

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に関する分子情報の体系的解析と、
その知見に基づく診断治療法の開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清河 信敬

平成20(2008)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に関する分子情報の体系的解析と、 その知見に基づく診断治療法の開発に関する研究	-----	1
清河信敬		

II. 分担研究報告

1. 難治性小児がんの網羅的糖鎖・ゲノム解析とその臨床応用	-----	17
清河信敬		
2. 小児がんの中央診断と保存検体を活用したトランスレーショナルリサーチ	-----	22
藤本純一郎		
3. 小児がんの遺伝子変異解析と治療モデルの開発	-----	27
林泰秀		
4. 小児がんの網羅的ゲノム解析による治療標的分子の探索	-----	34
小川誠司		
5. ゲノム・遺伝子発現情報からみた小児がんの臨床的特性の解明	-----	38
大平美紀		
6. 難治性小児がんの悪性度診断	-----	41
中川温子		
7. 難治性小児がんの薬物代謝関連遺伝子多型解析とその臨床応用	-----	44
森鉄也		
8. 難治性小児がんの臨床的特性の解析と新規診断・治療法開発	-----	48
大喜多肇		
9. 小児造血器腫瘍の遺伝子診断と分子モニタリングに関する研究	-----	52
横澤敏也		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 55

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 59

難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報の体系的解析と、
その知見に基づく診断治療法の開発に関する研究

主任研究者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部長

研究要旨： 本研究は、難治性小児がんの治療予後向上を目指して、その臨床的特性に関する分子情報の体系的解析を行い、得られた知見を診断治療法開発に応用することを目的とする。

小児がん臨床検体を用いた包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）に着手した。（1）神経芽腫、T細胞性リンパ芽球性白血病（T-ALL）について、高密度SNPアレイと独自開発したアルゴリズムを用いたゲノムコピー数異常・アレル不均衡のゲノムワイドなマッピングを行い、神経芽腫のゲノム変異の特徴を明らかにするとともに *MYEOV* と *NEGR1* が新たな標的因子の候補であることを示し、T-ALL について複数のゲノム異常集積点の候補領域を同定した。（2）肝芽腫、Wilms 腫瘍について小児がん特化 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析を実施し、それぞれに特徴的な遺伝子発現プロファイルを明らかにして、その鑑別診断や治療予後層別化への応用の可能性を示した。（3）小児急性骨髄性白血病（AML）について、診断時検体のスクリーニングにより本邦症例での *AML1-ETO* を始めとするキメラ遺伝子の発現頻度を明らかにし、同遺伝子のモニタリングが治療反応性の指標となる可能性を示した。また、*FLT3*、*KIT*、等の遺伝子変異と予後との関係を明らかに、*WT1* 遺伝子の発現と病態との関係を明らかにした。（4）小児 ALL 症例の体系的表面抗原解析を行い、特定の aberrant 抗原の発現様式と、キメラ遺伝子発現との関係やリスク分類との関係について明らかにした。（5）悪性リンパ腫細胞株における細胞周期・増殖関連タンパクの発現解析を行い、病型亜群内での発現の多様性を見いだした。（6）液体クロマトグラフィー質量分析による小児がん細胞の網羅的発現糖鎖解析測定系を確立し、ALL 臨床検体に対して発現糖鎖解析を行い、各病型特異的な糖鎖発現様式の存在を示した。

小児がん治療研究の根幹となる、診断の標準化や臨床検体のバイオリソース構築を目的として、中央診断・検体保存システムの構築、整備を行った。（7）難治性小児がんにおける腫瘍生物学的特性を指標とした悪性度診断を確立するために、悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫などの小児がんにおける中央診断システムを確立し、診断法の標準化を試みた。小児がん保存検体の匿名化システムを整備し、小児固形腫瘍の検体保存、白血病のマーカー中央診断および検体保存を行った。今後の重要な課題として、保存検体の研究への有効活用のための体制整備や、基礎研究の成果を中央診断に積極的にフィードバックして行くことが挙げられる。（8）後者の一例として、新たな治療層別化因子として着目されている小児 ALL 治療8日目の末梢血残存白血病細胞の絶対数をフローサイトメトリーにより自動的に測定する検査システムを導入し、実際に小児 ALL 治療研究の付随研究として臨床検体に対する測定を開始した。また、小児 ALL に対する薬物治療の効果、毒性の個体差と薬物代謝関連分子の遺伝子多型の関連を検証する研究計画を立案し、準備を開始した。

基礎実験系を用いた小児がんの病態モデルの開発と解析を行った。（9）難治性小児がんの一つである Ewing 肉腫に対して骨髄間葉系前駆細胞を用いた発症モデル系 UET-13/TR/EWS/ETS を確立して解析し、EWS/ETS 融合遺伝子の腫瘍発生における機

能を検討し、新たな EWS/ETS キメラ遺伝子の標的遺伝子として DKK2 を同定、その腫瘍化における機能解析に着手した。

今後さらに、各分子解析結果の意義ならびに生物学的特性との関係について明らかにし、診断や治療における標的因子探索へ応用していくことで、難治性小児がんの治療成績向上に貢献することを目指す。また、小児がんのトランスレーショナルリサーチを支えるための基盤研究として中央診断と検体保存システムの整備を推進する。

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

林泰秀

・群馬県立小児医療センター院長

小川誠司

・東京大学大学院医学系研究科

21 世紀 COE プログラム特任助教授

大平美紀

・千葉県がんセンター 生化学研究部

ゲノムセンター室長

中川温子

・国立成育医療センター臨床検査部

病理検査室医長

森鉄也

・国立成育医療センター特殊診療部

小児腫瘍科医長

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

横澤敏也

・独立行政法人国立病院機構名古屋医

療センター臨床研究センター血液・

腫瘍研究部遺伝子診断研究室長

を分子レベルで明らかにしていくことが必要である。これに関して、小児がんに対する小児がんに対して遺伝子異常の発見や網羅的発現遺伝子解析が進み、その成果の臨床への還元が試みられているが、十分な治療成績改善には結びついておらず、一部の小児がんは依然予後不良である。このような現状の克服には、上記解析に加え、全ゲノム的な遺伝子構造やエピゲノムの異常、蛋白糖鎖発現等の生体分子情報を網羅的に解析し、小児がんの臨床的特性にかかわる異常を包括的に解明していくことが必須である。また、人種差を考慮すると我国独自の研究の推進が必要である。

そこで本研究では、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫、Wilms 腫瘍、神経芽腫、難治例や再発例を含む小児白血病等の臨床検体に対し、包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）を行って、難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報を網羅的に明らかにし、その知見に基づいた新規診断・治療法開発を行う。特に、急速な進展や再発を繰り返す亜型の分子特性を明らかにし、QOL 改善を目標とした予後予知法確立や新規治療モデルの提示を目指す。

小児がんは、成人のがんと比較した場合、発生頻度としては非常に低く、症例数も少ない希少疾患であり、上記目的を達成するためには、全国的規模の臨床共同研究の枠組みの中で中央診断および検体保存を行い、保存された臨床検体を有効に基礎研究に活用することが不可欠である。また、このようなシステムを構築することにより、基礎研究で得られた知見を診断・治療面で臨床へフィードバックすることが容易になり、トランスレーショナルリサーチの推進にも寄与するも

A. 研究目的

小児がんは小児期の死因の上位を占め、小児および成育医療領域では非常に重要な疾患である。近年の集学的治療法の進歩により、その一部では適切な治療を行えば完全治癒が期待され得る状況になっており、発症時に正確に診断し、完全治癒を目指した適切な治療法を選択するとともに、各症例の治療反応性に応じて QOL を考慮した治療層別化を体系的に行っていくことが今後の課題となっている。

この課題を達成するためには、各小児がん疾患あるいは各症例の生物学的特性

のと期待される。しかし、本邦においては、小児がんの登録システムさえも十分に確立されていないのが現状である。そこで本研究では、種々の小児固形腫瘍および白血病・リンパ腫に対する中央診断と検体保存のシステムを構築するとともに、診断や治療層別化に応用可能な研究的検査法を開発して臨床に還元する研究も合わせて実施する。

本研究の実施によって、小児がんの臨床特性に関連する分子情報が明らかになり、その成果が新たな分子標的の同定に結びついて、診断法の標準化や新規治療戦略を提案することが可能となり、難治性小児がんの治療成績向上に寄与でき、小児がんの予後や QOL が改善され、健全な次世代を育む環境整備が可能となる。以上により、厚生労働行政にも貢献することができる。

B. 研究方法

1. ゲノム異常の網羅的探索：

腫瘍試料から抽出したゲノム DNA について、GenChip 50K/250K アレイと小川らが開発した CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いて、平均解像度 24kb~6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数の解析を行った。解析結果について、FISH 解析、real-time PCR 解析、Heteroduplex mobility assay 法、直接塩基配列決定法による変異解析により腫瘍化との関連性のさらなる検証を行い、培養細胞を用いた発現導入解析やノックダウン解析によって標的遺伝子の性状解析を試みた。

2. 小児がん特化 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析：

小児がん由来のオリゴキャッピング cDNA ライブラリーより抽出された約 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、凍結腫瘍組織から調製した total RNA を用いて遺伝子発現解析を行った。得られたデータから、患者予後と統計的に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。

3. AML の遺伝子解析：

初診時および治療開始後の患児検体か

ら RNA 抽出を行い、定量的 RT-PCR 法によって急性骨髄性白血病での代表的な 8 種類のキメラ遺伝子の測定を行った。また、reverse transcriptase (RT)-PCR/直接塩基配列決定法による *FLT3*、*KIT*、等の遺伝子の変異解析と real-time PCR 法による *WT1* 遺伝子の発現解析の結果と予後との関係を検討した。

4. 小児 ALL のマーカー解析：

初診時検体に対して 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。lineage 決定・病型診断に必要な項目に加え、様々な機能分子に対する抗体についても解析を行った。

5. 悪性リンパ腫、神経芽腫の発現タンパク解析：

悪性リンパ腫、神経芽腫細胞株での細胞周期・増殖関連タンパクの発現をイムノブロット解析により検討した。

6. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

小児 ALL 細胞から抽出した糖脂質を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) によって解析する測定系について条件決定を行った。実際に小児白血病臨床検体を用いた解析を行い、オンライン質量分析によって発現糖鎖パネルを作成した。

7. 小児がんの検体保存中央診断システムの整備：

小児がんの治療を効率的に開始するために、中央病理診断の迅速化を目的とした、Rapid Review (2 週間以内に報告) と Group Review (コンセンサス診断による最終診断) による中央病理診断システムにより、病理診断を行った。それぞれの小児がんの組織型に応じた免疫組織化学染色パネルを作成した。また、送付されてきた検体の登録、検査データおよび余剰検体試料の保管、匿名化管理、等の実地に即した方法について検討を行った。

小児 ALL に対する薬物治療の効果、毒性の個体差と薬物代謝関連分子の遺伝子多型の関連を前方視的に検証する研究を立案し、実施に向けた準備を開始した。

8. 末梢血残存白血病細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

基本的に上記 4.の方法に従い、ALL 患児から治療開始後 8 日目に採取された末梢血液検体について蛍光標識ビーズ(Flow-Count)を用いたフローサイトメトリー解析により残存白血病細胞を検出、算定した。

9. Ewing 肉腫発症モデル系の確立と解析：

Ewing 肉腫の発生母地と想定される未熟な間葉系細胞を用いて tetracycline 誘導性に Ewing 肉腫特異的キメラ遺伝子を発現する細胞を樹立し、ヌードマウス移植による腫瘍形成、Soft agar 上での colony 形成能、遊走能、Matrigel 内での浸潤能の測定を行った。また、小児腫瘍細胞株を用いたトランスクリプトーム解析を行い、Ewing 肉腫のみに特異的に発現が高い分子を選択した。選択された分子に対し、定量 PCR 法やレポーターアッセイによる検証を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

動物実験についても、同様に関連法規を遵守して動物愛護と動物福祉の観点に立った倫理的配慮をおこない、あらかじめ当該研究施設の動物実験委員会へ実験の実施について申請し、承認を得てから行った。

C. 研究結果

1. ゲノム異常の網羅的探索：

神経芽腫 (MYCN 増幅群 29 例、非増幅群 26 例、計 55 例) のゲノム解析では 49 例に複数の異常が検出された。最も高頻度なゲノム変異は 17q の増幅であった (全検体中 80%)。また MYCN 増幅と 1p の LOH には有意な相関が認められた ($P < 0.001$)。染色体 2p、1q および 7q の増幅もそれぞれ高頻度に検出され、特に MYCN 非増幅群に頻度が高い傾向がみられた。MYCN を含む 2p24 領域の高度増幅は神経芽腫において最も有名なゲノム変異であるが、今回のゲノムアレイの解析結果から、この領域は極めて複雑なゲノ

ム構造であることが判明した。11q13 領域の高度増幅例の解析から MYEOV が、1p31 領域のホモ欠失例の解析から NEGR1 が神経芽腫における新たな標的因子候補として同定され、その機能的な検証を行った。

T-ALL の臨床検体 63 例の網羅的なゲノムコピー数の解析を行った結果、4 例以上に共通して欠失あるいは増幅のコピー数の異常を認めた領域が 45 カ所 (従来報告されていない領域を含む) 存在し、T-ALL のゲノムにおける微小異常の集積点の候補と考えられた。

2. 小児がん特化 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析：

小児がん特化 DNA チップを用いて、肝芽腫 80 症例、Wilms 腫瘍 44 症例の網羅的遺伝子発現解析を行った。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 ($p < 0.001$)。Wilms 腫瘍については、病理組織像が類似し臨床区別が容易でない神経芽腫、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫の組織との遺伝子発現プロファイル比較も行い、それぞれの腫瘍に特徴的な発現パターンを示す遺伝子の選別を進めた。選択された遺伝子の発現パターンを組み合わせることで、発現プロファイルを用いた腫瘍の鑑別診断への応用に展開できると期待される。

3. AML の遺伝子解析：

AML 診断時に施行したキメラ遺伝子スクリーニングにおいて、解析した 110 例中 AML1-ETO 27 例、CBF β -MYH11 6 例、MLL-AF6 1 例、MLL-AF9 11 例、MLL-ELL 1 例、TLS/FUS-ERG 1 例、PML-RAR α 2 例のキメラ遺伝子が検出された (計 49 例 /44%)。このうち、AML1-ETO 陽性例について治療後のキメラ遺伝子の経時的なモニタリングによる MRD 解析を行った結果、寛解導入療法第 1 コース後の MRD は治療前に比しておよそ 10^3 に減少しているが、症例間での差が大きく、寛解導入療法第 2 コース以降の微小残存病変(MRD)は緩徐な低下を示す傾向がみられた。

AML の遺伝子異常と予後との関係について検討し、FLT3-ITD 陽性例は有意に予後不良であること、KIT 遺伝子変異陽性例

は陰性例より有意に予後不良であること、等を明らかにした。*WT1* 遺伝子の発現解析では、初診時の *WT1* の値は予後とは関連しなかったが、*FLT-ITD* 異常と関連していた。寛解時の MRD の解析では *WT1* の値は予後と関連しており、今後 RMD による治療の層別化ができる可能性が示唆された。

4. 小児 ALL のマーカー解析：

小児-ALL 309 例の ALL 症例を解析した結果、B 前駆細胞性 ALL (Precursor B-ALL) 85.0%、T 細胞性 ALL (T-ALL) 12.0%、分類不能等その他 3.0%であり、Precursor B-ALL の半数以上に他の細胞系統の抗原 (aberrant 抗原) の発現を認めた。キメラ遺伝子発現と各 aberrant 抗原の発現を解析した結果、CD66c の発現は BCR-ABL 以外のキメラ遺伝子が発現する症例では認められず、CD10-で CD99+, CD65+ は MLL-AF4 に、CD99+, CD33+ は ETV6-AML に特徴的である等、各 aberrant 抗原の発現様式とキメラ遺伝子の発現には一定の関係があることが明らかとなった。この他、7.1 抗原の発現は MLL-AF4 に特徴的であり、CD2 あるいは CD56 陽性の症例はそのほとんどが高危険群の症例であった。

5. 悪性リンパ腫、神経芽腫の発現タンパク解析：

Burkitt リンパ腫 7 株と Anaplastic large cell リンパ腫 (ALCL) 4 株神経芽腫 7 株について、Rb、リン酸化 Rb、p16、p21、p27 の発現をイムノブロット解析により検討した結果、それぞれの群で、各タンパクの発現様式に多様性を認めることが明らかとなった。

6. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

LC-MS を用いて、小児白血病細胞臨床検体から抽出した糖脂質糖鎖を網羅的に解析する測定条件を確立した。この測定環境を用いて実際に、成熟 B-ALL 3 例、T-ALL 2 例、乳児白血病 2 例、Precursor B-ALL 2 例の発現糖鎖解析を行った。この結果、従来発現が報告されていない糖鎖の発現が明らかになった他、各白血病の病型ごとに、糖鎖発現様式に特徴があることが示された。

7. 小児がんの検体保存中央診断システムの整備：

日本小児白血病研究会 (JPLSG) の悪性リンパ腫登録症例 319 例 (うち、コンセンサス診断に至った症例 191 例)、日本神経芽腫研究グループ (JNBSG) の神経芽腫登録症例 33 例、日本横紋筋肉腫研究グループ (JRSG) の登録症 38 例について中央病理診断システムにより、病理診断を行った。

検体保存の際の匿名化システムを整備した。実際にこのシステムを運用し、Ewing 肉腫 5 例、横紋筋肉腫 26 例、小児腎腫瘍 33 例、悪性リンパ腫 51 例の組織検体保存、乳児白血病 21 例の細胞保存、ALL 169 例と AML 49 例のマーカー中央診断と細胞保存を行った。

8. 末梢血残存白血病細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーによる自動算定法を用いて、ALL 患児 37 例の Day-8 末梢血中残存白血病細胞数算定を行った。末梢血中には通常存在し得ない表面マーカーを有する症例 (CD10+ALL や、aberrant 抗原を発現する症例) の場合には、残存白血病細胞の検出は容易であった。

9. Ewing 肉腫発症モデル系の確立と解析：

U-ET13/TR/EWS/FLI1 および/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、soft agar 上でのコロニー形成能を認めず、遊走能にも有意な変化は認めなかったが、キメラ遺伝子の発現によってマトリゲル中を浸潤する能力が有意に上昇した。

トランスクリプトーム解析より Ewing 肉腫のみで高発現の DKK2、低発現の DKK1 (低発現) を同定し、定量 PCR 法でさらに確認した。UET-13/TR/EWS/FLI1 および/ERG 細胞を用いた解析により EWS/ETS がこれらの遺伝子の発現調節を行っていることを確認し、レポーターアッセイによって DKK2 の転写調節領域のうち 2ヶ所の ETS 認識配列がこの調節に関与していることを明らかにした。

考察

1. ゲノム異常の網羅的探索：

神経芽腫における *molecular allelo-karyotype* 解析の結果、神経芽腫に最も特徴的なゲノム変異は 17 q の *gain*、*MYCN* 領域の増幅および 1p の欠失で従来の報告通りであった。これらの異常をもたない腫瘍では 1q、2p および 7 番染色体の *gain* が比較的選択的に生じていたことから、進行神経芽腫はゲノム上複数の *subtype* が存在する可能性が示唆された。本研究で *MYCN* 領域の複雑な構造が明らかとなったが、*amplicon* を有する新鮮腫瘍 6 例中 3 例では *MYCN* を含む比較的大きな一続きの *amplicon* が検出されたことから、2p24 領域の複数の小さな *amplicon* は、腫瘍の進展の過程で大きな *amplicon* から派生した可能性が推測され興味深い。これらの *amplicon* に最も共通して含まれる遺伝子は *MYCN* であるが、それ以外にも *NAG*、*NSE*、*ROCK2* などが含まれていることが判明し、これらの遺伝子も腫瘍の進展に関与している可能性が示唆された。11q13 領域では *CCND1* が標的がん遺伝子と考えられているが、本研究で神経芽腫における同領域の共通増幅領域に唯一 *MYEOV* が存在することが明らかとなった。この遺伝子は多発性骨髄腫より同定されたがん遺伝子であり、培養細胞を用いた機能解析からも *MYEOV* が神経芽腫の新たながん遺伝子である可能性が示唆された。またホモ欠失領域内にみいだされた *NEGR1* はホモ欠失と染色体切断という 2 つ異なるメカニズムによって不活化されている可能性が考えられ、定量発現解より神経芽腫の新たな予後を規定する遺伝子である可能性が示唆された。特に *NEGR1* の発現導入により細胞増殖の抑制が認められたことから、この遺伝子は神経芽腫の進展に関与する標的遺伝子である可能性が推定された。

T-ALL のゲノム構造解析を行い、異常の集積点の候補領域を複数同定した。今後、それぞれの領域について *validation* を行い、実際にゲノム異常が集積していることを確認するとともに、その意義や生

物学的特性との関係について明らかにして行く。また、Wilms 腫瘍 50 例についても同様の解析を開始した。

2. 小児がん特化 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析：

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と期待される。また、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。小児腫瘍は症例数が少ない上に観察期間も長期に渡るため、研究の基盤となる組織バンクの構築や、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と密に連携しながら質の高い臨床情報を収集し解析に組み合わせることが最重要課題である。

3. AML の遺伝子解析：

今回の小児 AML110 例の診断時のキメラ遺伝子スクリーニングでは 27 例において *AML1-ETO* のキメラ遺伝子が検出され（約 25%）、成人と同様に我が国の AML での頻度は、欧米の報告と比べて高い傾向にあると考えられ、今後染色体分析結果との比較が必要である。同遺伝子を対象に解析した場合、寛解導入量法終了時の MRD には症例間での差がみられるため、個々の症例における治療反応性を判定する指標として用いることが可能であるか、現在解析を進めている。小児 AML では高い完全寛解率を得られるため、寛解例での治療反応性を更に分類することができれば、予後判定への応用が期待される。

今回、小児の AML において、t(8;21)-AML のみならず全体としても *KIT* 遺伝子変異は予後不良因子であることが明らかになった。JPLSG で現在行われている AML-05 プロトコールでは、*FLT3-ITD* は予後因子として層別化に用いられることになり、陽性例は造血幹細胞移植の対象

となったが、*KIT* 遺伝子は AML-05 では付随研究として前方視的に研究し、その結果によって治療の層別化に用いるようにする予定である。

近年転写因子の異常(クラス I 変異)と細胞増殖に関わる遺伝子の異常(クラス II 変異)変異が白血病発症に必須と考えられている。これまでの解析結果より 11q23-AML の進展には *FLT3-ITD* のみならず *MLL-PTD* がクラス II 変異の役割を担う可能性が示唆された。*MLL-PTD* の小児 AML での意義は今後多数例での前方視的検討が必要と考えられる。成人の AML では初診時の *WT1* の値と予後が相関するとする報告と相関しないとする報告があるが、今回の我々の結果は予後とは相関しなかった。しかし、寛解時の *WT1* 値(MRD)は予後と相関していた。

4. 小児 ALL のマーカー解析 :

今回の検討の結果、**aberrant** 抗原の発現様式がキメラ遺伝子の発現と一定の関係を示すことや、一部の **aberrant** 抗原を発現する群は高危険群に含まれる症例の頻度が非常に高いことが示唆された。近年の小児 ALL 治療プロトコールにおいては、一般に、予後と明確に関連する表面マーカー抗原は存在しないと考えられている。しかし、治療法の進歩や、新たな細胞表面抗原を認識する抗体の導入に伴い、予後と相関するものも存在する可能性があると考えており、今後、診断用の抗体のパネルとは別に、ALL の予後や生物学的特性と関連した抗原の発現様式について、さらに検討を進める

5. 悪性リンパ腫、神経芽腫の発現タンパク解析 :

Burkitt リンパ腫、**anaplastic large cell lymphoma**、神経芽腫については、細胞株における予備実験から、これらの腫瘍に共通して p16 発現がみられないことが判明した。それぞれの症例での発現解析や動物モデルを用いた腫瘍発生や腫瘍進展の検討により、細胞周期関連分子の小児がんにおける意義を究明していく予定である。今後は病理組織診断と分子レベルでの生物学的特性と予後を総合的に解析することにより、悪性度診断に基づいた

予後予測法、新規治療法の開発が期待される。

6. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析 :

糖鎖はその細胞機能における重要性が着目され、がん細胞においても、浸潤や転移等の機能と密接に関連していることが報告されている。しかし、これまで微量の検体に対する解析の手段に乏しかったことから小児がんにおけるその解析はほとんど報告がなかった。今回確立した LC-MS による発現糖鎖解析法は、微量の検体を用いて構造推定まで行うことが可能であり、実際に小児白血病細胞において各病型に特異的な糖鎖発現様式の存在が示唆された。今後の発現糖鎖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。

7. 小児がんの検体保存中央診断システムの整備 :

悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫等の検体保存を含めた中央病理診断システムはほぼ確立し、標準的診断法も免疫組織化学染色パネルを含め概ね統一できた。それぞれの小児がんにおいて、典型的な病理組織像や免疫形質を示さない症例についてさらに詳細な生物学的特性の検討を加えることにより、新規病型や予後予測因子の抽出が可能と思われる。

今後は、各小児がん治療研究グループとの一層の連携を図り、全国規模での中央診断と検体保存を疾患ごとに順次目指して行く。各グループとの連携の上でこれらの検体を基礎研究の試料として有効に活用していくシステムや枠組みの確立も重要な課題である。

薬物代謝関連分子の遺伝子多型の頻度は人種により異なることが知られている。また、ALL に対する化学療法は多剤併用で行われることから、薬物代謝関連分子の遺伝子多型との関連も治療レジメンにより異なる可能性が推測される。現在、国内の小児 ALL の約 1/3 に適用されている TCCSG ALL 治療研究において薬物代謝関連分子の遺伝子多型と治療効果、毒性の関連の検証を行うことは、今後の ALL 治療開発において重要な意義を持つと考えられる。本研究は、小児がん領域

における胚細胞系列遺伝子解析研究の基盤整備にも貢献するものと考えられる。

8. 末梢血残存白血細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

近年、小児 ALL の新たな治療層別化因子としてステロイド反応性が着目されている。現行の ALL の治療では、診断確定後 7 日間ステロイドを単独投与し、8 日目 (Day-8) の末梢血中の白血細胞絶対数を測定して、残存数が $\geq 1000/\mu\text{l}$ の場合は危険度が 1 段階上がる仕組みになっている。単一の中央診断施設でフローサイトメトリーを用いて Day-8 末梢血中白血細胞絶対数を測定する方法は、より客観性の高い方法として期待される。

9. Ewing 肉腫発症モデル系の確立と解析：

本年度の研究結果より、EWS/FLI1、EWS/ERG キメラ遺伝子が、骨髄間質細胞を少なくとも部分的には腫瘍形質を与えることが示された。本培養実験系は、Ewing 肉腫発症モデル系として利用することが可能であり、実際、今回我々が同定したキメラ遺伝子の標的遺伝子の DKK2 も、本培養系でキメラ遺伝子によって発現上昇する遺伝子群に含まれていた。さらに、解析を進めることにより、新規診断マーカー、新規治療標的として応用しうる分子を同定できる可能性がある。

E. 結論

小児 ALL の臨床検体を用いて、マイクロアレイによる網羅的ゲノム構造解析、体系的表面抗原解析を実施し、LC-MS による網羅的発現糖鎖解析の測定系を確立した。今後さらに解析を進め、各分子解析結果の意義や生物学的特性との関係について明らかにし、診断や治療における標的因子探索への応用を目指す。

神経芽腫の molecular allelo-karyotype を明らかにし、MYEOV と NEGR1 が新たな神経芽腫の標的遺伝子であることを示した。膨大な遺伝子情報を高速にかつ網羅的に解析することができる超高密度オリゴヌクレオチドアレイは、有用なゲノム解析ツールであり、この手法を用いて、腫瘍の molecular allelo-karyotype を明らかに

してゆくことは、標的遺伝子の同定に多大な貢献をなすものと考えられた。

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進めた。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、難治性小児腫瘍の遺伝子発現特性を明らかにして行く。

小児 AML の診断時のキメラ遺伝子スクリーニングにより、AML1-ETO を代表とする主なキメラ遺伝子の発現頻度を明らかにした。またこのキメラ遺伝子を利用した MRD 解析では、その減少様式に多様性がみられるため、今後臨床経過 (再発) との関連について明らかにする。

AML における FLT、KIT、MLL 等の遺伝子の変異解析を通じて、これらの変異の予後との相関を明らかにした。今後さらに層別化に用いる遺伝子を同定する予定である。

難治性小児がん (悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫) の中央病理診断システムおよび標準的診断法の確立はほぼ達成できた。今後さらに分子レベルでの生物学的特性について解析を進め、悪性度診断に有用な特性を明らかにしていく。

小児がんの中央診断と検体保存システムの整備を行い、実際に小児固形腫瘍の検体保存、白血病のマーカー中央診断および検体保存を行った。今後、各小児がん治療研究グループとの連携により、保存された臨床検体を基礎研究に有効に活用するシステムの構築が必要である。

小児 ALL に対する前方視的多施設共同治療研究である TCCSG ALL L07-16-02 を利用して、ALL に対する薬物治療における効果、毒性の個体差と薬物代謝関連分子の遺伝子多型の関連を検証する研究計画を立案し準備を開始した。

小児 ALL 治療 8 日目の末梢血残存白血細胞の絶対数を、デジタル 4 カラーフローサイトメトリーを用いて自動的に測定する検査システムを確立し、実際に小

児 ALL 治療研究の付随研究として、臨床検体に対する測定を開始した。今後、その有用性について検討を進める。

小児腫瘍の中でも難治性である Ewing 肉腫の病態解明のために、Ewing 肉腫発症モデルを開発した。さらに、Ewing 肉腫に特異的な高発現分子を同定し EWS/ETS キメラ遺伝子の標的分子であることを示した。今後その解析を進めることにより、EWS/ETS の腫瘍形成における役割を明らかにし、腫瘍の生物学的特性を明らかにする。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Saito M, Shimizu T, Okita H, Fujimoto J. Characterization of monocyte-macrophage-lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro. *Int J Hematol.* 85:384-389, 2007.
- 2) Taguchi T, Takenouchi H, Shiozawa Y, Matsui J, Kitamura N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system. *Exp Hematol.* 35:1398-1407, 2007.
- 3) Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J-I, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol.* (in press)
- 4) Katagiri YU, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. The detergent-insoluble microdomains, rafts can be used as an effective immunogen. *Glycoconj J.* (in press)
- 5) 清河信敬, 藤本純一郎. 細胞処理と検体保存ならびに検体供給システム. *小児外科.* 39:1266-1271, 2007.
- 6) 大喜多肇, 秦順一, 清河信敬. 小児腫瘍・胚細胞腫瘍における癌幹細胞. *病理と臨床.* 25:352-356, 2007.
- 7) 清河信敬. 免疫学的分類・診断. 小児がんの診断と治療. 別所文雄, 杉本徹, 横森欣司編: 新小児がんの診断と治療, 診断と治療社, p20-24, 2007.
- 8) Kikuchi A, Mori T, Fujimoto J, Kumagai M, Sunami S, Okimoto Y, and Tsuchida M. Outcome of childhood B-cell non-Hodgkin's lymphoma and B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with the Tokyo Children's Cancer Study Group NHL B 9604 protocol. *Leukemia and Lymphoma.* (in press)
- 9) 中川温子, 藤本純一郎. 診断に役立つ免疫組織科学:各臓器、疾患で用いられる抗体とその応用. *小児腫瘍. 病理と臨床.* 25:221-228, 2007.
- 10) Ashihara E, Nakamura S, Inaba T, Taki T, Hayashi Y, Shimazaki C. A novel AF10-CALM fusion transcript in gamma/delta-T cell type lymphoblastic lymphoma. *Am J Hematol.* 82:859-860, 2007.
- 11) Chen Y, Takita J, Mizuguchi M, Tanaka K, Ida K, Koh K, Igarashi T, Hanada R, Tanaka Y, Park MJ, Hayashi Y. Mutation and expression analyses of the MET and CDKN2A genes in rhabdomyosarcoma with emphasis on MET overexpression. *Genes Chromosomes Cancer* 46:348-358, 2007.
- 12) Shimada A, Ichikawa H, Kubota C, Taki T, Hongo T, Sako M, Morimoto A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi H. Low frequency of KIT mutations in pediatric acute myeloid leukemia with inv(16)(p13q22): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol.* 86:289-290, 2007.
- 13) Furuichi Y, Goi K, Inukai T, Sato H, Nemoto A, Takahashi K, Akahane K, Hirose K, Honna H, Kuroda I, Zhang X, Kagami K, Hayashi Y, Harigaya K, Nakazawa S, Sugita K. Fms-like Tyrosine Kinase 3 Ligand Stimulation Induces MLL-Rearranged Leukemia Cells into Quiescence Resistant to Antileukemic Agents. *Cancer Res.* 67:9852-9861, 2007.
- 14) Shimada A, Taketani T, Kikuchi A, Hanada R, Arakawa H, Kimura H, Chen Y, Hayashi Y. AML1 mutation and FLT3-internal tandem duplication in leukemia transformed from myelodysplastic syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol.* 29:666-667, 2007.
- 15) Tomizawa D, Koh K, Sato T, Kinukawa N, Morimoto A, Isoyama K, Kosaka Y, Oda T, Oda M, Hayashi Y, Eguchi M, Horibe K, Nakahata T, Mizutani S, Ishii E. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an

- MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia*. 21:2258-2263, 2007.
- 16) Nemoto N, Suzukawa K, Shimizu S, Shinagawa A, Takei N, Taki T, Hayashi Y, Kojima H, Kawakami Y, Nagasawa T. Identification of a novel fusion gene MLL-MAML2 in secondary acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome with inv(11)(q21q23). *Genes Chromosomes Cancer* 46:813-819, 2007.
- 17) Shimada A, Taki T, Kubota C, Ito T, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. N822 mutation of KIT gene was frequent in pediatric acute myeloid leukemia patients with t(8;21) in Japan: a study of the Japanese childhood AML cooperative study group. *Leukemia*. 21:2218-2219, 2007.
- 18) Shimada A, Taki T, Kubota C, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. No nucleophosmin mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Leukemia* 21:1307, 2007.
- 19) Shimada A, Hayashi Y, Ogasawara M, Park MJ, Katoh M, Minakami H, Kitoh T, Kojima S, Kawa K, Kimura H. Pro-inflammatory cytokinemia is frequently found in Down syndrome patients with hematological disorders. *Leuk Res*. 31:1207-1211, 2007.
- 20) Komuro H, Saihara R, Shinya M, Takita J, Kaneko S, Kaneko M, Hayashi Y. Identification of side population cells (stem-like cell population) in pediatric solid tumor cell lines. *J Pediatr Surg*. 42:2040-2045, 2007.
- 21) Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: A study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatr Blood Cancer* 50:264-269, 2008.
- 22) Shimada A, Hirato J, Kuroiwa M, Kikuchi A, Hanada R, Wakai K, Hayashi Y. Expression of KIT and PDGFR is associated with a good prognosis in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 50:264-269, 2007.
- 23) Kawamura M, Kaku H, Taketani T, Taki T, Shimada A, Hayashi Y. Good prognosis for 7-year-old Down syndrome patient with Acute Myeloid Leukemia (FAB-M2), lacking mutations in GATA1, FLT3, MLL, NRAS and AML1 genes. *Cancer Genet Cytogenet*. 180:74-78, 2008.
- 24) Suzuki M, Kato M, Chen Y, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Atsushi Takahashi A, Ikeda H, Kuwano H, Ogawa S, Hayashi Y. Whole genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single nucleotide polymorphism genotyping microarrays. *Cancer Science*. (in press)
- 25) Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. Identification of the novel AML1 fusion partner gene, LAF4, a fusion partner of MLL, in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. *Oncogene*. (in press)
- 26) Shimada A, Kato M, Tamura K, Hirato J, Kanegane H, Takechi Y, Park MJ, Sotomatsu M, Hatakeyama S, Hayashi Y. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with uncontrolled inflammatory cytokinemia and chemokinemia which were caused by systemic anaplastic large cell lymphoma: A case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol*. (in press)
- 27) Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, Ogawa S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet*. 81:114-126, 2007.
- 28) Nannya Y, Taura K, Kurokawa M, Chiba S, Ogawa S. Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project. *Hum Mol Genet*. 16:3494-3505, 2007.
- 29) Lips EH, de Graaf EJ, Tollenaar RA, van Eijk R, Oosting J, Szuhai K, Karsten T, Nanya Y, Ogawa S, van de Velde CJ, Eilers PH, van Wezel T, Morreau H. Single nucleotide polymorphism array analysis of chromosomal instability patterns discriminates rectal adenomas from carcinomas. *J Pathol*. 212:269-277, 2007.
- 30) Kawazu M, Yamamoto G, Yoshimi M, Yamamoto K, Asai T, Ichikawa M, Seo S, Nakagawa M, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development. *J Immunol*. 179:5335-5345,

- 2007.
- 31) Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, Bailey DK, Campbell IG. Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res.* 67:2544-2551, 2007.
- 32) Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 354:892-898, 2007.
- 33) 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.* 133:185-192, 2007.
- 34) 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.* 25:455-463, 2007.
- 35) Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson D, Pinkel D, Feuerstein B, Nakagawara A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature which is independent of molecular signature. *Oncogene.* 27:441-449, 2008.
- 36) Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, Nakagawara A, Kamijo T. *tress* via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa up-regulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene.* 27:741-754, 2008.
- 37) Toita N, Hatano N, Ono S, Yamada, Kobayashi R, Kobayashi I, Kawamura N, Okano M, Satoh A, Nakagawa A, Oshima K, Shindoh M, Takami T, Kobayashi K, Ariga T. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma in a patient with DNA ligase IV (LIG4) syndrome. *Am J Med Genet A.* 143:742-745, 2007.
- 38) Li C, Takino H, Eimoto T, Ishida T, Inagaki A, Ueda R, Suzuki R, Yoshino T, Nakagawa A, Nakamura S, Inagaki H. Prognostic significance of NPM-ALK fusion transcript overexpression in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Mod Pathol* 20:648-55, 2007.
- 39) Yokoyama S, Kasahara M, Morioka D, Fukuda A, Arai K, Mori T, Shioda Y, Nakagawa S, Shimizu N, Nakagawa A. Successful living-donor liver transplantation for Wilson's disease with hemophagocytic syndrome. *Transplantation.* 84:1067-1069, 2007.
- 40) Yokoyama S, Kasahara M, Fukuda A, Morioka D, Mori T, Nakagawa S, Shimizu N, Saito O, Nakagawa A. Evans syndrome after successful living-donor liver transplantation for neonatal giant cell hepatitis. *Transplantation.* 84:798-799, 2007.
- 41) 佐藤智信, 鈴木大介, 市川瑞穂, 中嶋雅秀, 金田眞, 井口晶裕, 佐々木了, 田中伸哉, 進藤正信, 中川温子, 小林良二. 背部で急速に増大した infantile fibrosarcoma が疑われた幼児例. *小児がん.* 43:756-760, 2007.
- 42) 森鉄也. 悪性リンパ腫. 癌と化学療法. 34:162-166, 2007.
- 43) 森鉄也. 成人と小児で非ホジキンリンパ腫の病理組織型の違いはなんですか? *小児内科.* 39:2216-2218, 2007.
- 44) 嶋晴子, 森鉄也. 合併症と支持療法・臓器合併症対策. 別所文雄, 杉本徹, 横森欣司編: 新小児がんの診断と治療, 診断と治療社, p111-116, 2007.
- 45) 森鉄也. 小児悪性リンパ腫患児の看護. 牧本敦編: がん看護実践シリーズ 13 小児がん, メジカルフレンド社, p79-110, 2007.
- 46) Watanabe N, Haruta M, Soejima H, Fukushi D, Yokomori K, Nakadate H, Okita H, Hata JI, Fukuzawa M, Kaneko Y. Duplication of the paternal IGF2 allele in trisomy 11 and elevated expression levels of IGF2 mRNA in congenital mesoblastic nephroma of the cellular or mixed type. *Genes Chromosomes Cancer.* 46:929-935, 2007.
- 47) Maeda M, Tsuda A, Yamanishi S, Uchikoba Y, Fukunaga Y, Okita H, Hata J. Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney in a child. *Pediatr Blood Cancer.* 50:180-183, 2008.
- 48) 大喜多肇. Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の分子生物学. *小児外科.* 39:1344-1347, 2007.
- 49) Narimatsu H, Yokozawa T, Iida H, Tsuzuki M, Hayakawa M, Takeo T, Iino M, Ichihashi T, Kato C, Sawamoto A, Sao H, Yanada M, Emi N, Kiyoi H, Yamaguchi T, Naoe T, Suzuki R, Sugiura I. Clinical characteristics and outcomes in patients with

t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Leukemia*. 22:428-432, 2008.

50) Narimatsu H, Emi N, Kohno A, Iwai M, Yanada M, Yokozawa T, Saito S, Shimada K, Kiyoi H, Naoe T, Yamamoto K, Morishita Y. High incidence of secondary failure of platelet recovery after autologous and syngeneic peripheral blood stem cell transplantation in acute promyelocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 40:773-778, 2007.

2. 学会発表

1) 中島英規, 宮川世志幸, 大喜多肇, 梅澤明弘, 清河信敬, 藤本純一郎. 間葉系幹細胞株 UET-13 の Ewing 肉腫原因融合遺伝子 EWS-Flil 誘導による発現糖鎖の変化. 第 27 回日本糖質学会年会, 福岡, 8 月 1 日-3 日, 2007.

2) 宮川世志幸, 大喜多肇, 中島英規, 片桐洋子, 藤本純一郎, 秦順一, 梅澤明弘, 清河信敬. Regulation of Dickkopf family protein expression by EWS/ETS. 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 10 月 3-5 日, 2007.

3) 大喜多肇, 梅澤明弘, 宮川世志幸, 片桐洋子, 藤本純一郎, 秦順一, 竹田直樹, 千葉英樹, 清河信敬. EAT/mcl1, a gene related to embryonal carcinoma cells, is crucial for embryonic development and cell survival. 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 10 月 3-5 日, 2007.

4) 田口智子, 宮川世志幸, 堀内保臣, 斎藤洋平, 竹野内寿美, 北村紀子, 松井淳, 佐藤伴, 鈴木恭子, 斎藤正博, 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. oncostatin M の造血調節作用に関する in vitro での検討. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会 合同開催, 横浜, 10 月 11 日-13 日, 2007.

5) 片桐洋子, 佐藤伴, 田口智子, 石垣宏仁, 伊藤靖, 大喜多肇, 小笠原一誠, 藤本純一郎, 清河信敬. 同系腫瘍細胞及びヒト腎癌由来細胞株 ACHN ラフト免疫により誘導される免疫応答. 第 37 回日本免疫学会総会, 東京, 11 月 20 日-22 日, 2007.

6) 片桐洋子, 佐藤伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島英規, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の多様性と endopeptidase 活性. 第 30 回日本分子生物学会第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12 月 11 日-15 日, 2007.

7) 中島英規, 宮川世志幸, 大喜多肇, 佐藤伴, 堀内保臣, 片桐洋子, 梅澤明弘, 清河信敬, 藤本純一郎. ヒト間葉系前駆細胞を用いた Ewing's family tumor

発現融合遺伝子 EWS/FLI1 による糖脂質の変化. 第 30 回日本分子生物学会第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12 月 11 日-15 日, 2007.

8) 宮川世志幸, 大喜多肇, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 清河信敬. ヒト間葉系前駆細胞における Ewing 腫瘍特異的融合遺伝子 EWS/ETS 発現は Ewing 腫瘍様形質を誘導する. 第 30 回日本分子生物学会第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12 月 11 日-15 日, 2007.

9) 清河信敬, 藤本純一郎, 田口智子, 塩沢裕介, 斎藤洋平, 大喜多肇, 梶原道子, 福島敬, 河崎裕英, 犬飼岳史, 牧本敦, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 東京小児がん研究グループ ALL 治療第 16 次研究 (TCCSG L04-16/06-16) におけるマーカー中央診断. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

10) 北村紀子, 清河信敬, 片桐洋子, 板垣光子, 宮川世志幸, 大喜多肇, 森晶夫, 藤本純一郎. 小児悪性リンパ腫における Granulysin 発現の解析. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

11) 斎藤洋平, 清河信敬, 田口智子, 宮川世志幸, 中島英規, 佐藤伴, 堀内保臣, 片桐洋子, 大喜多肇, 斎藤正博, 清水俊明, 藤本純一郎. BAFF による B 細胞アポトーシスの抑制. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

12) 森鉄也, 熊谷昌明, 中川温子, 黒田達夫, 森川信行, 大喜多肇, 清河信敬, 清谷知賀子, 塩田曜子, 正木英一, 藤本純一郎. 小児がんに関連する卒後教育体制の整備を目指して: 国立成育医療センターにおける公開小児がん系統講義の試み. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

13) 宮川世志幸, 大喜多肇, 中島英規, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 清河信敬. Ewing family tumor 特異的融合遺伝子 EWS/ETS による Wnt シグナル関連因子 Dickkopf family の発現制御. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

14) 藤本純一郎. 「CCS の内分泌障害をめぐって」. 全国フォローアップシステムの確立とがん登録. 第 41 回日本小児内分泌学会学術集会. 横浜, 11 月

7-9 日, 2007.

15) 藤本純一郎. 「小児がん経験者の長期フォローアップシステムの構築」. 長期フォローセンターと拠点病院構想. 第 23 回日本小児がん学会・第 49 回日本小児血液学会. 仙台, 12 月 14-16 日, 2007.

16) 藤本純一郎. 「どうする小児固形がん多施設共同研究」. 中央診断と検体保存システムによるトランスレーショナル研究推進基盤. 第 23 回日本小児がん学会・第 49 回日本小児血液学会. 仙台, 12 月 14-16 日, 2007.

17) 朴明子、滝智彦、嶋田明、外松学、滝田順子、五十嵐隆、花田良二、堀部敬三、林泰秀: T 細胞型白血病における NOTCH1 と P53 遺伝子変異についての解析. 第 110 回日本小児科学会学術集会 京都 2007.4

18) 加藤元博、滝田順子、陳玉彦、山本豪、南谷泰仁、真田昌、滝智彦、小川誠司、林泰秀: 小児骨髄性疾患における Molecular allelo-karyotyping. 第 4 回 JPLSG 研究会 名古屋 2007.6.

19) 嶋田明、滝智彦、多和昭雄、花田良二、堀部敬三、土田昌宏、月下一郎、林泰秀: 小児急性骨髄性白血病における WT1 の高発現は FLT3 遺伝子変異と相関する. 第 4 回 JPLSG 研究会 名古屋 2007.6

20) 朴明子、滝智彦、鈴木信寛、小田慈、八木啓子、小林良二、原純一、堀部敬三、林泰秀: 小児 T-ALL と T-NHL における NOTCH1 遺伝子の解析と臨床的意義. 第 4 回 JPLSG 研究会 名古屋 2007.6

21) 城青衣、月本一郎、石井榮一、林泰秀、市川仁: マイクロアレイ解析により明らかとなった単球系 AML の発症年齢依存的な遺伝子発現と予後. 第 4 回 JPLSG 研究会 名古屋 2007.6

22) 滝智彦、清水大介、知念良顕、柳井文男、滝田順子、迫正廣、林泰秀、谷脇雅史: 同一の遺伝子が関与するキメラ遺伝子産物の多様性とその評価. 日本人類遺伝学会第 52 回大会 東京 2007.9

23) 加藤元博、中村文彦、滝田順子、山本豪、陳玉彦、真田昌、菊地陽、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司: 高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた神経芽腫における網羅的エピゲノム解析. 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10

24) 朴明子、滝智彦、小田慈、堀部敬三、林泰秀: 小児 T 細胞型白血病における NOTCH1 細胞周期関連遺伝子の解析. 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10

25) 滝田順子、陳玉彦、山本豪、加藤元博、真田昌、王茉莉、南谷泰仁、菊地

陽、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司: 神経芽腫における網羅的ゲノム解析と 17q 上の候補がん遺伝子である NBA17 遺伝子の同定. 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10

26) 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉: Hoxa9 と Ras-MAP キナーゼ系の協調作用が MLL 融合蛋白による急性白血病の発症に重要である. 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10

27) 知念良顕、滝智彦、西田一弘、清水大介、奥田隆史、吉田直久、小林千恵、小池和俊、土田昌宏、林泰秀、谷脇雅史: バブル PCR 法を応用した新しいキメラ転写産物同定法による t(2;21) を有する T-ALL からの AML1-LAF4 融合遺伝子の単離. 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10

28) 城青衣、月下一郎、石井榮一、麻生範雄、五十嵐隆、林泰秀、市川仁: 単球系および MLL 遺伝子再構成急性骨髄性白血病における発症年齢依存的な遺伝子発現. 第 66 回日本癌学会学術総会 横浜 2007.10

29) 嶋田明、滝智彦、多和昭雄、花田良二、堀部敬三、土田昌宏、月本一郎、林泰秀: 急性骨髄性白血病における WT1 mRNA の高発現は FLT3 遺伝子変異と相関する. 第 69 回日本血液学会、第 49 回日本臨床血液学会 横浜 2007.10

30) 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉: MLL 融合蛋白は Ras-MAP キナーゼ系の活性化と相乗的に協調して急性白血病を発症する. 第 69 回日本血液学会、第 49 回日本臨床血液学会 横浜 2007.10

31) 滝田順子、加藤元博、中村文彦、山本豪、真田昌、南谷泰仁、陳玉彦、井田孔明、康勝好、古屋彩夏、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司: 高密度アレイを用いた乳児白血病の網羅的なゲノム・エピゲノム解析. 第 69 回日本血液学会、第 49 回日本臨床血液学会 横浜 2007.10

32) 知念良顕、滝智彦、西田一弘、清水大介、奥田隆史、吉田直久、小林千恵、小池和俊、土田昌宏、林泰秀、谷脇雅史: バブル PCR 法を応用した新しいキメラ転写産物同定法による t(2;21) を有する T-ALL からの AML1-LAF4 の同定. 第 69 回日本血液学会、第 49 回日本臨床血液学会 横浜 2007.10

33) 滝智彦、清水大介、知念良顕、柳井文男、迫正廣、滝田順子、林泰秀、谷脇雅史: 切断点集中領域の外側に切断点を有する MLL 再構成陽性白血病症例の解析. 第 69 回日本血液学会、第 49

回日本臨床血液学会 横浜 2007.10

34) 朴明子、滝智彦、小田慈、八木啓子、小林良二、鈴木信寛、原純一、堀部敬三、林泰秀：小児 T 細胞型白血病における NOTCH1 遺伝変異についての解析と臨床的意義。第 69 回日本血液学会、第 49 回日本臨床血液学会 横浜 2007.10

35) 陳玉彦、加藤元博、中村文彦、山本豪、真田昌、南谷泰仁、井田孔明、康勝好、古屋彩夏、滝田順子、五十嵐隆、小川誠司、林泰秀：最新のマイクロアレイ技術を用いた若年性急性骨髄単球性白血病における網羅的ゲノム・メチル化解析。第 69 回日本血液学会、第 49 回日本臨床血液学会 横浜 2007.10

36) 大西宏明、吉野浩、滝智彦、滝田順子、井田孔明、康勝好、古屋彩夏、谷脇雅史、林泰秀、渡邊卓、別所文雄：MLL-p 300 キメラ遺伝子を認めた二次性白血病の 1 例。第 69 回日本血液学会、第 49 回日本臨床血液学会 横浜 2007.10

37) 林泰秀、嶋田明、朴明子：小児造血器腫瘍におけるチロシンキナーゼの臨床的意義。第 45 回癌治療学会総会 京都 2007.10

38) 坂爪悟、椎原隆、丸山健一、林泰秀：小脳低形成を伴う若年型ハンチントン病。第 176 回日本小児科学会群馬地方会講話会 群馬 2007.11

39) Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M: Cloning of AML1-LAF4 fusion gene in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. 第 49 回アメリカ血液学会(ASH) アトランタ 2007.12

40) Park MJ, Taki T, Suzuki N, Oda M, Yagi K, Kobayashi R, Hara J, Horibe K, Hayashi Y: CDC4 and NOTCH1 mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T cell non-Hodgkin's lymphoma; a Japan Association of Childhood Leukemia Study Group. 第 49 回アメリカ血液学会(ASH) アトランタ 2007.12

41) Jo A, Tsukimoto I, Ishii E, Asou N, Igarashi T, Hayashi Y, Ichikawa H: Age-associated difference in gene expression of pediatric myelo-monocytic and MLL-rearranged AML. 第 49 回アメリカ血液学会(ASH) アトランタ 2007.12

42) Takita J, Kato M, Nakamura F, Chen Y, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Taki T, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: High-resolution analyses of genetic and epigenetic aberrations in infant leukemia with MLL rearrangement. 第 49 回アメリカ血液学会(ASH) アトランタ 2007.12

43) 富澤大輔、磯山恵一、小原明、福島啓太郎、金子隆、加藤陽子、野口靖、太田節雄、嶋田博之、矢部普正、康勝好、真部淳、林泰秀、花田良二、土田昌宏：1歳の小児急性リンパ性白血病の臨床像及び治療成績の検討：東京小児がん研究グループ(TCCSG)からの報告。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会 仙台 2007.12

44) 高橋浩之、小原明、齋藤正博、福島敬、梶原道子、小嶋靖子、菊地陽、小川千登世、前田美穂、塩原正明、康勝好、真部淳、林泰秀、花田良二、土田昌宏：急性リンパ性白血病の染色体・遺伝子異常と予後：TCCSG ALL L95-14・L99-15 研究。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会 仙台 2007.12

45) 城青衣、嶋田明、月本一郎、五十嵐隆、林泰秀、市川仁：DNA マイクロアレイによる AML99 登録 130 症例の網羅的遺伝子発現解析。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会 仙台 2007.12

46) 加藤元博、滝田順子、陳玉彦、中村文彦、山本豪、南谷泰仁、真田昌、康勝好、井田孔明、古屋彩夏、滝智彦、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司：乳児白血病における網羅的エピゲノム解析。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会 仙台 2007.12

47) 嶋田明、滝智彦、多和昭雄、花田良二、堀部敬三、土田昌宏、月本一郎、林泰秀：急性骨髄性白血病の化学療法後の WT1 mRNA の高発現は FLT3 遺伝子変異および予後と相関する。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会 仙台 2007.12

48) 滝田順子、陳玉彦、加藤元博、山本豪、南谷泰仁、真田昌、古屋彩夏、康勝好、井田孔明、菊地陽、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司：横紋筋肉腫における網羅的ゲノム解析。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会 仙台 2007.12

49) 陳玉彦、加藤元博、滝田順子、中村文彦、山本豪、真田昌、南谷泰仁、井田孔明、康勝好、古屋彩夏、林泰秀、五十嵐隆、小川誠司：若年性急性骨髄単球性白血病における網羅的ゲノム・メチル化解析。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会 仙台 2007.12

50) 加藤元博、滝田順子、陳玉彦、中村文彦、山本豪、真田昌、南谷泰仁、康勝好、井田孔明、古屋彩夏、菊地陽、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司：神経芽腫における DNA メチル化領域の網羅的

- 解析。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会 仙台 2007.12
- 51) 川村眞智子、賀来秀文、滝智彦、林泰秀：JAK2 遺伝子が転座に関与した t(9;17)(p24;q23)をもつ急性リンパ性白血病 (ALL)。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会仙台 2007.12
- 52) 朴明子、滝智彦、鈴木信寛、小田慈、八木啓子、原純一、小林良二、堀部敬三、林泰秀：小児 T-ALL と FNHL における NOTCH1 と CDC4 遺伝子の解析と臨床的意義。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会仙台 2007.12
- 53) Takita J, Chen Y, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Kato M, Kikuchi A, Hayashi Y, Ogawa S. Molecular allelotyping analysis of neuroblastoma using high-density SNP-genotyping microarrays. 98th AACR Annual meeting. Los Angeles, April 14-18, 2007.
- 54) Takita J, Kato M, Chen Y, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Furuya A, Koh K, Ida K, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. High resolution copy number analysis of rhabdomyosarcoma using SNP-genotyping microarrays. 3rd ASPR Annual meeting, Tokyo October 6-8, 2007.
- 55) 滝田順子、陳玉彦、加藤元博、山本豪、南谷泰仁、真田昌、菊地陽、林泰秀、小川誠司、五十嵐 隆。横紋筋肉腫における網羅的ゲノム解析。第 110 回日本小児科学会学術集会 京都 4 月 20 日～22 日、2007。
- 56) 滝田順子、加藤元博、中村文彦、陳玉彦、山本豪、南谷泰仁、真田昌、菊地陽、林泰秀、五十嵐 隆、小川誠司。神経芽腫における molecular allelo-karyotyping と 17 番染色体高度増幅領域の標的遺伝子の同定。第 66 回日本癌学会学術集会総会、横浜 10 月 3 日～6 日、2007。
- 57) Ohira M, Oba S, Tomioka N, Misra A, Fridlyand J, Nakamura Y, Isogai E, Koda T, Todo S, Kaneko Y, Yoshida Y, Fuchioka M, Albertson DG, Pinkel D, Ishii S, Feuerstein BG, Nakagawara A.: Risk classification of neuroblastoma by combined genomic and molecular signatures. American Association for Cancer Research 98th Annual Meeting (AACR) 2007, Los Angeles, USA. April 14-18, 2007.
- 58) Ohira M, Oba S, Tomioka N, Nakamura Y, Isogai E, Kamijo T, Koda T, Todo S, Kaneko Y, Ishii S, Nakagawara A.: Combined microarray-based genomic and expression analysis of neuroblastoma. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 3 日-5 日、2007。
- 59) 大平美紀、富岡伸元、大羽成征、中村洋子、磯貝恵理子、好田忠行、干萌、李元元、ミヤットリンウー、新妻秀剛、川崎篤史、安藤清宏、尾崎俊文、金子安比古、上條岳彦、石井信、中川原章。ゲノム異常及び遺伝子発現の統合的解析による神経芽腫関連遺伝子の同定。第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催、仙台、12 月 14 日-16 日、2007。
- 60) 中川温子。小児における稀な悪性リンパ腫の病理像。小児白血病研究会セミナー 2007 in 桂浜。高知 7 月 8 日、2007。
- 61) 中川温子。Biological relevance of the International Neuroblastoma Pathology Classification。第 10 回神経芽腫基礎研究会・第 1 回依存性受容体研究会。東京、10 月 6 日、2007。
- 62) 中川温子。「小児がん」における遺伝子・病理診断。第 25 回日本染色体遺伝子検査学会学術集会、東京、11 月 16-17 日、2007。
- 63) 中川温子、大喜多肇、松岡健太郎。Favorable Histology を呈した MYCN 増幅神経芽腫の臨床病理学的検討。第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催、仙台、12 月 14 日-16 日、2007。
- 64) 森 鉄也、角南 勝介、近藤 健介、石井 栄三郎、磯田 健志、井田 孔明、沖本 由理、菊地 陽、熊谷 昌明、黒木 文子、小林 千恵、藤本 純一郎、土田 昌宏。小児リンパ芽球性リンパ腫に対する TCCSG NHL-T0105 登録と治療成績：NHL-BFM90 の大量 MIX 減量の可能性。第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催、仙台、12 月 14 日-16 日、2007。
- 65) 森 鉄也、小林 良二、稲田 浩子、瀧本 哲也、堀部 敬三、鶴澤 正仁。縦隔大細胞型 B 細胞性リンパ腫例の予後の検証：JPLSG リンパ腫委員会による後方視的解析。第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催、仙台、12 月 14 日-16 日、2007。
- 66) 近藤健介、菊地 陽、石井 栄三郎、磯田 健志、井田 孔明、沖本 由理、熊谷 昌明、黒木 文子、小林 千恵、角南勝介、藤本 純一郎、森 鉄也、土田 昌宏。TCCSG non-Hodgkin lymphoma (NHL) 01-05 登録症例の成熟 B 細胞性腫瘍における治療成績。第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催、仙台、12 月 14 日-16 日、2007。
- 67*) 小林 千恵、石井 栄三郎、磯田 健志、井田 孔明、沖本 由理、菊地 陽、熊谷 昌明、黒木 文子、近藤 健介、角南

勝介, 藤本 純一郎, 森 鉄也, 土田 昌宏. 東京小児がん研究グループ (TCCSG) 非ホジキンリンパ腫登録症例における染色体解析の検討. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

68) 宇野 光昭, 塩田 曜子, 清谷 知賀子, 熊谷 昌明, 森 鉄也. FDG-PET により残存腫瘍の評価を行った小児成熟 B 細胞非ホジキンリンパ腫の 3 例. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

69) 塩田 曜子, 宇野 光昭, 清谷 知賀子, 森 鉄也, 熊谷 昌明. 非寛解の急性リンパ性白血病に対する Bu を加えた TBI レジメン (Bu+TBI+VP16+LPAM) の試み. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

70) 松本 正栄, 小池 和俊, 森 鉄也, 牧本 敦, 菊地 陽, 秋山 政晴, 小川 千登世, 大木 健太郎, 梶原 道子, 滝田 順子, 小原 明, 柳町 昌克, 海老原 康博, 矢部 普正, 加藤 俊一. TBI/VP-16/CY の前処置で UCBT を施行した ALL の 17 例. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

71) 大喜多肇, 金子安比古, 秦順一, 堀江弘, 樋之津史郎, 越永従道, 春田雅之, 大植孝治, 北野良博, 斉藤正博, 陳基明, 中館尚也, 野崎美和子, 麦島秀雄, 福澤正洋. 日本ウィルムス腫瘍スタディグループにおけるウィルムス腫瘍の WT1 遺伝子解析. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

72) 春田雅之, 渡辺直樹, 中館尚也, 副島英伸, 大喜多肇, 福澤正洋, 金子安比古. 日本人 Wilms 腫瘍における既知原因遺伝子の挙動. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

73) 陳基明, 中館尚也, 斉藤正博, 越永従道, 樋之津史郎, 大植孝治, 北野良博, 大喜多肇, 金子安比古, 堀江弘, 秦順一, 野崎美和子, 麦島秀雄, 福澤正洋. 日本ウィルムス腫瘍スタディグループ (JWiTS) におけるウィルムス腫瘍の再発例の検討. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

74) 越永従道, 北野良博, 福澤正洋, 大植孝治, 大喜多肇, 金子安比古, 斉藤

正博, 陳基明, 中館尚也, 野崎美和子, 秦順一, 樋之津史郎, 堀江弘, 横森欣司, 麦島秀雄. ウィルムス腫瘍グループスタディにおける腎横紋筋肉腫様腫瘍 (RTK) に対する集学的治療法の確立. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

75) 池田均, 田原和典, 中井秀郎, 野崎美和子, 島田憲次, 設楽利二, 秦順一, 大喜多肇. 腎芽腫における腎温存手術の実施可能性と長期的有用性に関する前方視的グループ研究. 第 49 回日本小児血液学会総会・第 23 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

76) 澤本晶代, 成松宏人, 横澤敏也, 飯田浩充, 都築基弘, 早川正哉, 竹尾高明, 飯野 昌樹, 市橋卓治, 鈴木律朗, 杉浦勇. 日本人における t(8;21) 急性骨髄性白血病の臨床像: 多施設調査. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会 合同総会, 横浜, 10 月 11 日-10 月 13 日, 2007.

77) 横澤敏也, 矢野尊啓, 鶴池直邦, 井上信正, 岡村精一, 河野文夫, 嶋崎明美, 花田修一, 下村壮司, 西浦哲雄, 堀田知光, 堀部敬三. イマチニブの導入による慢性骨髄性白血病の治療成績の向上. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会 合同総会, 横浜, 10 月 11 日-10 月 13 日, 2007.

78) 永井宏和, 横澤敏也, 渡辺智之, 鶴池直邦, 岡村精一, 矢野尊啓, 花田修一, 河野文夫, 角南一貴, 花田修一, 池田弘和, 澤村守夫, 西浦哲雄, 堀田知光, 堀部敬三. B 細胞性リンパ腫の後方視的解析 (リツキシマブ導入前後の比較). 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会 合同総会, 横浜, 10 月 11 日-10 月 13 日, 2007.

79) 大橋春彦, 深見晶子, 小栗佳代子, 永井宏和, 横澤敏也, 濱口元洋, 堀田知光. 骨髄増殖性疾患の造血コロニーを対象とした JAK2/V617 変異と X 染色体の不活化パターンの検討. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会 合同総会, 横浜, 10 月 11 日-10 月 13 日, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

難治性小児がんの網羅的糖鎖・ゲノム解析とその臨床応用

主任研究者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部長

研究要旨： 小児急性リンパ芽球性白血病（ALL）の臨床検体を用いて、マイクロアレイによる T-ALL の網羅的ゲノム構造解析、フローサイトメトリーによる小児 ALL の体系的表面抗原解析を行い、液体クロマトグラフィー質量分析による網羅的発現糖鎖解析測定系の確立を行った。ゲノム構造解析では、従来報告の無かったものを含む複数のゲノム構造異常の集積点の候補領域が明らかとなった。表面抗原解析では、特定の aberrant 抗原の発現様式とキメラ遺伝子発現との関係が認められ、治療予後と関連する抗原発現の存在の可能性が示唆された。発現糖鎖解析では、ALL の各病型に特異的な糖鎖発現様式の存在が示唆された。今後さらに解析を進め、各分子解析結果の意義や生物学的特性との関係について明らかにし、診断や治療における標的因子探索への応用を目指す。

A. 研究目的

小児がんは小児期の死因の上位を占め、小児および成育医療領域では非常に重要な疾患である。近年の集学的治療法の進歩により、その一部では適切な治療を行えば完全治癒が期待され得る状況になっており、発症時に正確に診断し、完全治癒を目指した適切な治療法を選択するとともに、各症例の治療反応性に応じて QOL を考慮した治療層別化を体系的に行っていくことが今後の課題となっている。

この課題を達成するためには、各小児がん疾患あるいは各症例の生物学的特性を分子レベルで明らかにしていくことが必要である。これに関して、小児がんに対する遺伝子異常の発見や網羅的発現遺伝子解析が進み、その成果の臨床への還元が試みられているが、十分な治療成績改善には結びついておらず、一部の小児がんは依然予後不良である。このような現状の克服には、上記解析に加え、全ゲノム的な遺伝子構造やエピゲノムの異常、蛋白糖鎖発現等の生体分子情報を網羅的に解析し、小児がんの臨床的特性にかかわる異常を包括的に解明していくことが必須である。また、人種差を考慮すると我国独自の研究の推進が必要である。

そこで本研究では、Ewing 肉腫、横紋筋

肉腫、Wilms 腫瘍、神経芽腫、難治例や再発例を含む小児白血病等の臨床検体に対し、包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）を行って、難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報を網羅的に明らかにし、その知見に基づいた新規診断・治療法開発を行う。特に、急速な進展や再発を繰り返す亜型の分子特性を明らかにし、QOL 改善を目標とした予後予知法確立や新規治療モデルの提示を目指す。

本研究では、特に小児急性リンパ芽球性白血病（ALL）を対象として、難治例の生物学的特性について、ゲノム構造、表面抗原の発現、糖鎖の発現の観点から解析することを目指す。

B. 研究方法

1. 小児がんのゲノム構造解析：

白血病細胞から抽出したゲノム DNA を適切な制限酵素で消化し、断端に共通のアダプターを付加した後、PCR により増幅した。PCR 産物の精製後に DNaseI 処理によりさらに断片化し、biotin ラベルをした後、GenChip 50K/250K アレイ上でハイブリダイゼーションを行った。小川らが開発した CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いてデータを分析し、平均解像度 24kb

～ 6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数の解析を行った。

2. 小児 ALL のマーカー解析：

骨髄液あるいは末梢血液について、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 を用いて 1 レーザー 4 カラー解析を行った。lineage 決定・病型診断に必要な項目に加え、様々な機能分子に対する抗体についても解析を行った。

3. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

小児 ALL 細胞から抽出した糖脂質を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) によって解析した。

細胞から糖脂質をクロロホルム/メタノール=(2/1,v/v)およびクロロホルム/2-プロパノール/水=(7/11/2) 抽出し、Sep-Pak C18 plus 逆相カートリッジを用いて精製した後、順相カラム (Imtakt UK-silica, 150 mm x 0.3 mm) をつないだ高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分離した。分離条件は、流速：3 μ L / min で、移動相 A : クロロホルム/メタノール/50 mM 酢酸-トリエチルアミン (pH 4.2) = 83 / 16 / 1 に対し、移動相 B : メタノール/50 mM 酢酸-トリエチルアミン (pH 4.2) = 3 / 1 で 0-100 % に 45 分間のグラジエントをかけて行った。

オンライン質量分析は Electrospray ionization (ESI) / ion trap (IT) type mass spectrometer を使用し、negative ion mode で m/z 50-2500 の範囲で測定スキャンを行った。測定後、対象の m/z の値でエクストライオンクロマトグラムを作成し、ピーク面積をコンパウンドリストで算出した。各糖鎖成分の全糖脂質の総ピーク面積に対する割合を算出し、それぞれの値を用いて発現糖鎖パネルを作成した。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

C. 研究結果

1. 小児がんのゲノム構造解析：

T-ALL の臨床検体 63 例の網羅的なゲノムコピー数の解析を行った。この結果、4 例以上に共通して欠失あるいは増幅のコピー数の異常を認めた領域が 45 カ所存在し、T-ALL のゲノムにおける微小異常の集積点の候補と考えられた。この中には、海外の同様の解析において従来報告されていない部位が多数含まれており、マイクロアレイの検出解像度が向上していることや、人種差による本邦の症例特有の異常であることが考えられ、この中に新たな構造異常が含まれている可能性が期待される。

2. 小児 ALL のマーカー解析：

2007 年には、東京小児がん研究グループ (TCCSG) の ALL 治療プロトコール登録症例を中心として小児-ALL 169 例の表面マーカー解析を行った。過去の解析結果と合わせ、309 例の ALL 症例を解析した内訳は、B 前駆細胞性 ALL (Precursor B-ALL) 85.0%、T 細胞性 ALL (T-ALL) 12.0%、分類不能等その他 3.0%であった。Precursor B-ALL では、その半数以上に B-細胞以外の細胞系統の抗原 (aberrant 抗原) の発現を認めた。このうち、multiplex PCR によるキメラ遺伝子発現解析が行われている症例について各 aberrant 抗原の発現を解析した結果を表に示す。

表 キメラ遺伝子と aberrant 抗原の発現

この結果、CD66c の発現は BCR-ABL 以

抗体	発現 (%)	キメラ遺伝子				
		なし	BCR-ABL / t(9;22)	MLL-AF4	MLL-AF8	ETV6-AML
CD99	48.4	48.4	0.0	0.0	0.0	0.0
CD10	84.5	84.5	0.0	0.0	0.0	0.0
CD99c	82.8	82.8	0.0	0.0	0.0	0.0
CD33	14.8	10.3	0.0	0.0	0.0	0.0
CD13	8.4	4.6	14.3	0.0	0.0	12.6
CD65	2.7	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
CD16	0.6	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0
CD7	1.7	1.3	14.3	0.0	0.0	0.0
CD2	3	4.6	0.0	0.0	0.0	0.0
CD4	0.4	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0
CD56	1.7	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0

外のキメラ遺伝子が発現する症例では認められず、CD10-で CD99+, CD65+ は MLL-AF4 に、CD99+, CD33+ は ETV6-AML に特徴的である等、各 aberrant 抗原の発現様式とキメラ遺伝子の発現には一定の関係があることが明らかとなった。この他、7.1 抗原の発現は MLL-AF4 に特