

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。

3. 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。

D. 考察

1. 小児がんのゲノム構造解析：

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 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、予後と関連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

3. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

糖鎖は第 3 の生命鎖とも呼ばれ、その細胞機能における重要性が着目されている。がん細胞においても、発生母体となる正常細胞とは異なる糖鎖の発現が認められ、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、小児がんにおける糖鎖研究はほとんど行われていないのが現状である。その理由の一つとして、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が考えられる。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な画期的な方法であり、今回の検討の結果、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。

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。

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.

2. 学会発表

1) 片桐洋子, 佐藤伴, 宮川世志幸, 堀内保臣, 石垣宏仁, 小笠原一誠, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. ラフトマイクロドメイン免疫の抗腫瘍効果. 第96回日本病理学会総会, 大阪, 3月13日-15日, 2007.

2) 宮川世志幸, 大喜多肇, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. ヒト間葉系幹細胞培養系を用いた Ewing 肉腫ファミリー腫瘍発症モデルの確立. 第96回日本病理学会総会, 大阪, 3月13日-15日, 2007.

3) 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-Flil1 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 斉藤洋平, 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.

14) 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.

15) 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.

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

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

分担研究者 藤本 純一郎 国立成育医療センター研究所 副所長

研究要旨： 小児がんのトランスレーショナルリサーチ推進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。小児 ALL 治療8日目の末梢血残存白血病細胞の絶対数を、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。

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。

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ことを目指す。

B. 研究方法

1. 小児がんの中央診断と検体保存：

現在、成育医療センターでは、病院臨床検査部病理検査室、研究所発生・分化研究部が中心となり、各小児がん治療研究グループと連携し、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫、Wilms 腫瘍、神経芽腫、小児白血病等に対する病理中央診断、キメラ遺伝子検出の中央診断、マーカー中央診断の多くの部分を担当している。本研究では、これらの活動を支えるための基盤研究として、中央診断および検体保存を効率的に行うための登録、データおよび余剰検体試料の保管、匿名化管理、等の体制の整備を行う。実地に即した登録方法、データおよび余剰検体試料の保管、匿名化

管理、等の方法について、関係の担当者が協議、決定し、実際に実施して、その状況について確認、再検討を行った。

2. 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：

末梢血液を正確に 200 μ l 分取し、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、細胞を正確に 200 μ l のシース液に浮遊させ、正確に 200 μ l 分取した検定済の蛍光標識ビーズ(Flow-Count)と混和後、Digital flow cytometry (FC-500, Beckman Coulter 社)を用いて 1 レーザー4 カラー解析を行った。

(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

C. 研究結果

1. 小児がんの中央診断と検体保存：

本年度は、特に検体保存の際の匿名化システムを整備した。通常、送付されてくる検体には、各治療研究グループによって発行される登録番号と診断上必要な最小限の情報のみが付与され、いっさいの個人情報はそのそれぞれのグループのデータセンターで別途管理される。種々の検討の結果、検体保管作業の実施者が、保存する検体を入れた個々の容器（凍結チューブ、凍結組織カセット、等）ごとに 6桁の乱数字による匿名化番号を印刷したシール（専用の匿名化管理システムによって管理発行）を貼り付けて保存し、個人情報管理者が登録番号と匿名化番号の照合表を管理する方式を採用した。余剰検体を研究者に分与す場合には、個人情報管理者が指定した匿名化番号の検体を保管管理者が分注し、これに新たに発行した別途整理番号を添付して送付することとした。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。この他、ALL 70 例について治療中の骨髄の微小残存白血病細胞 (MRD) の検出を行った。

2. 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：

初診時検体の表面マーカー解析の結果をもとに、より明確に残存白血病の検出が可能となるマーカーの組み合わせを選択した。テストサンプルを用いた検討の結果、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り、目視による算出と相関する値が得られた。しかし、マーカー上正常細胞との判別が困難な症例 (CD10 陰性例等) では、どのマーカーを基準にするかによって、測定値がばらつく場合があった。実際に、この方法を用いて、プロトコールに従って治療中の ALL 患児 37 例の Day-8 末梢血中残存白血病細胞数の算定を行った。

考察

1. 小児がんの中央診断と検体保存：

小児がんの病理および分子診断と検体保存を実施するシステムについては、現在までにほぼ整備されたと考えている。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。今後の課題としては、分子診断の検査方法の標準化と精度管理、新たな診断技術や、小児がんの生物学的特性に関する新規知見の診断システムへの導入、等が挙げられる。また、保存された臨床検体は各治療研究グループの所有であり、その基礎研究への使用や研究者への分譲の方法については決定されていないものが多い。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。

2. 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：

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) の末梢血中の白血病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。しかし、現状では、Day-8 末梢血中残存白血病細胞数の算定は各施設で検鏡による芽球の割合 (%) と血算の値から算出されており、施設間の差について常に問題となる。これに対して、単一の中央診断施設でフローサイトメトリーを用いて測定する方法は、より客観性の高い方法として期待される。今回の検討では、大部分の症例についてはこの方法によって末梢血中残存白血病細胞を明確に検出可能であることが示された。しかし、一部のマーカー上正常細胞との判別が困難な症例 (CD10 陰性例等) では、残存白血病細胞数の算定が困難な場合もあること、現状では検体の搬送に一晩かかるため結果がでるのが検体採取の翌日になること、コストの問題、等解決すべき点もあり、今後の課題と考えられる。各施設で目視によって算出された Day-8 末梢血残存白血病細胞数との比較は、今後症例数がまとまった時点で行う予定であり、両者の相関性についても今後の検討事項である。

E. 結論

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 治療 8 日目の末梢血残存白血病細胞の絶対数を、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Kiyokawa N, Taguchi T,

Taguchi 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, Horinouchi 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, Horinouchi 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.

- 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.

2. 学会発表

- 1) 片桐洋子, 佐藤伴, 宮川世志幸, 堀内保臣, 石垣宏仁, 小笠原一誠, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. ラフトマイクロドメイン免疫の抗腫瘍効果. 第 96 回日本病理学会総会, 大阪, 3 月 13 日-15 日, 2007.

- 2) 宮川世志幸, 大喜多肇, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. ヒト間葉系幹細胞培養系を用いた Ewing 肉腫ファミリー腫瘍発症モデルの確立.

第 96 回日本病理学会総会, 大阪, 3 月 13 日-15 日, 2007.

3) 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-Flil1 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 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.

14) 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.

15) 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.

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

小児がんの遺伝子変異解析と治療モデルの開発

分担研究者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨： 近年の分子遺伝学の進歩による小児がん発症と進展の分子メカニズムの解明は、新規治療薬剤の開発につながる事が判明してきた。成人の急性骨髄性白血病（AML）では、*FLT3* などいくつかの遺伝子が予後と相関することが報告されているが、小児AMLでは報告が少ない。我々はこれまで行われたAML99プロトコールにおける遺伝子解析結果と予後との関係を検討し、*FLT3*、*KIT*、*MLL*、*RAS*、*nucleophosmin* 遺伝子の解析結果と予後との関係を明らかにした。また初診時 *WT1* 遺伝子の発現が *FLT3* 異常と相関し、寛解時の *WT1* の値が予後と相関することを明らかにした。

A. 研究目的

小児急性骨髄性白血病（AML）は染色体所見と予後との相関が報告されており、*t(8;21)*や *inv(16)*は予後良好とされている。近年成人のAMLで *FLT3* の異常が予後と相関すると報告され、注目されている。今年度の目的は、日本小児白血病治療委員会で行われたAML99プロトコールにより治療された150症例の遺伝子異常と予後との関係を検討することである。実際には、*FLT3*、*KIT*、*MLL*、*RAS*、*nucleophosmin(NPM)*遺伝子の解析に加え *WT1* 遺伝子の発現解析を行ない、結果と予後の相関を検討する。

B. 研究方法

AML99プロトコールに登録された小児AML150例の細胞について、*FLT3*、*KIT*、*MLL*、*RAS*、*NPM* 遺伝子の解析と *WT1* 遺伝子の発現と予後との関係を検討した。

FLT3 遺伝子については、*internal tandem duplication(ITD)*と、キナーゼ領域に位置する835番目の *Asp* 残基(D835)の点変異(D835Mt)につき、*reverse transcriptase (RT)-PCR* を行い直接塩基配列決定法により小児AML150症例について解析を行った。

KIT 遺伝子については、AML99症例中 *t(8;21)*の46例とさらにAML99以降の42例で *KIT* 遺伝子の *extracellular (EC) domain*、*juxtermembrane (JM) domain*、*tyrosine kinase*

2 (TK2) domain を検討した。*t(8;21)*以外のAMLにおいても同様の検討を行った。特に *inv(16)*-AML 9例については詳細な検討を行った。

*MLL-partial tandem duplication(PTD)*について、*MLL-PTD* と他の遺伝子変異 (*FLT3*、*MLL*、*KIT*、*RAS* 遺伝子) について、AML細胞株14株、ALL細胞株15株、11q23-AML臨床検体20検体を含むAML99150例について変異の解析を行った。

また *RAS* 遺伝子については全例で、*NPM* 遺伝子については正常核型症例で検討した。*WT1* 遺伝子については初診時は全例で、寛解時は検体が検索可能であった76例で *real-time PCR* 法を用いて検索を行った。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析にあたっては、三省合同のゲノム指針に則り、患者又は両親から同意を得、当センターの倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

FLT3 遺伝子の解析では、昨年度AML150例中ITDを22例(13.8%)、D835Mtを12例(7.5%)に認め、ITD陽性例は有意に予後不良であった(文献12)。

KIT 遺伝子の解析では、TK2 domain の変異が *t(8;21)*-AML 46例中8例

(17.4%)(N822K 3 例、N822T、D816H、D816V、V825A、A814S 各 1 例)に認められた。AML 全体での検討においても *KIT* 遺伝子変異陽性例は陰性例より有意に予後不良であった。AML99 とそれ以降の合計 88 例の t(8;21)-AML 中 17 例(19.3%)に変異を認め、このうち D816 変異は 6 例に、N 822 変異は 5 例に認められた。N 822 変異はヨーロッパでの報告はほとんどなく、本邦と中国の報告のみであり、人種差の存在が示唆された。

inv(16)-AML は予後良好群に分類されるが、近年 *KIT* 遺伝子変異が成人 inv(16)-AML の 30-50%にみつき、予後との相関が報告されている。今回小児 inv(16)-AML における *KIT* 遺伝子変異の解析を行ない、あわせて *FLT3* と *NRAS* 遺伝子についても解析を行った。inv(16)が判明しているか、CBF-MYH11 キメラ遺伝子が検出された年齢が 8 ヶ月から 14 歳の 20 例の *KIT*、*FLT3*、*NRAS* 遺伝子の解析では *KIT* 遺伝子の exon 8 変異が 20 例中 1 例(5%)にのみみられた。この 1 例は、小児 AML 共同治療研究で治療された 7 例中の 1 例で、再発がみられた。この他 *FLT3* kinase domain 変異が 3 例に、*NRAS* 遺伝子変異が 3 例にみられたが、予後との相関はみられなかった。また *FLT3-ITD* は全例でみられなかった。小児 inv(16)-AML では *KIT* は成人よりも頻度が低く、*KIT* 遺伝子変異はまれで、成人の頻度と大きく異なっていた。

11q23 転座型 AML の解析では、11q23 転座をもつ AML 細胞株 2 株で *MLL-PTD* が認められた。11q23 転座をもつ 8 細胞株中 6 株に *MLL-PTD*、*FLT3-ITD* または D835 変異が認められた。解析した 11q23-AML20 例中、*MLL-PTD* が 5 例、*FLT3-D835* 変異を 1 例に認めた。*MLL-PTD* の年齢中央値は 10 歳と年長児に多く見られ、2 歳未満ではみられなかった。*MLL-PTD* の有無で予後に明らかな差がみられた。また *NRAS* 変異は 1 例で、*FLT3-ITD* と *KIT* 変異はみられなかった。

NPM 遺伝子変異は成人の AML では約 35 %にみられ、とくに正常核型をもつ症例の 50 %以上に存在することが明らかにされている。また *FLT3-ITD* の陽性例に多

く、予後と相関すると報告された。我々の小児の正常核型 33 例の検討では陽性例はみられなかった。欧米の小児例の報告でも、いずれも 13 歳以上の年長児に多くみられており、*NPM* の変異は年齢に依存することが示唆された。

WT1 遺伝子の real-time PCR 法による発現解析では、初診時の *WT1* の値は予後とは相関しなかったが、*FLT3-ITD* 異常と相関していた。寛解時の微少残存病変(MRD)の解析では予後と相関しており、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。

D. 考察

今回、小児の AML99 プロトコールにおいて、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。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。成人では予後と相関するとする報告が多いが、治療の層別化はまだ行われていない。

inv(16)-AML 7 例で *KIT* 変異のあるものが再発したことにより、AML99 以前の inv(16) 13 例を集めて検討を行ったが、*KIT* 変異のない症例でも再発がみられ、プロトコールが異なる症例を含めると有意差がみられなかった。*KIT* 変異は予後因子であるか否かは、AML-05 研究での解析を待つことになる。

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、AML-05 で検討する予定である。

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。これまで小児 AML の報告はほとんどみられない。今回の我々の結果は、予後とは相関しなかったが、寛解時の *WT1* 値(MRD)は予後と相関していた。

D. 考察

今回、小児の AML99 プロトコールにおいて、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。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。成人では予後と相関するとする報告が多いが、治療の層別化はまだ行われていない。

inv(16)-AML 7 例で *KIT* 変異のあるものが再発したことにより、AML99 以前の inv(16) 13 例を集めて検討を行ったが、*KIT* 変異のない症例でも再発がみられ、プロトコールが異なる症例を含めると有意差がみられなかった。*KIT* 変異は予後因子であるか否かは、AML-05 研究での解析を待つことになる。

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、AML-05 で検討する予定である。

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。これまで小児 AML の報告はほとんどみられない。今回の我々の結果は、予後とは相関しなかったが、寛解時の *WT1* 値(MRD)は予後と相関していた。

E. 結論

AML99 における *FLT*、*KIT*、*MLL* 遺伝子等の検討を通じて、これらの遺伝子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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

8) Shimada A, Taki T, Kubota C, Itou 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 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* 50:213-217, 2007.

14) 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.

15) 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)

16) 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)

17) 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)

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 滝智彦、清水大介、知念良頭、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

7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 知念良頭、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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 知念良頭、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
- 17) 滝智彦、清水大介、知念良頭、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
- 18) 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 遺伝子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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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

22) 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

23) 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

24) 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

25) 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

26) 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

27) 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

28) 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

29) 清河信敬、藤本純一郎、田口智子、塩沢裕介、齊藤洋平、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 LO4-16/06-16) におけるマーカー中央診断。第 49 回日本小児血液学会、第 23 回日本小児がん学会学術集会 仙台 2007.12

30) 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

31) 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

32) 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 WT1mRNA 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

33) 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

34) 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

35) 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

36) 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

37) 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 T-NHL 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

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

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

分担研究者 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

研究要旨： 神経芽腫の発症や進展に関与する新規がん関連遺伝子を同定し、発症分子機構を解明するとともに疾患特異的な新たな分子標的療法の開発を目指して、計 55 例の神経芽腫検体について、高密度 SNP アレイを用いたゲノムコピー数の異常およびアレルの不均衡のゲノムワイドなマッピングを行った。その結果、1) 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。2) MYCN 領域の増幅は複雑なゲノム構造を有することが判明し、マイクロアレイの結果および FISH 解析より複数の小さな 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た。3) 11q13 の高度増幅領域内に存在する MYEOV と 1p31 のホモ欠失領域に存在する NEGR1 が新たな神経芽腫の標的遺伝子であることが示された。

A. 研究目的

近年のめざましい集学的治療の進歩により小児悪性腫瘍の多くが治癒を期待できるようになってきたが、小児固形腫瘍の大部分は依然として予後不良である。そこで難治性小児固形腫瘍における特有の分子機構を解明し、それを標的とした、抗腫瘍効果が高くかつ副作用の少ない新たな治療法の開発を試みる。最近の分子生物学的解析技術の進歩により、従来の腫瘍細胞に生じている個々の異常を対象に研究を進めてゆく手法から、膨大な遺伝子情報を高速にかつ網羅的に解析する手法が開発され、様々ながんの研究に応用されている。そこで本研究では、難治性固形腫瘍の中で最も頻度が高い神経芽腫につき、12～25 万個の SNP 特異的オリゴヌクレオチドアレイ (Affymetrix® Gene Chip® 50k および 250k array) を用いて、平均 5.4～24kb の解像度で腫瘍ゲノムに生じたコピー数の変化および LOH の解析を行う。腫瘍細胞において共通してみられるゲノム変異の解析から疾患特有の標的遺伝子を同定し、次世代分子標的薬の創生のための分子基盤を構築する。

B. 研究方法

1. Affymetrix 社 50K/250K GeneChip microarray を用いたゲノム異常の網羅的探索：

検体としては、神経芽腫細胞株 25 株、臨床検体 30 例 (stage 3、4) を用いた。腫瘍試料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 により増幅する。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う。我々が開発した 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. 標的遺伝子の同定と遺伝子性状の解析：

解析した腫瘍におけるゲノムコピー数の変化のうちホモ欠失、LOH、UPD、gain および amplification の共通領域内に存在する遺伝子(群)につき、FISH 解析、real-time PCR 解析を行った。また 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った。さらに培養細胞を用いて、発現導入解析、ノックダウン解析を行い標的遺伝子の性状解析を試みた。

(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、東京大学の倫理審査委員会で審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(2003年3月)」を遵守することを条件に承認された。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本研究を実施した。

C. 研究結果

1. 神経芽腫における molecular allelo-karyotype :

解析した 55 例中 29 例が *MYCN* 増幅群であり、残り 26 例が *MYCN* 非増幅群であった。49 例に複数のゲノム異常が検出されたが 6 例にはほとんど微細なゲノム変異も検出されなかった。*MYCN* 増幅群、非増幅群に共通する最も高頻度なゲノム変異は 17q の増幅であった。これは全検体中 80%に検出された。また *MYCN* 増幅群では 1p の LOH が 60%、UPD が 27%であったのに対し、非増幅群では 1p の LOH が 24%、UPD が 12%であった。従来の報告と同様に *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 の増幅もそれぞれ全体のうち 58%、52%および 62%と高頻度に検出されたが、*MYCN* 非増幅群に頻度が高い傾向がみられた。

2. 神経芽腫における 2p24 領域の高度増幅 :

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、我々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。UTP-N-1 細胞株においては、50K アレイでは 5 個の異なる amplicon が検出されたが、より解像度の高い 250K アレイでは更に 8 個の amplicon が検出された。これらの amplicon は FISH 解析でも *MYCN* とは独立した amplicon であることが確認された。

3. 神経芽腫における 11q13 領域の高度増

幅 :

11q13 領域の高度増幅が新鮮腫瘍 2 例 (Case 22、Case23)で検出されたが、このうち 1 例 (Case22)の高度増幅領域は *CCND1* を含まないことが判明した。Case22 の高度増幅領域は約 340kb であり、この中には *CCND1* よりも約 360kb より下流の *MYEOV* のみ存在することをみいだした。すなわち 11q13 におけるこの 2 例の共通高度増幅域には *MYEOV* は含まれるが *CCND1* は含まれないことが確認された。*MYEOV* は t(11;14)(q13;q32)を有する多発性骨髄腫の転座切断点より同定されたがん遺伝子であり、卵巣癌や乳癌でも増幅が報告されている。この遺伝子の発現解析を行ったところ、それぞれ神経芽腫細胞株の 72%、新鮮腫瘍 54%に高発現が認められた。更に *MYEOV* の高発現が確認された NB-19 細胞株に *MYEOV*sRNA を導入し、ノックダウンを行ったところ、有意に細胞増殖の低下が認められた ($P = 0.0027$)。

4. 神経芽腫におけるホモ欠失領域 :

解析した 55 例の検体において計 50 箇所ホモ欠失が検出された。このうち 10 箇所は 2 検体以上で共通するホモ欠失領域であった。

検出した共通ホモ欠失領域のうち、16p13 は家族性神経芽腫の原因遺伝子が存在すると推定されている領域に極めて近傍であったため、この領域内に存在する *A2BP1* の解析を行った。RT-PCR 解析により、神経芽腫細胞株の 36%、新鮮腫瘍 13%で *A2BP1* の発現消失または低下が確認された。また細胞株 NB-19 で 1p31 域に約 390b のホモ欠失を検出し、この領域内に唯一 *NEGR1* が存在することをみいだしたが、*NEGR1* は細胞株 SJNB-6 の duplication の切断点に存在することも判明した。*NEGR1* は IgLON 細胞接着因子ファミリーの一員で神経細胞の接着や成長に関与することが知られている。このため更に発現解析を行ったところ、細胞株の 40%、新鮮腫瘍 42%で発現の消失または低下が認められた。特に予後不良群において有意な発現低下または消失が認められた ($P = 0.0041$)。次に *NEGR1* のホモ欠失が認められる NB-19 細胞株において、

NEGR1 の発現ベクターをリポフェクション法により導入し、機能解析を行ったところ、有意な細胞増殖の低下が認められた($P=0.019$)。

D. 考察

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 領域は胃癌、乳癌など成人の腫瘍で高度増幅が検出されており、この領域に存在する *CCND1* が標的がん遺伝子と考えられている。*CCND1* はこれまでに神経芽腫においても増幅や高発現が報告されていることから、成人の癌のみならず神経芽腫の発症や進展に関与していると推測されている。本研究で神経芽腫における 11q13 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 t(11;14)(q13;q32) を有する多発性骨髄腫の転座切断点より同定されたがん遺伝子であり、卵巣癌や乳癌でも増幅が報告されている。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 SJNB-6 細胞株の duplication の切断点に存在することから、この遺伝子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る。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が、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。

E. 結論

本研究では神経芽腫の 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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

5) 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.

6) Suzuki M, Kato M, Chen Y, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, 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).

2. 学会発表

1) Takita J, Chen Y, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Kato M, Kikuchi A, Hayashi Y, Ogawa S. Molecular allelokaryotyping analysis of neuroblastoma using high-density SNP-genotyping microarrays. 98th AACR Annual meeting. Los Angeles, April 14-18, 2007.

2) 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.

3) 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。

4) 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。

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

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

分担研究者 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

研究要旨： 難治性小児がん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システムの構築に応用することを目的に、Wilms 腫瘍、肝芽腫、神経芽腫遺伝子ライブラリー由来の小児がん特化 DNA チップを用いて、肝芽腫 80 症例、Wilms 腫瘍 44 症例について網羅的遺伝子発現解析を行った。Wilms 腫瘍について、癌部と非癌部の間で発現頻度の異なる遺伝子を抽出したほか、神経芽腫、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫との遺伝子発現プロファイル比較も行い、それぞれに特徴的なパターンを抽出した。

A. 研究目的

難治性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。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。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。本研究では、小児がんの特化した独自の DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析により、悪性度などの個性を規定する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を検索することを通して、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。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。

B. 研究方法

合計約 34,000 クローンからなる Wilms

腫瘍、肝芽腫、神経芽腫の3種の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、遺伝子発現解析に使用した。

遺伝子発現解析の対象とした凍結腫瘍組織から total RNA を調製し、品質のチェックを行った後、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プローブを作製し、チップへのハイブリダイゼーションを行った。各遺伝子の発現データから、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。Wilms 腫瘍については神経芽腫、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫の組織の遺伝子発現データとともにクラスタリング解析(スタンフォード大の Cluster、Treeview を使用)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。

C. 研究結果

Wilms 腫瘍、肝芽腫、神経芽腫遺伝子ライブラリー由来の小児がん特化 DNA チップを用いて、肝芽腫 80 症例、Wilms 腫瘍 44 症例について網羅的遺伝子発現解析