子の候補を多数、同定した。本培養系は、Ewing 肉腫の発症メカニズム解明、新規治療法開発の上で有用であると考えられた。

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と考えられる。そこで、本年度は、Ewing 肉腫特異的キメラ遺伝子とその発生母地と想定される骨髄間質細胞に発現させ、機能を解析すること、それによって新たな治療標的分子を探索することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

Ewing 肉腫におけるキメラ遺伝子の機能を詳細にするために、Ewing 肉腫の発生母地と想定される未熟な間葉系細胞である U-ET13 細胞と tetracycline repressor (tetR) を用いた誘導発現系を作

製した。まず、U-ET13 細胞（骨髄間質由来細胞）へ tetR ベクターを導入し、U-ET13/TR 細胞を樹立し、tetracycline operon 制御下に遺伝子発現が調節されることを確認した。さらに tetracycline operon 制御下に Ewing 肉腫特異的キメラ遺伝子（EWS/FLI1 あるいは EWS/ERG）を発現する発現ベクターを導入したクローン（U-ET13/TR/EWS/FLI1, U-ET13/TR/EWS/ERG、各 10 個）を得た。

上記細胞に tetracycline を添加し、時間経過を追って（24 時間、48 時間、72 時間、96 時間）、形態変化を観察した。また、細胞の増殖を MTT 法で、細胞死の有無をフローサイトメトリーによる DNA index 測定、細胞の Annexin-V 結合能の測定によって解析した。更に tetracycline 添加後、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間の検体より RNA を抽出し、Gene Chip U133 2.0 (Affymetrix) にて発現プロファイルを決定した。さらにその発現プロファイルを GeneSpring (Silicon Genetics) にて解析し、EWS/ETS 発現に伴って発現が上昇する遺伝子、減少する遺伝子を同定した。一部の遺伝子に関して定量的 RT-PCR 法にて、遺伝子発現の変動を確認した。また、EWS/ETS 発現誘導後 72 時間目の細胞を用いてフローサイトメトリーによってこれらの遺伝子の細胞表面マーカーの発現を

検討した。

上記 U-ET13/TR/EWS/FLI1 細胞, U-ET13/TR/EWS/ERG 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、マウスに tetracycline を投与することによりキメラ遺伝子の発現を誘導し、腫瘍形成の有無を検討した。また、上記細胞の Soft agar 上での colony 形成能を検討した。

(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。

### C. 研究結果

骨髄間質細胞である U-ET13 細胞に EWS/ETS キメラ遺伝子を発現させたところ、キメラ遺伝子発現に伴って、U-ET13 細胞は、大型紡錘形の間葉系細胞の形態から、小型、類円形ないし短紡錘形の Ewing 肉腫に類似した形態に変化した。さらに、同細胞の発現プロファイル検討により、約 700 個の EWS/FLI1、EWS/ERG に共通して発現が誘導される遺伝子群を同定した。その中には、過去に我々のグループあるいは他のグループがキメラ遺伝子の標的であることを示してきた Id2、Nkx2.2 などの遺伝子が含まれていたが、その他に今までに知られていない EWS/ETS 遺伝子の標的遺伝子が含まれていると考えられた。さらに、昨年度に解析した Ewing 肉腫やその他の小児固形腫瘍の発現プロファイルを比較することにより、Ewing 肉腫に特異的であり、かつ、EWS/ETS によって発現が誘導される遺伝子約 400 個が同定された。また、主成分分析を行ったところ U-ET13 細胞の発現パターンが Ewing 肉腫に近づく傾向が認められた。

フローサイトメトリーによる細胞表面抗原検討により、骨髄間質細胞に発現する CD10 や CD13 などの発現低下とともに、Ewing 肉腫に発現する CD117 や CD271 の発現上昇が観察された。細胞表面抗原発現も骨髄間質細胞から Ewing 肉腫細胞の発現パターンに近づく傾向が認められた。

一方、U-ET13/TR/EWS/FLI1 細胞, U-ET13/TR/EWS/ERG 細胞をヌードマウスの皮

下に移植しキメラ遺伝子の発現を誘導したが、明らかな腫瘍形成は認めなかった。また、同細胞は、Soft agar 上のコロニー形成も認めなかった。これらの結果から、EWS/FLI1、EWS/ERG キメラ遺伝子のみでは U-ET13 細胞のトランスフォームには不十分であることが示唆された。

### D. 考察

本年度の研究結果より、EWS/FLI1、EWS/ERG キメラ遺伝子が、骨髄間質細胞に Ewing 肉腫に類似した形質（形態、遺伝子、蛋白発現プロファイル）を与えることが示された。このことから Ewing 肉腫の形質は、腫瘍の発生母地が有する形質に加えてキメラ遺伝子によって与えられることが示唆された。

本培養実験系は、発現プロファイルの観点からも Ewing 肉腫の発生初期過程を模倣すると思われ、Ewing 肉腫発症モデル系として利用することが可能と考えられる。また、この培養系を用いて EWS/ETS によって発現を調節される EWS/ETS の標的分子の候補を約 400 個、同定することができた。その中には既知の標的遺伝子が多く含まれると共に、新規の標的遺伝子の候補が含まれていた。これらは、新規診断マーカー、新規治療標的として応用できる可能性があり、今後、解析を進める予定である。

一方、Ewing 肉腫に特徴的なキメラ遺伝子は、骨髄間葉系細胞をトランスフォームすることができなかった。今までに EWS/ETS がマウス由来の間葉系細胞株をトランスフォームするという報告はあるものの、EWS/ETS のみでヒトの正常細胞をトランスフォームしたとの報告はない。これらのことを考え合わせるとキメラ遺伝子は、腫瘍発生に必要なが、十分ではないことが示唆される。したがって、EWS/ETS 以外にも Ewing 肉腫発症に必要な遺伝子異常が存在すると考えられる。

### E. 結論

骨髄間質細胞と tetracycline 誘導発現系を用いて Ewing 肉腫発症モデル培養系

を作製した。本培養系の解析により EWS/ETS キメラ遺伝子が骨髄間質細胞に Ewing 肉腫様の形態と細胞表面分子発現パターンを与えることが明らかになった。更に、網羅的発現プロファイル解析により骨髄間質細胞の遺伝子発現パターンが Ewing 肉腫様の発現パターンに変化することが明らかになった。更に本培養系を用いて、約 400 個の EWS/ETS 標的分子の候補を同定し、その中には既知の標的遺伝子が多く含まれると共に、新規の標的遺伝子の候補が含まれていた。今後、これらを更に解析することによりニューイング肉腫の病態が更に明らかになると期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) M Maeda, A Tsuda, S Yamanishi, Y Uchikoba, Y Fukunaga, H Okita, J Hata Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney in a child *Pediatric Blood and Cancer*, 2006 Mar 16 Epub ahead of print
- 2) N Watanabe, H Nakadate, M Haruta, W Sugawara, F Sasaki, Y Tsunematsu, A Kikuta, M Fukuzawa, H Okita, J Hata, H Soejima, Y Kaneko. Association of 11q loss, trisomy 12, and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Jun;45(6):592-601.
- 3) 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*. 2006 Apr;34(4):508-18
- 4) M Hamazaki, H Okita, J Hata, S Shimizu, H Kobayashi, K Aoki, T Nara. Desmoplastic small cell tumor of soft tissue: Molecular variant of EWS-WT1 chimeric fusion.

*Pathol Int*. 2006 Sep;56(9):543-8.

- 5) 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
- ## 2. 学会発表
- 1) Y Miyagawa, H Okita, Y Katagiri, A Umezawa, J Hata, J Fujimoto, N Kiyokawa, Identification of the candidate genes involved in the defect of cell regulatory systems in Ewings family tumor. 20<sup>th</sup> IUMBC International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, June, 2006, Kyoto, Japan
  - 2) 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
  - 3) 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 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 第 65 回日本癌学会総会、横浜、9 月、2006 年
  - 4) 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
  - 5) 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
  - 6) 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

7) 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  
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 第 22 回  
日本小児がん学会、大阪、2006年11月

8) 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、  
中館尚也、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

#### 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

我々は以前より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）の遺伝子解析を行ってきたが、依然一部の症例で変異が見出されない現状にある。今年度はこれらの症例及び染色体異常を伴う NBCCS 症例で責任遺伝子 *PTCH* の欠損の可能性を新たな方法を用いて解析した。まず multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法で *PTCH* 各エクソンの欠損をみたところ、3 症例で全エクソンの欠損が見出された。引き続き高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて欠損の範囲を解析したところ、165 kb から 11 Mb にわたる様々な範囲で *PTCH* を含む 9 番染色体長腕の欠失が検出された。このデータをもとに、3 例全例で染色体切断点のクローニングに成功した。

### 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。我々は以前より母斑基底細胞癌症候群 NBCCS の遺伝子解析を行ってきたが、依然一部の症例で変異が見出されない現状にある。本年度は責任遺伝子 *PTCH* に変異の認められなかった 5 例と、染色体異常を伴う NBCCS の 2 例について *PTCH* の欠損の可能性を考えて新たな方法を用いて解析した。

### B. 研究方法

MLPA 法は MRC-Holland b.v. 社の試薬とプロトコルを用いて必要に応じて修正を加えながら行った。FISH 法は患者血液から EB ウイルスを用いて樹立したリンパ芽球細胞株を用いて行った。*PTCH* を含むプローブは Invitrogen から購入した BAC クローン RP11-163C13 をニックトランスレーション法で蛍光標識 (Spectrum Green) したものをを用いた。同じ 9 番染色体上のコントロールプローブとして Spectrum Red 標識のセントロメアプローブ CEP9 (Abbott 社) をを用いた。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡で解析した。高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる解析は東京大学先端科学技術研究センターとの共同研究で行った。患者由来高分子 DNA を NspI で消

化後、アダプターのライゲーションと蛍光標識を行い、Affimetrix 社製のコピー数解析用オリゴヌクレオチドマイクロアレイ (130 万プローブを搭載、プローブ間の中央値 776 bp、平均値 2,253 bp) とハイブリダイゼーションを行った。マイクロアレイのデータから染色体の切断点を推測し、複数の PCR 用のプライマーを設計した。これらを用いて複数の PCR 反応を行い、PCR 産物の塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

NBCCS 症例のうち、通常の PCR シークエンス法で責任遺伝子 *PTCH* に変異の認められなかった 5 例と、染色体異常を伴う NBCCS の 2 例について、まず MLPA 法でエクソンの欠失

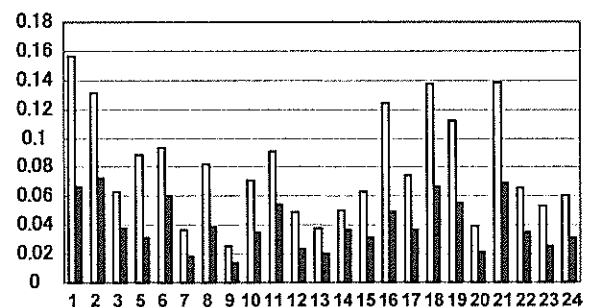


図1 G5で見出されたPTCH全エクソンの欠損

の可能性を解析したところ、前者の1例(G19)、後者の2例(G5、G10)でPTCH全エクソンの欠失が認められた(図1)。この領域の欠失はFISH法を用いても確認された。これら3例につき高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて欠損の範囲を解析したところ、G19には約165 kbからなるPTCH遺伝子のみを含む欠損が、G5、G10にはPTCH以外に数多くの遺伝子を含むそれぞれ約11 Mb、5 Mbの欠

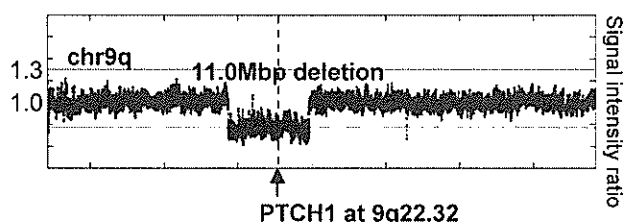


図2 G5で見出された11 Mbの遺伝子欠損

損があることがわかった(図2)。更に、マイクロアレイのデータに基づき long PCR で染色体の切断点を決定した。G19はAlu配列の最後の部分とそれに続くポリAの部分で相同組換えが起こっており、G5、G10ではnon-homologous end-joiningによりゲノムの欠失がおきていることが示唆された。またNBCCSが疑われるG19の母親からもG19と全く同じ欠失が認められた。

#### D. 考察

現在までに染色体異常を伴うNBCCSは数例しか報告がなく、今回のように詳細に欠損範囲について解析した例はない。またPTCH遺伝子のみを欠失したNBCCS症例(G19)は未報告であり、貴重な症例である。他の2例(G5、G10)は精神発達遅滞、筋緊張低下、痙攣等、NBCCSには通常認められない所見を有しており、これらは隣接遺伝子の欠失によるものと考えられる。

G5ではPTCHよりセントロメア側に位置するTGFBR1遺伝子も欠失している。TGFBR1に変異をもつ優性遺伝病として最近Loeys-Dietz症候群(LDS)が報告された。LDSでは大動脈瘤、大動脈解離といった生命予後に影響を及ぼす所見を呈することがあるため、循環器系にも注意をはらった経過観察が必要と考えられた。しかしながら今のところG5にはLDSを疑わせる症状はない。またLDSで報告されているTGFBR1の変異は今のところ全てミスセンス変異である。これらのことからLDSはhaploinsufficiencyではなく、何らかの機能獲得性変異で発症している可能性もある。

最後に本研究で明らかとなったような染色

体切断点の配列データを蓄積することにより、遺伝子欠失の分子機序の解明に貢献すると考えられる。

#### E. 結論

NBCCSの3症例で責任遺伝子PTCHの欠損の可能性を新たな方法を用いて解析した。まずMLPA法でPTCH各エクソンの欠損をみたところ、全症例で全エクソンの欠損が見出された。引き続き高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて欠損の範囲を解析したところ、165 kbから11 MbにわたるPTCHを含む9番染色体長腕の欠失が検出された。このデータをもとに、3例全例で染色体切断点のクローニングに成功した。本成果はNBCCSの診断率向上、経過観察に貢献するだけでなく、遺伝子欠失の分子機序の解明につながるとともに、他の遺伝性疾患や癌の診断にも応用可能である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

##### 2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

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。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。本邦 BWS44 例について発症原因に関する遺伝子異常の解析を行った。欧米例と比較検討したところ、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。BWS に合併する Wilms 腫瘍は *H19-DMR* 高メチル化を伴うことが知られているが、本邦 BWS では Wilms 腫瘍合併頻度が低いといわれている。その原因として *H19-DMR* 高メチル化の低頻度が考えられた。マウス *Murr1* 遺伝子は、成体の脳でのみ刷り込み(母性発現)を受ける。一方、*Murr1* 遺伝子のイントロンに存在する *U2af1-rs1* 遺伝子は逆向きに転写しており、父性発現している。様々な解析から、*U2af1-rs1* の転写が *Murr1* のプロモーターまでおよび転写干渉により刷り込みが起こっていることが示唆された。他の刷り込み領域の機序解明の手がかりとなる知見を得ることができた。

### A. 研究目的

ゲノム刷り込みは、一対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.の研究に関しては、佐賀大学医学部の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. Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)の遺伝子異常

BWSは、11p15.5のゲノム刷り込みの破綻により発症し、胎児性腫瘍を合併する。昨年度に引き続き、BWS本邦例合計44例を対象に、腫瘍合併の有無と、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因子について解析を行い、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<sup>IP2</sup>* 遺伝子変異、(5) 染色体異常、(6) *H19-DMR* の微細欠失。

#### 2. マウス *Murr1* 遺伝子の刷り込み機構

マウス *Murr1* 遺伝子は、成体の脳でのみ刷り込みを受ける。胎生期および出生直後は、母性遺伝子と父性遺伝子がほぼ等しく発現するが、発育とともに母性遺伝子が優位に発現する。一方、*Murr1* 遺伝子のイントロンに存在する *U2af1-rs1* 遺伝子は逆向きに転写しており、父性発現している。ヒストン修飾解析、RNA 発現解析、RNA ポリメラーゼの解析を行い、*Murr1* 遺伝子の刷り込み機構の解明を試みた。

### C. 研究結果

#### 1. Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)の遺伝子異常 遺伝子異常の欧米との比較を以下の表に示す。

遺伝子異常	欧米例	本邦例	p値
<i>DMR-LIT1</i> 脱メチル化	47%	34% (15/44)	0.106
<i>H19-DMR</i> 高メチル化	11%	0% (0/44)	0.015
patUPD	17%	16% (7/44)	0.845
<i>p57<sup>IP2</sup></i> 遺伝子変異	7%	5% (2/44)	0.661
染色体異常	< 2%	11% (5/44)	
<i>H19-DMR</i> の微細欠失	6 症例のみ	0% (0/17)	
原因不明	12-15%	34% (15/44)	

本邦例では *H19-DMR* 高メチル化が有意に低く、染色体異常および原因不明が高い傾向にあった。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間による違いが存在すると示唆された。腫



瘍合併例は5例(肝芽腫3例、横紋筋肉腫1例、心房粘液腫1例)(11%)で、その頻度は欧米と変わらなかったが、Wilms腫瘍は認められなかった。Wilms腫瘍には、*H19-DMR* 高メチル化を伴うことが知られている。本邦BWSではWilms腫瘍合併頻度が低いといわれており、その原因として*H19-DMR*高メチル化の低頻度が考えられた(論文投稿中)。

## 2. マウス *Murr1* 遺伝子の刷り込み機構

*Murr1*プロモーターのヒストン修飾は両アレル間で違いがないことから、クロマチンの違いによる刷り込み機構は否定的であった。*Murr1*と逆向きに転写される*U2af1-rs1*の転写物が*Murr1*のプロモーターまでおよび、さらその発現量が発育とともに増加することがわかった。さらに、転写伸長のマーカーであるRNAポリメラーゼセリン2のリン酸化が父アレルの*Murr1*プロモーター領域で優位だったことから、父性アレルの*U2af1-rs1*の転写体が*Murr1*プロモーター領域まで伸長して転写干渉が生じ、*Murr1*の刷り込みが起こっていると考えられた。

## D. 考察

本邦例のBWSの解析結果から、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、*H19-DMR*高メチル化の頻度が低いため、Wilms腫瘍の合併頻度が低いと考えられた。本邦のBWS患児のフォローに関しては、Wilms腫瘍以外の腫瘍についても十分に精査することが肝要と思われる。

*Murr1*遺伝子はマウスでのみ刷り込みを受け、ヒトでは刷り込みを受けない。しかし、ほ乳類で、転写干渉による刷り込み機構を明らかにしたのは本研究が初めてと思われる。ヒトにおける他の刷り込み領域の機構解明の手がかりとなる知見を得ることができた。

## E. 結論

BWSの原因となる遺伝子異常の頻度を明らかにした。その結果、BWS発症に関する欧米例と本邦例の遺伝的背景の違いが明らかとなり、Wilms腫瘍合併頻度と遺伝子異常の関連が示唆された。マウス*Murr1*の刷り込みが、転写干渉による機構であることがわかった。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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

- 2) 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
- 3) Watanabe N, Nakadate H, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Tsunematsu Y, Kikuta A, Fukuzawa M, Okita H, Hata Ji, Soejima H, Kaneko Y. Association of 11q loss, trisomy 12 and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor. *Gene Chromosome Cancer*, 45(6): 592-601, 2006
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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

### 2. 学会発表

- 1) 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.

- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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 *LITI/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.
- 5) 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.

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する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) 粘液型脂肪肉腫に対する siRNA を用いた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 キメラ遺伝子及び TLS-CHOP キメラ遺伝子の下流分子である DOL54 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 がコードされていると推測され、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。昨年度は、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。今年度は、siRNA ライブラリーを完成させ、ノックダウンによりタキソールへの耐性を獲得するクローンの単離を試みた。

C. 研究結果

(1) 粘液型脂肪肉腫に対する siRNA を用いた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 を設計した。その結果は *DOL54* 特異的 siRNA の腫瘍抑制効果が高いことが明らかになった。

(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：

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。また、その後ノックダウンによりタキソールへの耐性を獲得するクローンの単離を試みた。その結果、Bub3 を含む 6 種類の遺伝子の同定に成功した。今後この手法を用いることにより、小児がんの分子標的治療の標的分子や、小児がんで用いられる治療薬の耐性遺伝子などの単離が可能になる。

#### 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。

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、今年度は、タキソールの感受性に関与する遺伝子の単離を試みた。その結果効率良くタキソールの感受性分子の同定ができた。

#### 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、また標的分子の単離における siRNA ライブラリー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, 30:351-6, 2006.

##### 2. 学会発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 黒田雅彦、水谷隆之、及川恒輔、高梨正勝、工藤玄恵、向井 清 バ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
6. 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
7. 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

- 性 第 65 回日本癌学会学術総会 横浜、2006 年 9 月
8. 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
  9. 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
  10. Kuroda M, Oikawa K. siRNA applications for gene therapies. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 2006
  11. 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
  12. Morikawa, A., Kudo, A., Kuroda, M., Tsujii, 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
  13. 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
  14. 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
  15. 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ーションの解析 第 95 回日本病理学会 東京、2006 年 4 月
  16. 除 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 HR F 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
  17. 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
  18. 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
  19. 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

**研究要旨** 遺伝子発現やゲノム異常パターン等の分子プロファイリングに基づいた小児がんの層別化システムの構築と難治性小児がんの新規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、小児がんに特化した自家製 DNA チップを作製した。本年度は、肝芽腫 80 症例について遺伝子発現解析とゲノムコピー数解析を行い、臨床予後と相関する遺伝子および染色体領域を抽出した。また、チップ解析から得られた情報に有機的にリンクさせるため、小児がん遺伝子ライブラリーに対して、遺伝子機能情報などを統合し、独自のデータベースを整備した。

#### A. 研究目的

近年の治療法の向上により、小児がんの治療率は大幅に改善されてきた。しかしながら有効な治療法が確立していない難治性腫瘍も依然として存在し、それらに対する新しい治療法の開発が急務である。また、治療後の生活の質を重視した治療戦略の選択のため、腫瘍リスク分類システムの改良も合わせて優先すべき事項である。本研究では、腫瘍組織の遺伝子発現やゲノム異常等の分子プロファイルが、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ことに基づき、小児がんに特化した DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析により、各症例の臨床的特性の背景にある分子的特徴を明らかにし、治療標的の同定と腫瘍層別化による効率的な治療システムの構築に応用す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搭載遺伝子に対する統合データベースの構築

昨年度までに合計約 34,000 クローンからなる腎芽腫（ウィルムス腫瘍）、肝芽腫、神経芽腫由来のオリゴキャッピング cDNA ライブラリーを作製し、抽出された約 11,000 種類の独立遺伝子を搭載した小児がん特化型 DNA チップを作製した。また、腫瘍別に約 5,000 個の独立遺伝子を搭載した腎芽腫解析用 DNA チップおよび肝芽腫解析用 DNA チップをそれぞれ作製した。本年度は腎芽腫由来遺伝子ライブラリーについて、公知データベースからの詳細な遺伝子機能情報を統合するとともに、個々の遺伝子の出現頻度や癌部および非癌部における出現頻度を比較検討した。

##### 2) 小児がんチップを用いた遺伝子発現解析

上記の肝芽腫用 DNA チップを用いて 80 症例の肝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、10 例の肝芽腫非癌部由来 total RNA の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た。腎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。

3) アレイ CGH 法によるゲノム異常パターンの解析  
約 2,400 クローンを搭載した BAC アレイ（米国カリフォルニア大サンフランシスコ校がんセンターより供与）を用い、60 症例の肝芽腫についてゲノム異常パターンの解析を行った。データのクラスタリングはスタンフォード大の Cluster, Treeview を用いた。倫理面の配慮としては、本研究に用いるサンプルは、組織供与施設においてインフォームドコンセントを取得後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

小児がん独自の遺伝子発現プロファイルを網羅的に明らかにするため、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オリゴキャッピング cDNA ライブラリーより約 11,000 個の独立遺伝子を抽出し、自家製の小児がん特化型 DNA チップを作製した。各遺伝子については UCSC、Ensembl のゲノムブラウザ、遺伝子オントロジー等のデータベースから染色体マップ情報、遺伝子機能情報を取得し付与するとともに、データベース検索の結果、新規遺伝子と考えられたものに関しては、市販の各種臓器由来 total RNA を用いて半定量 RT-PCR と上記チップを用いた発現解析を行い、組織別の発現と機能ドメイ

ンの有無を検討した。

これまでに神経芽腫由来約 10,000 クローンと肝芽腫由来約 12,000 クローンについては、データベースに対する塩基配列の相同性検索や新規クロンの抽出、各遺伝子の出現頻度などの解析を終え報告済みである (Ohira et al. *Oncogene* 2003, Yamada et al. *Oncogene* 2004)。今回は約 12,000 クローンからなる腎芽腫ライブラリーについて、癌部および非癌部における各遺伝子の出現頻度を詳細に解析した。高頻度に出現した遺伝子は EEF1A や Immunoglobulin(Ig) 遺伝子群, LDH-A, Osteopontin, Heat shock protein などであった。癌部と非癌部で出現頻度が異なる遺伝子としては、hnRNP G, EIF4A2, CDC10, RBBP4, Cyclin G1, HMGB1, PRAME (Melanoma antigen preferentially expressed in tumors), RAN, Osteoglycin などが癌部において高頻度に出現していた。一方、非癌部で高頻度であった遺伝子群には TMSB4X, Claudin family, Osteopontin, Ferritin などが見られた。神経芽腫や肝芽腫では見られなかった特徴として、腎芽腫ライブラリーでは IGH, IGKC, IGLC1 など 30 種類を超える Ig ファミリーが多数含まれており、そのほとんどが非癌部のみで出現頻度が高かった。

これらの各ライブラリーの遺伝子についての基盤情報に、これまでに解析を行った神経芽腫や肝芽腫などの腫瘍組織における発現プロファイルを加え、独自の基盤データベースを構築した。本データベースは小児腫瘍の分子的背景の理解に有用となると期待される。

80 症例の肝芽腫組織の発現解析からは、統計解析により遺伝子発現プロファイルが新たな予後因子となる可能性が示された ( $p < 0.001$ )。今後発現解析に用いていない新規肝芽腫症例に対して、予後と強く相関する上位ランクの遺伝子について、定量 RT-PCR による再現性の検証を進める予定である。

当研究室にて、これまでに神経芽腫の遺伝子発現から約 90%の効率で予後予測が可能なミニチップシステムを既に開発している (Ohira et al. *Cancer Cell* 2005)。これにゲノム異常パターンを組み合わせることにより、さらに堅固なリスク分類が可能となることを見いだしている。肝芽腫に関してもアレイ CGH 法によるゲノム異常パターンが 60 症例について判明したので、予後との関連について遺伝子発現パターンと比較検討したところ、肝芽腫においては染色体毎のコピー数異常がほとんど見られない症例群では非常に予後が良く、ゲノム異常パターンも予

後因子として利用可能であることが示された ( $p < 0.005$ )。腎芽腫についても、同様な解析を行うため 44 症例の RNA 調製を終え、遺伝子発現解析を行った。

#### D. 考察

小児腫瘍由来遺伝子ライブラリーには各組織の発現プロファイルの特徴がよく反映されており、チップ化して網羅的解析を可能としたことで、それぞれの分子的背景の解明やそれを応用した診断、層別化システムの開発に有用であることが示された。遺伝子発現解析から得られたデータの統計解析により予後や組織型と強く相関すると示された遺伝子群を抽出し、さらにカスタマイズしたチップを作製することで、低コストで効率のよいシステムの実現につながると期待される。また、臨床への応用にあたっては遺伝子発現だけでなく、ゲノムの異常パターンや既存の臨床マーカーを組み合わせて、総合的にそれぞれの性能を判断し、間違いの少ない組み合わせを選択してシステム化することが重要と考えられる。小児腫瘍は成人腫瘍に比して年間新規症例数が少なく、観察期間も長期に渡ることが多いため、研究材料の供給を行う組織バンクの整備が今後の最も重要な課題であろう。各種バイオマーカー、予後因子解析、中央病理診断の情報整備体制のシステム化も望まれる。

#### E. 結論

自家製の小児がん特化型遺伝子チップを作製し、腎芽腫および肝芽腫の網羅的遺伝子発現プロファイリングを行った。チップに搭載した個々の遺伝子 (新規遺伝子を含む) について、組織別発現や機能アノテーションなどの情報と各腫瘍の染色体異常データも統合し、独自のデータベースを構築した。今後さらに症例数を重ね、小児腫瘍研究のための財産となる遺伝子発現データベース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. 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.

2. 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* **25**, 1931-42, 2006.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Oba S, Tomioka N, Ohira M, Ishii S. Combfit: a normalization method for array CGH data. *IPSJ Transactions on Bioinformatics* in press.
7. 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

太平美紀、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.

太平美紀、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.

太平美紀、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.

太平美紀、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.

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、一つ目の課題として、昨年度に引き続き小児ホジキンリンパ腫を対象とする治療法の検討を行った。検討は日本小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）リンパ腫委員会および同ホジキンリンパ腫ワーキンググループにおいて行われた。過去に最も良好な成績が報告されているドイツのレジメン（OPPA/OEPA+COPP+領域照射）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、また、低危険群、中間危険群については、初期の化学療法により寛解導入されない症例に対して、最大6コースまで追加の化学療法を行うことで、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）の改善を目指すレジメンを提案した。二つ目の課題として、難治性神経芽腫の多施設共同研究臨床試験のプロトコールを作成し、64施設で臨床試験を開始した。本プロトコールでは、過去に行われた厚生省研究班プロトコールの問題点（腎障害の発生、初期治療における合併症の発生、骨髄抑制による遂行困難例の報告等）を検討し修正を行った。また、本臨床試験では病理診断、分子生物学的予後因子の診断を中央の施設で施行し、また、余剰検体を用いた将来の検討を可能とした。

A. 研究目的

1. 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

まで各施設でまちまちな治療が行われてきた。本研究では、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を提案する。

2. 神経芽腫のうち、年長児の大部分を占める進行神経芽腫は今日でも治癒率40%未満の難治性腫瘍である。これまでにわが国で行われた臨床試験の成績は世界的に見ても良好

なものであった。しかし、その臨床試験としての質、治療遂行上の問題が明らかとなり、その効果と安全性を確認する必要がある。本研究では、過去の厚生省研究班プロトコールを再検討し、部分的な修正を行うとともに、病理診断および分子生物学的予後因子の診断を中央の施設で行うことで、正確な診断に基づく質の高い臨床試験を目指す。

## B. 研究方法

1. 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、欧米の報告およびわが国のアンケート調査結果を検討し、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。
2. 日本神経芽腫研究グループ (JNBSG) において高リスク神経芽腫のプロトコールを検討し、同グループに参加する施設において共同研究を開始する。

## C. 研究結果

### 1. ホジキンリンパ腫研究

1) 欧米で用いられている標準的治療法は、化学療法+リンパ節領域照射 (Involved Field: IF 照射) である。しかし、放射線照射の晩期障害を克服するため、化学療法±IF 照射 (完全寛解: CR なら照射を省略) が検討され、今後はこの治療戦略が標準となるものと思われる。そのうちドイツの治療法では従来と同一の化学療法を用いて、化学療法終了後に完全寛解なら照射を省略し、短い観察期間ながら非照射群は照射群

とほぼ同等の治療成績であったと報告した (Ruhl U, et al: Response-adapted radiotherapy in the treatment of pediatric Hodgkin' s disease; An interim report at 5 years of the German GPOH-HD 95 trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys 51:1209-1218, 2001)。この治療法の問題点は、完全寛解率が 22%と低値であること、すなわち照射群の割合が 78%と高いことである。米国 CCG では、化学療法により完全寛解となった症例を 2 群に分け、高い完全寛解率と非照射群に劣らない成績を報告した (Nachman JB, et al: Randomized comparison of low-dose involved-field radiotherapy and no radiotherapy for children with Hodgkin' s disease who achieve a complete response to chemotherapy. J Clin Oncol 20:3765-3771, 2002)。しかし、中間危険群においても男児の不妊が効率に生じることが問題である。

### 2) 新規レジメンの考え方と課題

わが国のアンケート調査結果と欧米の報告を検討した結果、以下の考え方を基本とすることを提案した。①高い EFS を目指し、再発後の救済を前提としない。②化学療法で完全寛解なら照射を省略する。③化学療法の選択においては不妊、心筋障害を避けることを第一に考える。④晩期障害を低率に留められる範囲で、特に低・中間危険群の治療を強化し、寛解導入率の向上、非照射群の拡大を図る。これらの考え方をもとに以下のレジメン案を JPLSG リンパ腫委員会に提案し、レジメン案の承認を得た。

治療レジメン案: ①ドイツレジメンを基本に、同療法の問題点である完全寛解率の低さ (=照射群の割合の高さ) を改善すべく、毒性の重ならない化学療法である ABVD2

コースを各リスク群の化学療法に加える。

②完全寛解例には照射の省略を行う。③低・中間危険群に対しては、治療反応性に応じて最大6コースまでの化学療法の追加を行う。④放射線照射は、ドイツの現法を踏襲する。

このレジメンにおける問題点、課題として、①完全寛解の判定基準（PET、シンチグラム、生検）をどのように設定するか。②症例数を考慮すると臨床試験として成立するのか。などがあげられ、現在検討中である。

## 2. 進行神経芽腫研究

1) 過去の厚生省研究班プロトコールの問題点を検討し、以下の修正を行った。

- ・ 高リスク群の基準として COG の基準（2006 年 8 月現在）を採用し、試験対象としてはそのうちの 1 歳以上の患者とする。
- ・ 腎機能低下および骨髄抑制に対し、CDDP を 25→20mg/m<sup>2</sup>×5 に減量し、かつ総コース数を 6→5 コースに削減する
- ・ 症例の適格基準および治療開始基準を設定する
- ・ 患児の状態に幅があり、死亡例の報告された第 1 コースを減量する
- ・ 放射線照射を大量化学療法の後を設定し、化学療法の遅延を防ぐ
- ・ 外科療法・放射線療法のガイドラインを設ける

- ・ 造血細胞移植レジメンを MEC 療法に統一する

2) JNBSG としてプロトコールの承認・キックオフミーティングの開催

- ・ 2006 年 9 月 1 日に JNBSG 運営委員会でプロトコールの承認を受けた。
- ・ 2006 年 9 月 2 日に JNBSG 参加施設を対象にキックオフミーティングを開催し、100 施設以上が参加した。そのうちの 64 施設から本臨床試験への参加が表明され、同施設に対してプロトコールを送付した。

## D. 結論

1. わが国の小児ホジキンリンパ腫に対する治療は、各施設ごとにまちまちである。そのため、放射線照射、抗がん剤による晩期障害の発生が懸念される。
2. 本年度の研究において JPLSG リンパ腫委員会で晩期障害の発生を低減することを目標として、プロトコールを検討し、委員の合意を得た。今後、寛解評価の方法などを加えた上で、臨床試験を開始する。
3. 進行神経芽腫においては、現行の治療法の問題点が明らかとなった。本年度の研究では、それらの問題点を修正したプロトコールを作成し、JNBSG の承認を得た。JNBSG 参加施設

設のうち 64 施設で臨床試験が開始された。

E. 健康危険情報

該当事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：

1) 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

2) 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

3) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし