

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
副島英伸, 太田 亨, 向井常博	第5章 エピジェネテ イクスと疾患. 4. インプリンティング 関連疾患	中尾光善、 塩田邦郎、 牛島俊和、 佐々木裕之	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	羊土社	東京	2006	24(8): 186-192

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maeda, M, Tsuda, A, Yamanishi, S, Uchikoba, Y, Fukunaga, Y, Okita H, <u>Hata, J</u>	Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumors of the kidney in a child.	Pediatric Blood and Cancer			2006 (in press)
Hamazaki, M, Okita, H, <u>Hata, J</u> , 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
Watanabe,N, Nakadate,H, Haruta,M, Sugawara,W, Sasaki,F, Tsunematsu,Y, Kikuta,A, Fukuzawa,M, Okita, H, <u>Hata, J</u> , 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
Morimoto A, Ikushima S, Kinugawa N, Ishii E, Kohdera U, Sako M, <u>Fujimoto J</u> , 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
Ishii R, Morimoto A, Ikushima S, Sugimoto T, Asami K, Bessho F, Kudo K, Tsunematu Y, <u>Fujimoto J</u> ,	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

Kiuchi S, Yamada T, Kiyokawa N, Saito T, <u>Fujimoto J</u> , 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
Kato I, Manabe A, Aoyama C, Kamiya T, Morimoto T, Matsufuji H, Suzuki K, Kitagawa Y, Hori T, Tsurusawa M, Kiyokawa N, <u>Fujimoto J</u> , 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
Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang WR, Itagaki M, Shiozawa Y, Suzuki K, Sakaguchi S, Ktagiri YU, Takahashi T, Okita H, <u>Fujimoto J</u> , Kiyokawa N.	Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in pro-B-cell development.	Exp Hematol.	34	508-18	2006
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, <u>藤本純一郎</u> , 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.
片桐洋子, 大喜多肇, <u>藤本純一郎</u> , 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.
M Maeda, A Tsuda, S Yamanishi, Y Uchikoba, Y Fukunaga, <u>Hajime Okita</u> , J Hata	Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney in a child	Pediatric Blood and Cancer	Epub ahead of print		2006
N Watanabe, H Nakadate, M Haruta, W Sugawara, F Sasaki, Y Tsunematsu, A Kikuta, M Fukuzawa, <u>H Okita</u> , 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.	45(6)	592-601	2006

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(4)	508-18	2006
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.	56(9)	543-8.	2006
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. Jan 1;	Prostate.	67(1)	41-9	2007
Uchikawa H, Toyoda M, Nagao K, Miyauchi H, Nishikawa R, Fujii K, Kohno Y, Yamada M, Miyashita T.	Brain- and heart-specific <i>Patched-1</i> containing exon 12b is a dominant negative isoform and is expressed in medulloblastomas.	Biochem Biophys Res Commun.	349(1)	277-283	2006
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
Higashimoto K, Soejima H, Saito T, Okumura K, Mukai T.	Imprinting disruption of the <i>KIP2/LIT1</i> domain: the molecular mechanism causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer.	Cytogenet Genome Res	113(1-4)	306-312	2006
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
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

Nakano S, Murakami K, Meguro M, <u>Soejima H</u> , Higashimoto K, Urano T, Kugoh H, Mukai T, Ikeguchi M, Oshimura M.	Expression profile of <i>LIT1/KCNQ1OT1</i> and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers.	Cancer Science	97(11)	1147-1154	2006
Yamasaki-Ishizaki Y, Kayashima T, Mapendano CK, <u>Soejima H</u> , 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
Oikawa, K, Ishida, T, Imamura, T, Yoshida, K, Takanashi, M, Hattori, H, Ishikawa, A, Fujita, K, Yamamoto, K, Matsubayashi, J, <u>Kuroda, M</u> , 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
Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, <u>Ohira M</u> , 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(5)	1281-5	2006
Machida T, Fujita T, Oo M L, <u>Ohira M</u> , 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(13)	1931-42	2006
Inamori K, Gu J, <u>Ohira M</u> , 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(2)	627-32	2006

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(36)	5046-55	2006
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(3)	185-92	2007
Oba S, Tomioka N, Ohira M, Ishii S.	Combfit: a normalization method for array CGH data.	IPSIJ Transactions on Bioinformatics	In press		
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 <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	Neurobiol Dis	In press		

IV. 研究成果の刊行物・別刷

4. インプリンティング関連疾患

副島英伸, 太田 亨, 向井常博

インプリンティングを受ける遺伝子は、由来する親の性によって一方のアレルから発現する。複数のインプリント遺伝子が特定の染色体領域に存在しドメインを形成していることが多く、インプリンティング調節領域 (imprinting control region : ICR または imprinting center : IC)^{*1} によりドメインレベルでシスに遺伝子発現が調節されている。このドメインレベルのインプリンティング調節機構が破綻するとさまざまな疾患が発症する。本稿では、現在までにわかっているドメインレベルのインプリント調節機構とヒト疾患との関連を解説する。

はじめに

ゲノムインプリンティングは、両親から受け継いだ一対の対立遺伝子のうち、その親の性によって、一方の親由来の遺伝子が優勢に発現する現象である。多くのインプリント遺伝子は、特定の染色体領域に集中し

てインプリンティングドメインを形成し、その発現は ICR (IC) によりシスに調節されている。ICR (IC) は、卵あるいは精子形成過程で DNA メチル化を受け、受精後、体細胞まで両親の性によるメチル化の違いが維持されるメチル化可変領域 (differentially methylated region : DMR)^{*2} のことである (第4章-4 参

[キーワード&略語]

DNA メチル化, メチル化可変領域, インプリンティング調節領域, インプリンティングセンター, インプリンティングドメイン, 片親性ダイソミー, エピジェノタイプ, Beckwith-Wiedemann 症候群, Prader-Willi 症候群, Angelman 症候群, Silver-Russell 症候群, 偽性副甲状腺機能低下症, 新生児一過性糖尿病, 胞状奇胎, 癌, 生殖補助医療

DMR : differentially methylated region
(メチル化可変領域)

ICR : imprinting control region
(インプリンティング調節領域)

IC : imprinting center
(インプリンティングセンター)

UPD : uniparental disomy (片親性ダイソミー)

BWS : Beckwith-Wiedemann syndrome
(Beckwith-Wiedemann 症候群)

PWS : Prader-Willi syndrome
(Prader-Willi 症候群)

AS : Angelman syndrome (Angelman 症候群)

SRS : Silver-Russell syndrome
(Silver-Russell 症候群)

PHP : pseudohypoparathyroidism
(偽性副甲状腺機能低下症)

TNDM : transient neonatal diabetes mellitus
(新生児一過性糖尿病)

HM : hydatidiform mole (胞状奇胎)

ART : assisted reproductive technology
(生殖補助医療)

Imprinting related diseases

Hidenobu Soejima¹⁾/Tohru Ohta²⁾/Tsunehiro Mukai¹⁾ : Division of Molecular Biology and Genetics, Department of Biomolecular Sciences, Faculty of Medicine, Saga University¹⁾/The Research Institute of Personalized Health Sciences, Health Sciences University of Hokkaido²⁾ (佐賀大学医学部分子生命科学講座分子遺伝学分野¹⁾/北海道医療大学個性健康科学研究所²⁾)

照)。インプリンティングと疾患との関わりは、疾患の遺伝様式や細胞遺伝学的な知見から強く示唆されてきており、実際にさまざまな疾患でインプリンティングの異常が見つかっている。本稿では、インプリンティングが関連している代表的疾患について解説する。

1 Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)

過成長症候群の1つで、新生児期の巨軀、巨舌、臍ヘルニアを三主徴とする先天奇形症候群である。5～10%の患児に胎児性腫瘍（大半はWilms腫瘍）を合併する。BWSの遺伝子座11番染色体短腕15.5領域(11p15.5)は、インプリンティング領域であり、*IGF2/H19*ドメインと*KIP2/LIT1*ドメインが隣接して存在する(図1A)。各ドメインはそれぞれのICRにより独立してインプリンティングが制御されており、ドメインレベルでのインプリンティング破綻がBWSを引き起こす主要な原因である^{1)~3)}。

1) インプリンティング制御機構と発症機序

i) *IGF2/H19*ドメイン

*IGF2/H19*ドメイン内の重要なインプリント遺伝子は父性発現する*IGF2*と母性発現する*H19*である。*IGF2*は細胞増殖因子で、発現増加はBWSの過成長を起こし、胎児性腫瘍にも関連する。*H19*はnon-coding RNAで、腫瘍抑制活性をもつと考えられているが、詳細な機能は不明である。本ドメインのICRは、*H19*の上流2～5 kbにある*H19-DMR*（母性非メチル化、父性メチル化）である。*H19-DMR*には、複数のCTCF結合部位がある。CTCFは、非メチル化母性アレルに結合してインスレーターとして働く。つまり、*H19*下流のエンハンサーをブロックして、*IGF2*への作用を阻害し*H19*に作用させる。一方、父性アレルはメチル

化によりCTCF結合が阻害されるため、エンハンサーは*IGF2*に作用する。また、メチル化は*H19*プロモーター領域におよび、*H19*の発現は抑制される(図1C)。結果的に、*H19*は母性発現、*IGF2*は父性発現を示す。

BWSでは、母性アレルの*H19-DMR*が高メチル化されるために両アレルでCTCFの結合が阻害される結果、*IGF2*が両アレル発現 (loss of imprinting : LOI) する症例が認められる。しかし、このような症例の頻度は低く、また、母性アレル*H19-DMR*の高メチル化が認められなくても*IGF2* LOIが認められる症例があることから、*H19-DMR*非依存的なインプリンティングの制御機構の存在も考えられる。

ii) *KIP2/LIT1*ドメイン

*KIP2/LIT1*ドメイン内の主要なインプリント遺伝子は、母性発現する*p57^{KIP2}* (*KIP2*)と父性発現する*LIT1*である。*KIP2*はサイクリン依存性キナーゼ(CDK)インヒビターで、負の細胞増殖因子であり、その発現減少はBWS発症原因の1つである。また、腫瘍抑制遺伝子としても知られている。*LIT1*は長大なnon-coding RNAであり、詳細な機能は不明である(図1B)。本ドメインのICRは、*LIT1*上流にある*DMR-LIT1* (*KvDMR1*)である(母性メチル化、父性非メチル化)。実験的に、*DMR-LIT1*がICRであることが証明されているが、その分子機構に関しては不明な点が多く、インスレーターやサイレンサーとして働く説⁴⁾や*LIT1* RNA自身が周囲のインプリント遺伝子の発現をシスに抑制する説⁵⁾などが提唱されている。約半数のBWSでは母性アレル*DMR-LIT1*が脱メチル化しており、それに伴い両アレルとも父型エピジェノタイプ³⁾となるため、*KIP2*の発現が抑制される^{6) 7)}。また、低頻度ながら*KIP2*の点変異も認められる。

2) 発症原因と臨床症状との関連

孤発例BWSの発症原因の頻度と臨床症状との関連を表に示した。父性片親性ダイソミー⁴⁾ (paternal

※ 1 インプリンティング調節領域 (ICR) と インプリンティングセンター (IC)

 インプリンティングドメイン内のインプリント遺伝子の発現をシスに制御しているDMRのこと。ICRとICは同義である。

※ 2 メチル化可変領域 (DMR : differentially methylated region)

 母性アレルと父性アレルでそれぞれ異なるメチル化状態を示すDNA領域のこと。CpG配列が集中しているCpGアイランドに多い。配偶子に由来するDMRは一次インプリントと呼ばれ、インプリンティングドメイン全体を制御するICRであることが多い。

※ 3 エピジェノタイプ (epigenotype)

 塩基配列で規定される遺伝子型 (ジェノタイプ) の対語で、DNAメチル化やヒストン修飾により規定されるエピジェネティックな修飾パターンのこと。エピジェノタイプに従って遺伝子の発現パターンが決定される。

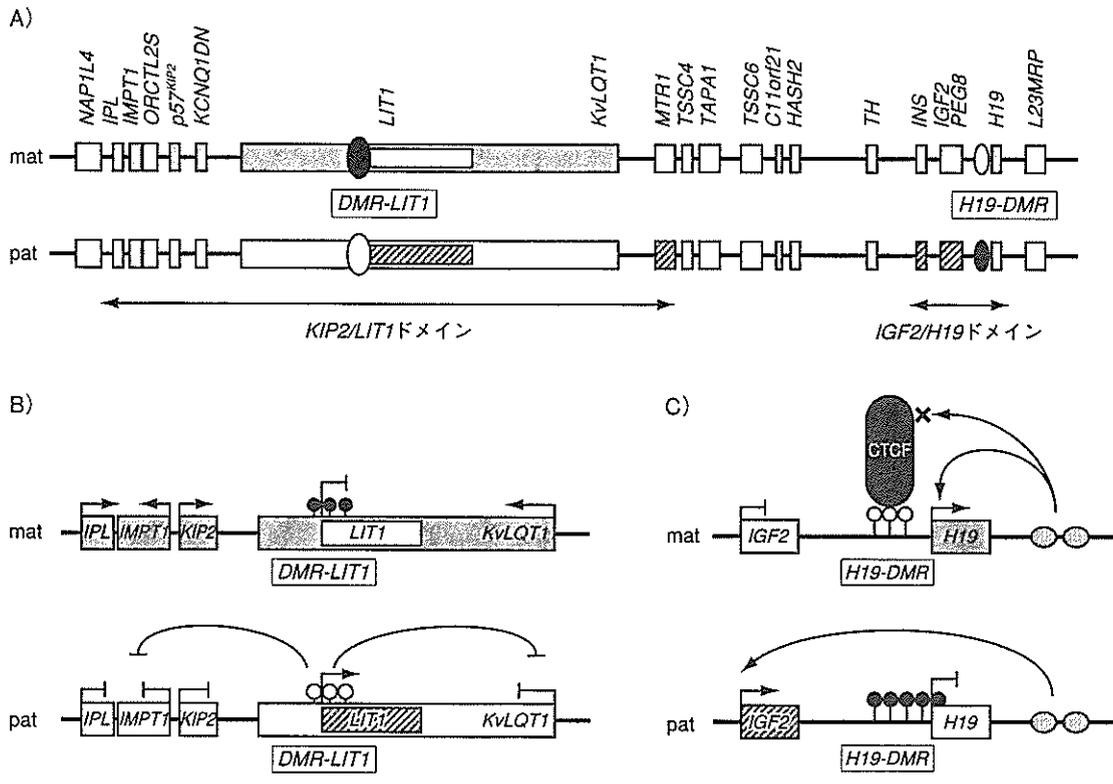


図1 11p15.5インプリンティング領域と制御機構

A) 11p15.5のインプリンティングドメイン。楕円はICRを示し、黒はDNAメチル化、白はDNA非メチル化を表す。mat：母性アレル、pat：父性アレル、：母性発現、：父性発現、：両アレルともの場合は両アレル発現。B, C) KIP2/LIT1ドメインとIGF2/H19ドメインのインプリンティング調節機構。詳細は本文参照。○：非メチル化DNA、●：メチル化DNA

表 BWS候補遺伝子の異常と頻度および症状との関連

遺伝子異常または染色体異常	頻度 (%)	BWS症状との関連性	
IGF2/H19ドメイン	H19-DMRの高メチル化	~10	高発癌リスク (特にWilms腫瘍)
	LOI of IGF2	10~15	過成長・巨舌・内臓腫大
KIP2/LIT1ドメイン	DMR-LIT1の低メチル化	50	腹壁欠損・内臓腫大
	p57 ^{KIP2} の遺伝子変異	7	膈ヘルニア・巨舌・耳の小奇形
刷り込み領域全体	11番染色体父性ダイソミー (pUPD)	15	高発癌リスク・低血糖・片側肥大
	11番染色体構造異常 (転座・重複)	1~2	不明
	異常なし	~15	不明

LOI: loss of imprinting

※4 片親性ダイソミー (uniparental disomy: UPD)

一对の相同染色体が片親から由来する場合をいう。2本とも父親由来のときは父性片親性ダイソミー (paternal UPD: pUPD)、母親由来のときは母性片親性ダイソミー (maternal UPD: mUPD) という。問題の染色体が両親ともに減数分裂で不分離をきたし、0 (ゼロ) 染色体の配偶子と2染色体の配偶子が受精して生じる場合と、体細胞分裂の際に生じる場合がある。

uniparental disomy: pUPD) では、2つのインプリンティングドメインがともに父型エピジェノタイプとなり、IGF2 LOI, H19発現消失, KIP2発現消失が起こると考えられる。低頻度であるが、11p15.5の構造異常もみられる。Wilms腫瘍はH19-DMR高メチル化やpUPDの場合にそのリスクが高くなり、DMR-LIT1脱メチル化はWilms腫瘍以外のリスクが高くなる⁸⁾。

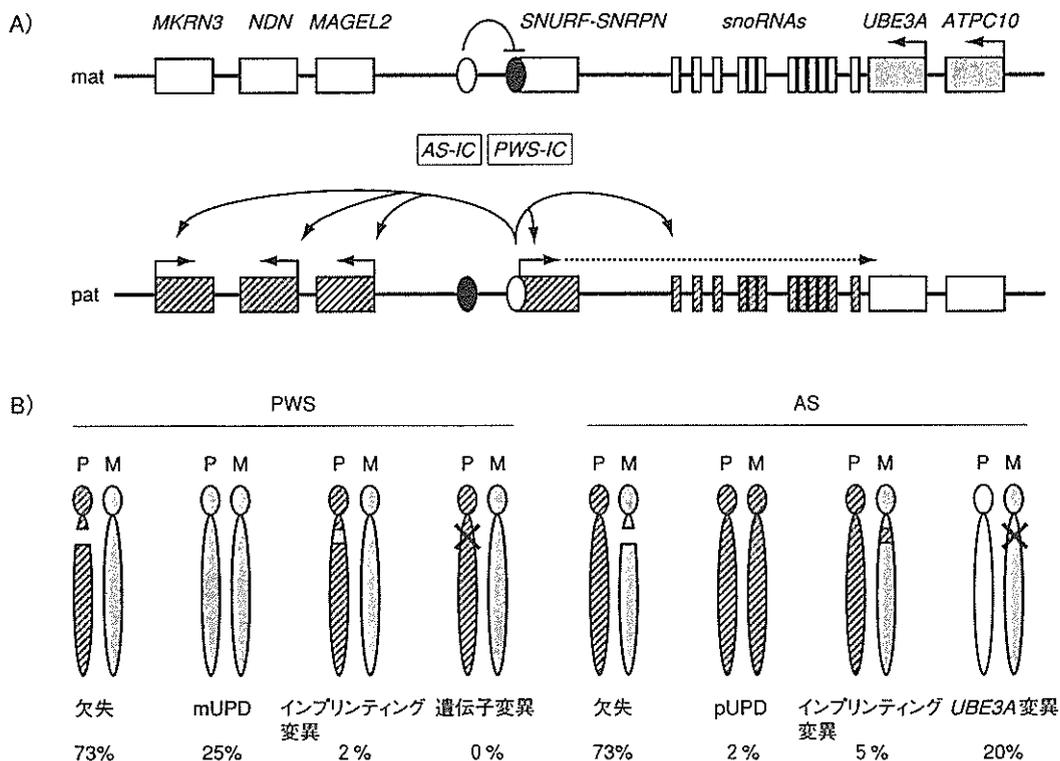


図2 15q11-q13インプリンティング領域とPWS/ASの発症機構

A) 15q11-q13における遺伝子の発現パターンと、インプリンティング調節領域。矢印は遺伝子の転写方向を示す。楕円はICを示し、黒はDNAメチル化、白はDNA非メチル化を表す。mat：母性アレル、pat：父性アレル。■：母性発現、□：父性発現。インプリンティング制御機構については本文参照。B) PWS/ASの発症原因。■は父親由来染色体 (P) を、□は母親由来染色体 (M) を示す

Prader-Willi 症候群 (PWS), Angelman 症候群 (AS)

PWSは、新生児期から乳児期における著明な筋緊張低下、皮膚の色素低形成、性器形成不全、幼児期から始まる過食・肥満、および精神遅滞を特徴とする。一方、ASは、重度精神遅滞、難治性てんかん、失調歩行、笑い発作を特徴とする。両疾患は臨床的に全く異なるが、細胞遺伝学的には、いずれも15q11-q13が責任遺伝子座で、PWSでは父性アレルの欠失、ASでは母性アレルの欠失が認められる。この特徴的な欠失から、PWSは父性発現遺伝子の異常で発症し、ASは母性発現遺伝子の異常で発症することが示唆された。実際に15q11-q13には父性発現する遺伝子 (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNURF-SNRPN*, *snoRNAs*) と母性発現する遺伝子 (*UBE3A*, *ATPC10*) が存在してインプリンティングドメインを形成し、インプリンティングセンター (IC) によって制御されている^{1) 2)} (図2 A)。

1) インプリンティング制御機構

インプリンティング制御機構に変異をもつ患者では *SNURF-SNRPN* の上流に数kbの微細欠失がみられる。この微細欠失の解析から、*SNURF-SNRPN* のエキソン1を含む4.3kbが父性エピジェネティックパターンを体細胞で維持するための *PWS-IC* で、それより35kb上流の880bpが母性エピジェネティックパターンを確立するための *AS-IC* であることが明らかになった。体細胞における親由来のエピジェネティックパターンの維持には *PWS-IC* のDMR (母性メチル化、父性非メチル化) が重要で、生殖細胞での親由来マークの確立には *AS-IC* が働くこと示唆されていた⁹⁾。 *AS-IC* の一部領域にDMR (母性非メチル化、父性メチル化) が発見されたことから¹⁰⁾、精子形成過程でまず *AS-IC* がメチル化を受けるモデルが考えられた。メチル化 *AS-IC* はシスに *PWS-IC* をメチル化させることができない。この非メチル化 *PWS-IC* は体細胞での父性エ

ジェノタイプを維持する。snoRNAsの宿主遺伝子としてSNURF-SNRPNの長大な選択的転写物も父性発現が誘導される。この転写物はUBE3Aと逆向きであるため、直接的・間接的にUBE3Aの発現を抑制する可能性がある。一方、卵形成過程ではAS-ICがメチル化されず、あるトランス因子が結合してPWS-ICにシスに作用してメチル化を起こす。PWS-ICのメチル化により母性エピジェノタイプが維持され、周辺の遺伝子は発現しない。SNURF-SNRPNとその選択的転写物も発現しないため、逆向きのUBE3Aは抑制されずに発現する¹¹⁾。このモデルでは、精子形成過程のAS-ICのメチル化が最もプライマリーなメチル化となるが、マウスにおいてAS-ICに相当する領域が単離されていないことから、実験的には証明されていない。

2) 発症機序

上述した欠失とインプリント変異の他に、15番染色体のUPD (PWSでは母性UPD, ASでは父性UPD) とASにおけるUBE3A変異が認められる。PWSでの遺伝子変異は見つかっていない⁹⁾ (図2B)。最近、父性発現するsnoRNAが、セロトニンレセプター2C (5-HT_{2c}R)の選択的スプライシングを調節し活性型5-HT_{2c}Rのアイソフォームを増加させること、PWS患者の脳ではsnoRNAが消失して活性型アイソフォームが減少していることが報告された¹¹⁾。この結果は、PWSの症状がセロトニン作動性神経系の障害と関連することと合致する。一方、マウスの研究からUbe3aは大脳皮質や海馬に強く発現し、分化した神経細胞特異的に母性発現することが明らかとなった¹²⁾。ASの症状が重度の精神発達遅滞であり、大脳皮質や海馬の高次脳機能の障害と関連することと合致し興味深い。

3) Silver-Russell 症候群 (SRS)

子宮内発育遅延、低身長、身体左右非対称、性発育の異常を特徴とする症候群である。約10%の患者に7番染色体の母性UPDが認められ、成長促進父性発現遺伝子と成長抑制母性発現遺伝子の関与が示唆された。7p11.2-p13の母由来重複例と7q31-qterの部分的母性UPD症例から両領域が責任座位として注目された。7p11.2-p13には、増殖因子受容体に結合して成長を抑制するGRB10が存在する。マウスGrb10は母性発現するが、ヒトGRB10はほとんどの組織で両アレル発現する(アイソフォーム特異的に胎児筋で母性発

現、胎児脳で父性発現を示す)。7q32には、父性発現するMEST (PEG1), MESTIT1, COPG2, COPG2IT1, 母性発現するCPA4が存在し、マウスの解析からMestが候補遺伝子と考えられていた。しかし、患者においてGRB10やMESTの変異が見つからないこと、ICRと思われるDMRに異常が認められないことから、SRSとの関連性は示されていない^{13) 14)}。最近、H19-DMRの低メチル化を示すSRS患者(DMR-LIT1のメチル化は正常)が報告され、H19の両アレル発現とIGF2の発現減少を伴っていた¹⁵⁾。BWSと逆のパターンであり、症状も過成長を示すBWSに対してSRSは発育遅延を主徴とすることから非常に興味深い。

4) 偽性副甲状腺機能低下症 (PHP)

標的臓器の副甲状腺ホルモン (PTH) に対する不応症のために、低カルシウム血症を呈する疾患群である。このうちAlbright 遺伝性骨異栄養症 (AHO) (低身長、肥満、円形顔貌、精神発達遅延などを呈する) を合併する偽性副甲状腺機能低下症 Ia型 (PHP-1a), AHOを合併しないPHP-1b型, AHOを合併するが血清カルシウム値が正常な偽性偽性副甲状腺機能低下症 (PPHP) が20q13のGNAS座位のインプリンティングに関連する(図3)。GNAS座位は複雑なインプリンティングを示す領域で、NESP55は母性発現、XLasは父性発現を示す¹⁶⁾。Gsaは腎近位尿細管、下垂体、甲状腺、卵巣で母性発現するが、その他の組織では両アレル発現を示す。また、NESP55のアンチセンス転写物NESPASとGsaの選択的エキソン1Aからの転写物は父性発現するnon-coding RNAである。Gsaは促進性Gタンパク質 (Gs) のαサブユニットをコードし、PTHなどのホルモンのシグナルを標的分子に伝達する。Gsaの変異が母由来であるときPHP-1aを発症し、父由来であるとPPHPを発症する。母由来の変異は、近位尿細管などインプリント組織でのGsaの発現を消失させ、これらの組織がホルモン不応性となる。他の組織では、発現量が半分減少してハプロ不全^{※5)}のためAHOの症状が出現し、PHP-1aとなる。一方、父由来変異は、インプリント組織でのGsaの

※5 ハプロ不全 (haploinsufficiency)

対立遺伝子の一方が、欠失や変異などにより遺伝子発現量が減少するために機能を失い、異常な形質を表すこと。

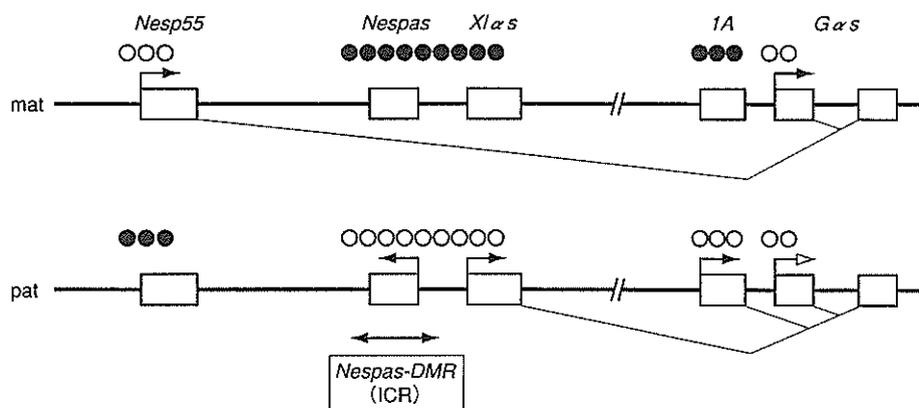


図3 マウス *Gnas* 座位のインプリンティング

Gnas 座位全体のインプリンティングを制御する ICR は *Nespas-DMR* である。父性アレルの非メチル化 *Nespas-DMR* が、① *Nespas* と *XIαs* の発現を促進し、② *Nespas* を介してアンチセンスの *Nesp55* の父性発現を抑制し、③ 父性アレルのエキソン 1A-DMR のメチル化を防御して組織特異的な *Gsa* のインプリンティングを起こす、というモデルが示された¹⁹⁾。→ は組織特異的インプリンティングを示す。○：DNA 非メチル化，●：DNA メチル化

発現に影響しないためホルモン不応性は生じないが、他の組織ではハプロ不全が生じ AHO の症状が主となる PPHP を発症する。また、エキソン 1A は母性メチル化、父性非メチル化を示す DMR である。母性メチル化が消失するインプリンティング変異で、AHO を伴わない PHP-1b が発症する。インプリント組織では *Gsa* の母性発現が消失するが、他の組織ではもともと両アレル発現しているためメチル化が消失しても発現には影響しないからである。GNAS 座位には 3 つの DMR が存在するが、ノックアウトマウスの解析から、*Nespas-DMR* が *Gnas* 座位全体のインプリンティングを制御する ICR であることが明らかとなった¹⁷⁾。エキソン 1A-DMR は *Gsa* の組織特異的インプリンティングを制御すると考えられる。

5 新生児一過性糖尿病 (TNDM)

生後 6 週までにインスリン依存性糖尿病の病態を呈する稀な疾患である。生後 18 カ月になると寛解するが、半数は若年性 2 型糖尿病を発症する。約 70% の患者で、6 番染色体父性 UPD、6q24 の父性重複、6q24 のメチル化異常のいずれかが認められる。6q24 には父性発現を示すインプリント遺伝子 *ZAC* と *HYMAI* が存在する。両遺伝子が共有する 5' 領域の DMR (母性メチル化、父性非メチル化) が ICR と考えられており、母性脱メチル化の TNDM 患者では *ZAC*、*HYMAI* 両遺伝子が両アレルから発現する

(LOI)¹⁸⁾。ヒト *ZAC/HYMAI* 領域を導入したトランスジェニックマウスでは、父親からトランスジーンを受け継いだ新生仔で高血糖と暍のインスリン陽性構造の減少がみられる¹⁹⁾。*HYMAI* は non-coding RNA で機能不明であるが、*ZAC* は Zn フィンガータンパク質で、インスリン分泌に関与する *PAC1-R* の発現を促進する。このため、*ZAC* の LOI が TNDM 発症に重要であると考えられる。最近、*ZAC* が *DMR-LITI* に結合し、間接的に *KIP2* の発現を調節することが示唆された²⁰⁾。TNDM と BWS は一部の症状が共通すること、インプリント遺伝子同士のネットワーク形成の可能性などの点から興味深い。

6 胎状奇胎 (HM)

全胎状奇胎 (CHM) は、胎児成分を欠き、妊娠絨毛が水腫様に腫大し、ぶどう房状の外観を呈して子宮腔に充満する。細胞遺伝学的には 2 倍体で、雄核発生により生じる。父由来ゲノムしかないために父性発現遺伝子の発現増加と母性発現遺伝子の発現消失が原因と考えられるが、両親由来のゲノムをもつ CHM もある (BiCHM)。正常では母性メチル化を示す複数の ICR が、BiCHM では脱メチル化しており、卵形成過程でのメチル化インプリンティング確立の異常が原因と考えられる²¹⁾。最近、BiCHM 患者で *NALP7* の変異が報告されたが²²⁾、*NALP7* は炎症やアポトーシスに関連する遺伝子で、インプリンティングに関わる分

子との関連性については知られていない。NALP7が母性インプリントの確立や維持に本当に関わるのか、今後の研究課題である。

7 インプリントと癌

インプリントが破綻すると、インプリントを受けている腫瘍関連遺伝子の発現に異常をきたし、癌化や癌の進展に関与する。IGF2のLOIはWilms腫瘍や大腸癌をはじめとするさまざまな腫瘍で認められ、インプリントの破綻によるKIP2の発現低下もいくつかの癌で認められる⁷⁾。その他のインプリント遺伝子のインプリント破綻も報告されている。インプリント破綻が発癌の原因か、結果かは明らかでなかったが、最近の研究によって原因となりうることを示された²³⁾。マウスのDNAメチル化酵素Dnmt1を一時的に不活化させて脱メチル化を起こし、インプリントを欠損した(インプリントフリー)線維芽細胞を作製したところ、癌細胞のさまざまな特徴を獲得したのである。さらにインプリントフリー細胞を導入したキメラマウスは、その細胞を起源とした癌が数種類発生した。インプリント破綻によって、インプリントを受ける腫瘍抑制遺伝子や癌遺伝子の発現がそれぞれ減少、増加して、細胞を癌化に導くと考えられる。

8 インプリント関連疾患と生殖補助医療

近年、体外受精(IVF)や卵細胞質内精子注入法(ICSI)などの生殖補助医療を受けた妊娠でインプリント関連疾患の発生頻度が高いことが注目されている。これまでに、BWSをはじめASやSRSの症例が報告されている。BWSとASはそれぞれDMR-LIT1とPWS-ICの脱メチル化がほとんどを占め、BWSのリスクは正常妊娠の4倍と報告されている³⁾。ヒト卵の*in vitro* maturationで、第一および第二減数分裂期の卵にH19-DMRのメチル化異常が認められたことから、*in vitro*での培養が卵におけるメチル化インプリントの獲得に影響していると考えられる²⁴⁾。

おわりに

ゲノムインプリントは、発生、発育、精神発達、内分泌、代謝、腫瘍など、幅広い領域の疾患に関

連している。このため、インプリントの成立機序や維持機構を解明することはきわめて重要である。今後、インプリントの全容が明らかになり、疾患の予防や治療に応用できるようなレベルに研究が進展することが期待される。

文献

- 1) Walter, J. & Paulsen, M.: *Semin. Cell Dev. Biol.*, 14: 101-110, 2003
- 2) Arnaud, P. & Feil, R.: *Birth Defects Res. C*, 75: 81-97, 2005
- 3) Weksberg, R. et al.: *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, 137: 12-23, 2005
- 4) Du, M. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 12: 1927-1939, 2003
- 5) Thakur, N. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 24: 7855-7862, 2004
- 6) Diaz-Meyer, N. et al.: *J. Med. Genet.*, 40: 797-801, 2003
- 7) Higashimoto, K. et al.: *Cytogenet. Genome Res.*, 113: 306-312, 2006
- 8) Weksberg, R. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 10: 2989-3000, 2001
- 9) Nicholls, R. D. & Knepper, J. L.: *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2: 153-175, 2001
- 10) Kantor, B. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 13: 2767-2779, 2004
- 11) Kishore, S. & Stamm, S.: *Science*, 311: 230-232, 2006
- 12) Yamasaki, K. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 12: 837-847, 2003
- 13) Hitchins, M. P. et al.: *J. Med. Genet.*, 38: 810-819, 2001
- 14) Arnaud, P. et al.: *Hum. Mol. Genet.*, 12: 1005-1019, 2003
- 15) Gicquel, C. et al.: *Nature Genet.*, 37: 1003-1007, 2005
- 16) Weinstein, L. S. et al.: *Endocrinology*, 145: 5459-5464, 2004
- 17) Williamson, C. M. et al.: *Nature Genet.*, 38: 350-355, 2006
- 18) Mackay, D. J. et al.: *Hum. Genet.*, 110: 139-144, 2002
- 19) Ma, D. et al.: *J. Clin. Invest.*, 114: 339-348, 2004
- 20) Arima, T. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 33: 2650-2660, 2005
- 21) Fisher, R. A. & Hodges, M. D.: *Placenta*, 24 Suppl. A: S111-118, 2003
- 22) Murdoch, S. et al.: *Nature Genet.*, 38: 300-302, 2006
- 23) Holm, T. M. et al.: *Cancer Cell*, 8: 275-285, 2005
- 24) Borghol, N. et al.: *Genomics*, 87: 417-426, 2006

<筆頭著者プロフィール>

副島英伸: 1988年長崎大学医学部卒業。'92~'96年同大学大学院医学研究科(原研遺伝, 新川詔夫教授)。ニュージーランドオタゴ大学ポスドクを経て、'98年より現職。研究テーマ: ゲノムインプリントのメカニズム, 癌のエピジェネティクス。

BRIEF REPORT

Ewing Sarcoma/Primitive Neuroectodermal Tumor of the Kidney in a Child

Miho Maeda, MD,^{1*} Akio Tsuda, MD,¹ Shingo Yamanishi, MD,¹ Yoko Uchikoba, MD,¹
Yoshitaka Fukunaga, MD,¹ Hajime Okita, MD,² and Jun-ichi Hata, MD³

A 6-year-old female was admitted with abdominal pain and a mass in the right abdomen. Her lactate dehydrogenase level was 1,200 IU/L, and neuron specific enolase was 120 ng/ml. Computed tomography scan confirmed a large right renal mass with necrosis. A right radical nephrectomy was performed. The tumor was completely encapsulated. Based on small round cell histology, strong MIC-2

(CD99) positive tumor cells, and EWS-FLI-1 fusion transcript, Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney was diagnosed. Induction and follow-up with seven cycles of chemotherapy were given after surgery. She has had no evidence of recurrence 90 months from diagnosis. *Pediatr Blood Cancer*
© 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: electron microscopy; Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor; EWS-FLI-1; immunohistochemistry; kidney

INTRODUCTION

Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor (ES/PNET) of the kidney is a rare and highly malignant neoplasm. It affects young adults, and only a few pediatric cases (younger than 15 years) have been reported [1–9]. ES/PNET arising in the kidney act aggressively and show poor response to therapy [1]. ES/PNET of the kidney needs to be differentiated from other small round cell tumors of the kidney, because each type of tumor is treated differently. The diagnosis of this neoplasm is currently based on a combination of light microscopy, immunohistochemistry, electron microscopy, chromosomal analyses, and specific chimeric transcripts. Our patient, who was diagnosed by histochemistry and molecular biology analysis of the resected kidney and treated with chemotherapy, has remained alive more than 90 months after diagnosis.

CASE

A 6-year-old female was admitted to our hospital with abdominal pain and an abdominal mass. On physical examination, a large and firm mass was evident in the right abdomen. Laboratory evaluation showed a lactate dehydrogenase level of 1,200 IU/L (normal 218–411 IU/L), a neuron specific enolase level of 120 ng/ml (normal <10 ng/ml), and ferritin level of 160 ng/ml (normal 15–89 ng/ml). Urine catecholamine levels were within normal limits. Abdominal computed tomography (CT) scan confirmed a large right renal mass with areas of necrosis and bleeding. There was no obvious lymphadenopathy and no intra-abdominal metastasis. Bone scintigraphy and CT scan of the thorax did not detect metastasis.

A right radical nephrectomy was performed. The tumor involved a large portion of the lower part of the kidney. The tumor was completely encapsulated and was 5.0 × 4.5 × 4.5 cm. Lymph nodes were negative for malignancy. Histologic examination revealed a small round cell tumor

with massive necrosis, but no rosette formations. Periodic acid-Schiff (PAS) staining revealed diastase sensitive material in the tumor cell cytoplasm. Immunohistochemistry revealed that tumor cells were strongly positive for MIC-2 (CD99) as well as vimentin. The tumor cells were negative for chromogranin A, neurofilament, and synaptophysin. Electron microscopic examination showed a high nuclear-cytoplasm ratio and aggregated glycogen granules in the cytoplasm (Fig. 1A). A higher magnification of tumor cells showed neurosecretory-type granules, microtubules, and desmosome-like structures (Fig. 1B). The expression of EWS-FLI-1 fusion transcript was demonstrated by molecular biology (Fig. 2). A single 330 base pair cDNA product was detected by ethidium bromide staining, corresponding to the EWS-FLI-1 as previously reported by Sorensen et al. [10]. Direct DNA sequencing confirmed the presence of a fusion of EWS exon 7 to the FLI-1 exon 6. Unfortunately chromosomal findings failed because proliferation of the tumor cells was poor. According to results on small round cell histology and immunohistochemical profiles, electron microscopic findings, and EWS-FLI-1 fusion transcript, the tumor was diagnosed as an ES/PNET of the kidney. Therapy was initiated with 1.5 gm/m² vincristine on days 1, 8, 15, 22, 29, and 36; 500 mg/m² cyclophosphamide on days 2, 9, 30, and 37; and 0.45 mg/m² dactinomycin on days 16–20 for induction and then a total of seven cycles of 4-drug chemotherapy, consisting of 1.5 gm/m² vincristine on days 1, 15, 22, 29, 36, and 43; 0.45 mg/m² dactinomycin on days

¹Department of Pediatrics, Nippon Medical School, Tokyo, Japan;

²Department of Developmental Biology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan; ³Department of Pathology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

*Correspondence to: Miho Maeda, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan. E-mail: maeda@nms.ac.jp

Received 6 January 2006; Accepted 9 February 2006

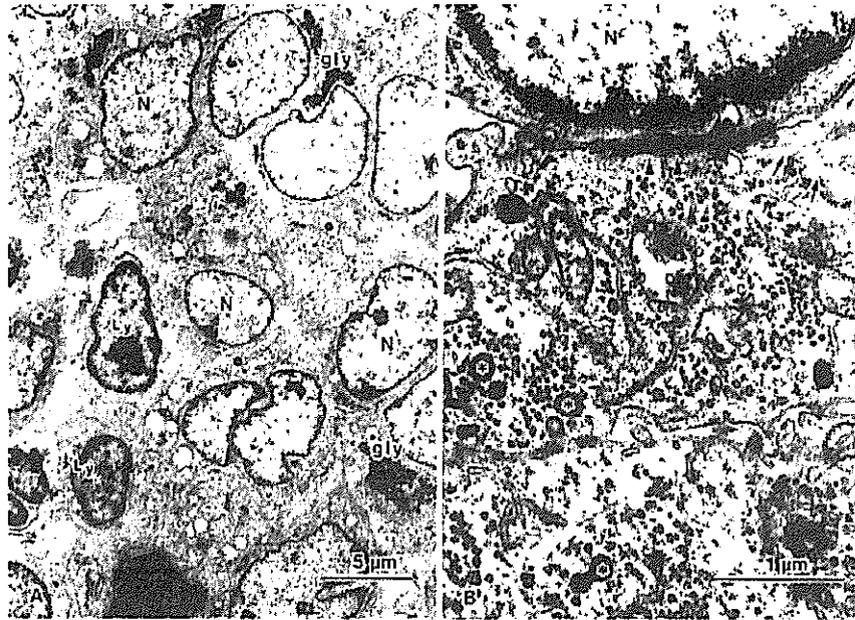


Fig. 1. Ultrastructural findings in the tumor cells. **A:** Tumor cells are oval and small (about 8–10 μm in a diameter). Nuclear-cytoplasm ratio is high. Nucleus has a few heterochromatin. Aggregated glycogen granules (gly) are observed in the cytoplasm. Ly, lymphocytes; N, nuclei. **B:** Neurosecretory granules (asterisks), microtubules (arrows), and desmosome-like structures (arrowheads) are observed in the tumor cells under higher magnification.

1–5; 500 mg/m² cyclophosphamide on days 16, 23, 30, 37, and 44; and 60 mg/m² doxorubicin on day 44 after surgery. She had no serious adverse effects during chemotherapy. She had no evidence of recurrence after 90 months from diagnosis and no late effects have been noted.

DISCUSSION

Though the existence of renal PNET was reported in 1975 in a review of pediatric PNETs [11], only a small number of

cases have been reported. Recently, Parham et al. [12] from National Wilms Tumor Study Group Pathology Center reported that 79 of 146 cases of primary malignant neuroepithelial tumors of the kidney in adults and children were considered to be ES/PNET. Follow-up information, however, was only provided for 14 of 146 cases, and it is unclear which, if any, of those were actually ES/PNET [8]. Pediatric cases (younger than 15 years old) of ES/PNET of the kidney are extremely rare, and only ten cases have been reported previously [1–9]. Clinical characteristics, pathologic features, treatments, and outcomes of those cases are summarized in Table I.

Several approaches can be used to arrive at a diagnosis of ES/PNET. The first approach is light microscopic examination of tumor tissue including immunohistochemistry. These tumors consist of primitive-appearing round cells with high nucleus to cytoplasmic ratios. The immunohistochemical features of ES/PNET are positive for CD99 (MIC2); however, expression of CD99 is by no means specific for ES/PNET among round cell tumors [13]. Although FLI-1 is a variable histochemical marker for ES/PNET, it is also positive in lymphoblastic lymphoma [14]. In contrast, WT-1 is a positive marker of Wilms tumor and desmoplastic round cell tumors, whereas it is a negative marker for ES/PNET, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma. The second approach is electron microscopic examination of tumor tissue. Electron microscopic features include a specific high nuclear-cytoplasm ratio and aggregated glycogen granules in the cytoplasm. Neural differentiation appears on some cells with polar processes, which may contain microtubules or

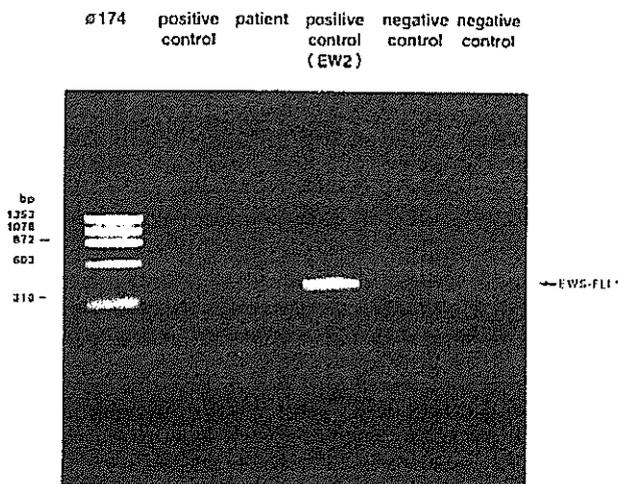


Fig. 2. A single 330 base pair transcript is detected in the patient sample following reverse transcriptase polymerase chain reactor (RT-PCR) performed on RNA extract from tumor tissue.

TABLE I. Clinical and Pathological Features of ES/PNET of the Kidney in Pediatric Cases

Case	Ref.	Age (yr)	Gender	Symptoms	Metastasis	Pathology (immunohistochemistries)	Chimeric transcript	Therapy	Outcome (follow-up [Mo])
1	1	4	F	Abdominal pain, fever	RPLN, liver	CD99(+),NSE(+),S-100(+), Ker(+),Act(-),Vim(-),Chr(-)	NS	IFC ^a ,CBP, VP-16 midation	Died (1)
2	1	14	M	Bone pain, weight loss	Lung, bone, bone marrow	CD99(+),NSE(+),Vim(+),Synapt(+) (±),S-100(-),Ker(-),Act(-),Chr(-)	EWS/FLI-1(-) EWS/ERG(-)	CY, VCR, DOX,IFO,VP-16 auto BMT	Alive (under treatment)
3	2	13	NS	Abdominal pain, hematuria	No	MIC2(+),NSE(+),Ker(-),Des(-), Act(-)	EWS/FLI-1(+)	Nephrectomy chemotherapy	NS
4	3	10	M	Abdominal mass	No	MIC2(+),NSE(+),Leu7(+), S-100(-),Ker(-), Des(-),Vim(-),Chr(-)	EWS/FLI-1(+)	Nephrectomy chemotherapy	Alive (6)
5	4	5	F	NS	IVC, right heart	NS	NS	Nephrectomy CY, VCR, DOX,IFO,VP-16	NS
6	5	15	F	Abdominal pain, abdominal distention	No	MIC2(+),Vim(+),NSE(-), S-100(-)	NS	Nephrectomy CY, VCR, DOX,IFO,VP-16	Alive (8)
7	6	9	M	Abdominal pain, abdominal mass, weight loss	No	MIC2(+),NSE(-),Vim(-),Ker(-), LCA(-)	NS	Nephrectomy CY, VCR, DOX,IFO,VP-16	Alive (relapse+)
8	7	9	F	Abdominal distention, abdominal mass	No	CD99(+),LCA(-),Ker(-),Act(-), NEM(-)	EWS/FLI-1(+)	Nephrectomy IFO,VP-16,CY,DOX,VCR auto BMT	Died (5)
9	8	11	M	Gross hematuria, abdominal mass	No	CD99(+)	NS	Nephrectomy VCR, DOX, VP-16, CY, DAC	Alive (64)
10	9	14	F	Abdominal pain, abdominal mass	IVC, right heart, liver	NS	NS	Chemotherapy	Died (24)
11	Present case	6	F	Abdominal pain, abdominal mass	No	MIC2(+),Vim(+),NFM(-),Chr(-)	EWS/FLI-1(+)	Nephrectomy VCR, DAC, CY, DOX,	Alive (90)

RPLN, retroperitoneal lymphnode; IVS, inferior vena cava; NSE, neuron specific enolase; Ker, keratin; Act, actin; Vim, Vimentin; Chr, chromogri A; MIC2, B microglobulin; Des, desmin; NFM, neurofilament; Synapto, synaptophysin; IFO, ifomide; CBD, carboplatinum; CY, cyclophosphamide; VCR, vincristine; DOX, doxorubicin; DAC, actinomycin D; BMT, bone marrow transplantation.

neurosecretory glands [15]. The third approach is chromosomal translocation, such as t(11;22) (q24;q12) which is positive in 88–95% of ES/PNET cases [16]. The final approach involves a molecular biologic examination. In 90–95% of cases of ES/PNET, the chimeric transcript is EWS-FLI-1; the remaining 5–10% are EWS-ERG. Other transcripts, including EWS-ETV1 and EWS-EIAP, have also been reported [16].

In terms of prognosis, the 5-year disease-free survival rate of ES/PNET is 45–55% [17], but the prognosis of ES/PNET of the kidney appears worse [1,18]. In pediatric cases (Table 1), 5 of 8 patients were alive when the cases were reported; however, 1 patient (no. 6) was alive with disease, 2 patients (no. 3 and no. 5) were followed-up only for 6 and 8 months, and 1 patient was under treatment (no. 9). The follow-up duration was not described in this case. Only 2 patients (no. 8 and our case) were alive after 5 years. For 2 patients, it was not defined whether they were alive or not (Table 1). Jimenez et al. [8] described that 3 of 11 patients were alive for 4–64 months, and 5 patients had local recurrence or distance metastasis then died of their disease, and 3 patients were lost to follow-up. Most of the recent therapeutic protocol for children with ES/PNET consists of vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide, ifosfamide, and etoposide. Radiation and surgery have been used; some patients have been treated with myeloablative chemotherapy followed by autologous bone marrow rescue. In spite of a lack of radiation therapy and our not using ifosfamide and etoposide for chemotherapy, our patient has survived for a relatively long period with no recurrence. Possible reasons for this good outcome might include the pathologic features of the tumor, the well-encapsulated nature of the tumor with no involvement beyond the capsule and the accurate diagnosis followed by prompt treatment with chemotherapy. Several approaches including cytogenetical methods are important for early, accurate diagnosis of ES/PNET.

REFERENCES

- Rodriguez-Galindo C, Marina NM, Fletcher BD, et al. Is primitive neuroectodermal tumor of the kidney a distinct entity? *Cancer* 1997;79:2243–2250.
- Quezado M, Benjamin DR, Tsokos M. EWS/FLI-1 fusion transcripts in three peripheral primitive neuroectodermal tumors of the kidney. *Hum Pathol* 1997;28:767–771.
- Takeuchi T, Iwasaki H, Ohjima Y, et al. Renal primitive neuroectodermal tumor: A morphologic, cytogenetic, and molecular analysis with the establishment of two cultured cell lines. *Diag Mol Pathol* 1997;6:309–317.
- Hasanbegovic E, Terzic R, Sabanovic S, et al. Ewing's soft-tissue sarcoma—case report. *Med Arh* 1998;52:157–158.
- Antoneli ABG, Coasta CML, de Camargo B, et al. Primitive neuroectodermal tumor (PNET)/extraosseous Ewing sarcoma of the kidney. *Med Ped Oncol* 1998;30:303–307.
- Kuczynski AP, Gugelmin ES, Netto RAS. Primitive neuroectodermal tumor of the kidney in children. *J Ped (Rio J)* 2001;77:49–51.
- Vicha A, Stejskalvo E, Sumerauer D, et al. Malignant peripheral primitive neuroectodermal tumor of the kidney. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;139:67–70.
- Jimenez RE, Folpe AL, Laspham RL, et al. Primitive Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney. *Am J Surg Pathol* 2002;26:320–327.
- Ng AWH, Lee PSF, Howerd RG. Primitive neuroectodermal kidney tumor. *Austral Radiol* 2004;48:211–213.
- Sorensen PHB, Liu XF, Delattre O, et al. Reverse transcriptase PCR amplification of EWS/FLI1 fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Diagn Mol Pathol* 1993;2:147–157.
- Seemayer TA, Thelmo WL, Bolande RP, et al. Peripheral neuroectodermal tumors. *Perspect Pediatr Pathol* 1975;2:151–172.
- Parham DM, Roloson GJ, Feely M, et al. Primary malignant neuroepithelial tumors of the kidney. *Am J Surg Pathol* 2001;25:133–146.
- Stevenson A, Chatten J, Bertoni F, et al. CD99 (p30/32MIC2) neuroectodermal/Ewing's sarcoma antigen as an immunohistochemical marker. Review of more than 600 tumors and literature experience. *Appl Immunohistochemistry* 1994;2:231–240.
- Folpe AL, Hill CE, Parham DM, et al. Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: A study of 132 round cell tumors with on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Am J Surg Pathol* 2000;24: 1657–1662.
- Suh CH, Ordonez NG, Hocks J, Mackay B. Ultrastructure of the Ewing's sarcoma family of tumor. *Ultrastruct Pathol* 2002;26:67–76.
- Stephenson CF, Bridge JA, Sandberg AA. Cytogenetic and pathologic aspects of Ewing's sarcoma and neuroectodermal tumors. *Human Pathol* 1992;23:1270–1277.
- Kushner BH, Hajdu SI, Gulati SC, et al. Extracranial primitive neuroectodermal tumors: The memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Cancer* 1991;67:1825–1829.
- Benesch M, Urban C. Is primitive neuroectodermal tumor of the kidney a distinct entity? *Cancer* 1998;82:1414–1415.

Case Report

Desmoplastic small cell tumor of soft tissue: Molecular variant of *EWS-WT1* chimeric fusion

Minoru Hamazaki,¹ Hajime Okita,² Jun-ichi Hata,³ Shin-ichi Shimizu,⁴ Hiroshi Kobayashi,⁴ Katsuhiko Aoki⁵ and Taemi Nara⁶

Departments of ¹Pathology, ⁵Radiology and ⁶Oncology, Shizuoka Children's Hospital, Shizuoka, ²Department of Developmental Biology, National Research Institute for Child Health and Development, ³National Center for Child Health and Development, Tokyo and ⁴Department of Pathology, Seirei Hamamatsu General Hospital, Hamamatsu, Japan

A 7-year-old girl was hospitalized because of a tumorous mass in her left periorbital region. The tumor was removed by local excision. The soft-part tumor recurred in the parotid gland region 4 months later, and a second recurrence was noted on the left side of the neck 3 years and 3 months thereafter. The patient had not received chemotherapy or local irradiation. Histological and immunohistochemical examinations of the recurrent masses revealed morphological characteristics of small cell proliferation with desmoplastic stroma that were similar to those of the initial tumor. The cellular components showed immunoreactivity for desmin, cytokeratin, vimentin, and epithelial membrane antigen in part, but the cells were negative for myogenin, CD99, and neuron-specific enolase. These findings suggested a diagnosis of desmoplastic small cell tumor, despite its extra-abdominal location. The histological diagnosis was confirmed by reverse transcriptase polymerase chain reaction, which demonstrated an *EWS-WT1* chimeric fusion gene. An in-frame fusion of *EWS* exon 9 and *WT1* exon 8 was subsequently identified by cloning and sequencing. The chimeric fusion gene might be related to the tissue-specific phenotype of desmoplastic small cell tumors, although further investigation of this speculation is necessary.

Key words: desmoplastic small cell tumor, *EWS-WT1* fusion transcript, extra-abdominal

Desmoplastic small cell tumor (DSCT) occurs usually in the intra-abdominal region of children or adolescents and consists of proliferating small cells with a desmoplastic stroma. DSCT is also characterized by the presence of an *EWS-WT1* chimeric fusion transcript, typically confirmed by

reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR). Tumors with similar histological appearances have been reported in other soft tissues,¹ but such tumors are extremely rare. Here, we describe a patient with a desmoplastic small cell tumor that developed primarily in the orbital soft tissue.

CLINICAL SUMMARY

A 7-year-old girl complained of an insidious swelling in the soft tissue of her left upper eyelid. On hospitalization, a reconstructed CT image revealed a partially calcified, low-density mass in the upper lateral aspect of the left orbital region (Fig. 1). The mass was excised surgically. The patient was not treated with systemic chemotherapy or local irradiation.

Four months after the initial surgery, a local recurrence was detected in the left periorbital region. A CT image revealed an irregular mass, measuring 26 × 20 mm in greatest diameter, with central low-density and calcified foci; the mass was located near the upper aspect of the left parotid gland (Fig. 1). Systemic gallium citrate scintigraphy demonstrated an abnormally localized accumulation at the mass lesion, but no distant metastases were noted. The local tumor was completely re-excised surgically, and the patient was carefully followed thereafter. Chemotherapy or irradiation was not performed.

Three years and 3 months later, at the age of 11 years, the patient was again hospitalized because of a second recurrence in her left lower neck region. CT showed a tumorous lesion located between the left lower margin of the parotid gland and the piriform fossa. The main cervical recurrent tumor and nodal metastases were removed. The tumorous tissue weighed 38.9 g in total. The patient has been followed for 8 months and has shown no signs of local recurrence,

Correspondence: Minoru Hamazaki, MD, Department of Pathology, Shizuoka Children's Hospital, 860 Urushiyama, Aoi-ku, Shizuoka 420-8660, Japan. Email: mhamasan@sch.pref.shizuoka.jp

Received 13 March 2006. Accepted for publication 1 May 2006.
© 2006 Japanese Society of Pathology

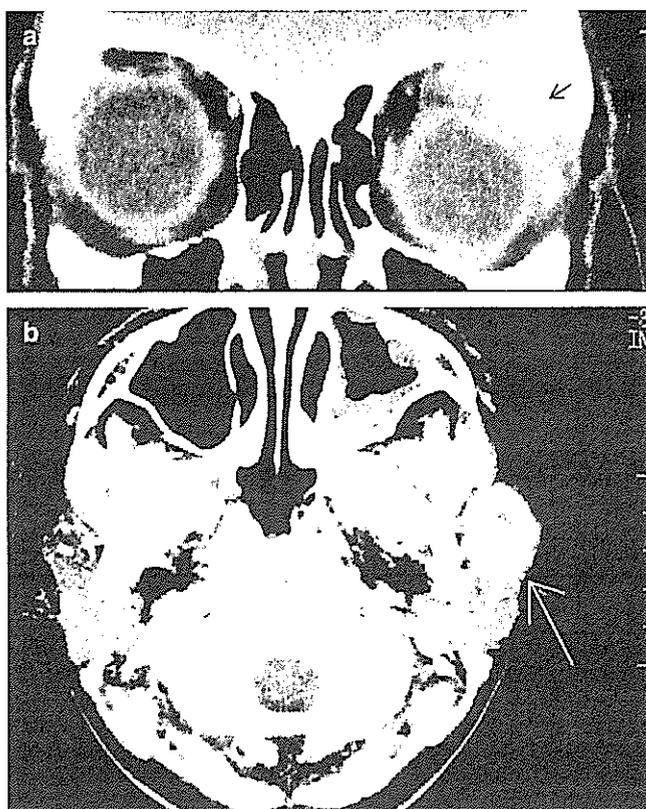


Figure 1 Radiological appearance. (a) The initial tumor mass (arrow) is visible in the left upper lateral aspect of the orbital region as a partially calcified, low-density mass on a CT image. (b) CT of the first recurrence showing an irregular mass (arrow) with a central low-density area near the upper aspect of the left parotid gland.

although the possibility of future recurrence cannot be ruled out.

PATHOLOGICAL FINDINGS

A conventional morphological examination was performed using formalin-fixed paraffin sections stained with HE. Histological examination of the primary tumor suggested an epithelial neoplasm, like a lacrimal gland carcinoma or an adenoid cystic carcinoma, or a rhabdomyosarcoma or metastasis of an abdominal tumor. The first recurrent tumor was characterized by conspicuously atypical small cell proliferation, forming solid cellular nodules or trabecular, basaloid epithelial lesions, and was accompanied by prominent interstitial fibrous intervention (Fig. 2). The tumorous tissue was intermingled with the ducts of the parotid gland, and the tumor itself was located adjacent to the serous acini of the parotid gland. The second recurrent main tumor exhibited diffuse cellular proliferation but did not have a desmoplastic stroma. The nodal metastases in the lower portion of the left neck, however, exhibited a distinct desmoplastic morphology similar to that of the first recurrent

tumor. These histological findings were consistent with a desmoplastic small cell tumor of soft tissue with divergent differentiation, and were almost identical to those of the initial orbital tumor.

Immunohistochemical study

The immunohistochemical investigation was performed using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and the streptavidin-biotin peroxidase indirect method. Primary antibodies were prepared against the following antigens: desmin (clone DE-R-11, diluted 1:50; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), cytokeratin (AE1/AE3, diluted 1:50, proteinase K-treated; DakoCytomation), vimentin (Vim3B4, diluted 1:50, microwave-treated; DakoCytomation), epithelial membrane antigen (EMA; E29, diluted 1:50; DakoCytomation), myogenin (F5D, diluted 1:50, microwave-treated; DakoCytomation), WT1 (C-19, diluted 1:50, proteinase K-treated; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CD99 (F5D, diluted 1:50; DakoCytomation), sarcomeric actin (α -Sr-1, diluted 1:40; DakoCytomation), CD45 (T29/33, diluted 1:50; DakoCytomation), glial fibrillary acidic protein (GFAP; 6F2, diluted 1:50, microwave-treated; DakoCytomation), neuron-specific enolase (NSE; BBS/NC/VI-H14, diluted 1:50; DakoCytomation), S-100 protein (rabbit polyclonal, diluted 1:400; DakoCytomation), Ki-67 antigen (MIB-1, diluted 1:50, microwave-treated; DakoCytomation), and P53 (PAb240, diluted 1:50, microwave-treated; DakoCytomation).

The solid areas of the first and second recurrent tumors were positive for vimentin, but the trabeculae were negative. In contrast, the trabecular or epithelioid components were positive for EMA, but the solid cellular area was negative. Distinct positive immunoreactivity for desmin and cytokeratin was expressed in the cytoplasm of the small tumor cells in both the solid cellular and trabecular architectures (Fig. 3). No evidence of myogenin, WT1, CD99, sarcomeric actin, CD45, GFAP, NSE, or S-100 protein positivity was seen. Ki-67 labeling index was 40–60% in the solid area of tumor and 10–20% at the trabeculae. P53 labeling index was <1–5%.

Electron microscopy

The electron microscopy specimens were prepared using conventional 2% glutaraldehyde and 1% osmium tetroxide fixation followed by epoxy embedding. Ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate were then observed using a JEM 1010 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

The tumor cells were characterized by prominent desmosome-type intercellular junctions with tonofilaments (Fig. 4). A small amount of intermediate fibrils without striated muscle