

を行った。チップ上の遺伝子については、公知データベースからの最新かつ詳細な遺伝子機能情報と染色体マッピング情報を収集・統合し、独自のデータベースを整備した。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($p < 0.001$)。そこで、予後と強く相関する上位ランクの 80 遺伝子について、特異的プライマーを設計・合成し、発現解析に用いていない新規肝芽腫症例に対して、半定量 RT-PCR による再現性の検証を開始した。Wilms 腫瘍については、これまでに癌部と非癌部の間で遺伝子ライブラリー中の発現頻度の異なる遺伝子を検索しデータベース化してきたが、今回病理組織像が類似し臨床上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。最も特徴的な発現パターンを示したのは神経芽腫であり、Tyrosine hydroxylase や神経成長因子受容体遺伝子の一つ TRKA 等の交感神経系で高発現を示す遺伝子群が特異的に高発現を示していた。また、興味深いことに Cydin 遺伝子群のメンバー間で神経芽腫と Ewing 肉腫に共通して高発現のもの、あるいは逆に神経芽腫以外で高発現のものが認められ、これらの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。

D. 考察

小児腫瘍由来遺伝子ライブラリーには各組織の発現プロファイルの特徴がよく反映されており、チップ化して網羅的解析を可能としたことで、それぞれの分子的背景の解明やそれを応用した診断、層別化システムの開発に有用であると期待される。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。臨床応用にあたっては遺伝子発現に加え、これらの臨床マーカーなどを組み合わせ、総合的な解析を目指したい。

E. 結論

自家製の小児がん特化型遺伝子チップを作製し、腎芽腫および肝芽腫の網羅的遺伝子発現プロファイリングを進めた。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Takenaga K, Nygren J, Zelenina M, Ohira M, Iuchi T, Lukanidin E, Sjöquist 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.
- 4) 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.

5) 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.

2. 学会発表

1) 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.

2) 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.

3) 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、于萌、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.

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

難治性小児がんの悪性度診断

分担研究者 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

研究要旨： 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。さらに細胞増殖・分化に関わる分子の発現解析を行い、従来の組織学的診断をさらに発展させた悪性度診断確立のための基礎データを得た。

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。本研究では、包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）を通じて、難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報を明らかにし、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。これを支える基盤整備として中央診断と検体保存システムを確立して診断法の標準化や、臨床・基礎研究の推進を図る。さらに、従来の組織学的診断を補填するべく、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。

B. 研究方法

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。

悪性リンパ腫（Burkittリンパ腫7株； Ramos, Daudi, EB-3, Raji, Balm18, Namalwa, Balm24）、Anaplastic large cell lymphoma 4株； SR-786, DEL, Su-DHL1, Karpas299）、神経芽腫（7株； SK-N-RA, SK-N-SH, LA-N-5, SK-N-BE(2), NB39nu, SMA-KAN, SMS-KCNR）の細胞株について、western blot法にて、細胞周期関連分子（Rb, phospho-Rb, p16, p21, p27）の発現について検討した。

（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。動物実験についても同様に細心の倫理的配慮を払った。

C. 研究結果

1. 悪性リンパ腫中央病理診断システム（JPLSG）：

悪性リンパ腫として登録された症例319例についてRapid Reviewによる中央病理診断を行った。Group Reviewが終了し、コンセンサス診断ができた症例は、191例であった。下記のごとく、免疫組織化学

染色を全例に施行した。組織型は、Diffuse large B-cell lymphoma 29 例、Burkitt lymphoma 33 例、Mature B-cell lymphoma 3 例、B-ALL 2 例、Precursor B lymphoblastic lymphoma 9 例、Precursor T lymphoblastic lymphoma 34 例、nonT nonB lymphoblastic lymphoma 1 例、Anaplastic large cell lymphoma (systemic) 62 例、Cutaneous anaplastic large cell lymphoma 6 例、Hodgkin lymphoma 5 例、Peripheral T cell lymphoma 1 例、EBV related lymphoproliferative disorders 2 例、Myeloid sarcoma 1 例、Biphenotypic leukemia 1 例で、検体不良で組織診断できなかった症例が 2 例あった。

鑑別診断のための免疫染色項目

病型	必須マーカー	追加マーカー
Mature B BL DLBCL	CD20 CD79a CD3 TdT MIB1	CD10 BCL2 BCL6 Mum1 (IRF4) EBER1 (ISH)
LBL T-LBL B-LBL	CD20 CD79a CD3 CD43 TdT MPO	CD56 CD99 CD10 CD7
ALCL	CD30 ALK1 and/or ALKc CD2,3,5 CD43 EMA Perforin and/or Granzyme B	CD15 CD79a, CD20 CD45RO CD56 LMP-1 BCL-2 EBER1 (ISH)

2. 神経芽腫中央病理診断システム (JNBSG) :

33 例について中央病理診断システムにより、病理診断 (INPC 病理国際分類) を行った。

Favorable Histology 6 例、Unfavorable Histology 24 例、検体不良で Neuroblastoma, NOS と診断された例が 2 例、壊死組織で診断できなかった例が 1 例あった。組織型別では、Neuroblastoma 24 例 (undifferentiated, high MKI 1, poorly

differentiated, low MKI 8, poorly differentiated intermediate MKI 5, poorly differentiated, high MKI 6, poorly differentiated, NOS 1, Neuroblastoma, NOS 3)、Ganglio-neuroblastoma, intermixed 2 例、Ganglioneuroblastoma, nodular 5 例、Ganglioneuroma 1 例であった。Neuroblastoma, undifferentiated subtype については、HE 染色のみでは鑑別診断が困難であるため、tyrosine hydroxylase, PGP9.5, synaptophysin, CD99, desmin, CD3, CD20, CD79a, TdT などの免疫組織化学染色を加えた。

3. 横紋筋肉腫中央病理診断システム (JRSG) :

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。HE 染色に加え、免疫組織化学染色 (desmin, MyoD1, myogenin) を全例に施行した。組織型別では、Embryonal rhabdomyosarcoma 15 例、alveolar rhabdomyosarcoma 15 例、rhabdomyosarcoma, NOS 1 例、possible rhabdomyosarcoma 1 例、Non-rhabdomyosarcoma 4 例であった。

4. 細胞周期関連分子の発現について

Burkitt リンパ腫 7 株においては、全例 p16 発現がなく、Rb/phospho-Rb は過剰発現の傾向がみられた。P21, p27 発現については細胞株の間でばらつきがあり、一定の傾向を示さなかった。

Anaplastic large cell lymphoma 4 株においては、1 例を除いて p16 発現がなく、Rb/phospho-Rb, p27 は全例発現していた。

神経芽腫 7 株においては、1 例を除いて p16 発現がなく、p27 は全例発現していた。

D. 考察

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は確立し、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。

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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

- 5) 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.

2. 学会発表

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

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

難治性小児がんの薬物代謝関連遺伝子多型解析とその臨床応用

分担研究者 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

研究要旨： 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 登録例を対象として、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。

A. 研究目的

小児急性リンパ性白血病（ALL）の治療成績は改善し、長期生存率は約 80%に達している。一方で、治療抵抗性を示し致命的な結果に至る例が 10-20%存在し、また、治療合併症により致命的な結果に至る例、治療毒性等により重篤な障害を残し生存する例が存在することも現状である。小児 ALL に対する治療は 8-10 種類程度の化学療法剤等による多剤併用療法が標準的であり、既知の予後因子（年齢、診断時白血球数、白血病細胞の染色体・遺伝子異常、治療初期反応性など）に基づき、それぞれの患者のリスクに応じた層別化治療が選択される。多くの臨床研究では ALL 患者全体を 2-5 グループ程度のリスクグループに層別化し、治療を適用している。近年、薬物代謝関連分子の遺伝子多型と治療効果・毒性の個体差の関連を示す報告を散見する。抗白血病治療による効果・毒性の個体差の機序を解明し、個別化治療を確立することは小児 ALL 治療における今後の重要な課題のひとつである。

小児 ALL に対する前方視的臨床試験である「小児急性リンパ性白血病に対する寛解導入療法と早期強化療法の有効性・安全性に関する検討試験（TCCSG ALL L04-16, 改訂第 2 版 L07-16-02）」登録例を対象として、治療反応性・毒性の個体差と薬物代謝関連遺伝子多型の関連を解明する。

B. 研究方法

1) 対象

TCCSG ALL07-16-02 研究に参加した小児 ALL 患者のうち、本研究への協力の同意が代諾者から得られた者を対象とする。患者が研究参加の決定等の意志を表すことができる場合は、法的な資格のある代諾者からの同意の他、さらに未成年者である患者の意志を確認する。研究参加施設は自施設の倫理審査委員会で本研究の実行について承認を得なければならない。

2) 試料

寛解導入療法終了後、初回強化療法前に採取された、顕微鏡下で ALL 細胞を含まない末梢血 5ml を用いる。

3) 解析対象遺伝子

小児 ALL に対する薬物治療では、一般に、プレドニゾン（PSL）、ビンクリスチン（VCR）、シクロホスファミド（CY）、アントラサイクリン系薬剤（ANTs）、メトトレキサート（MTX）、メルカプトプリン（6MP）などの薬剤が使用されることから、以下の遺伝子群が解析対象候補である。

- GST

PSL、VCR の代謝産物は、さらに glutathione S-transferase（GST）で解毒される。GSTT1 欠損の頻度は、白人で 20% に対し、アジア人では 80% と高率であり（Landi, 2000）、GSTT1 欠損多型は、PSL に対する初期治療反応性が良好であることが報告されている（Meissner 2000）。

- SLC19A1

Solute carrier (SLC)19A1 は葉酸、および MTX を細胞内外に運搬するトランスポー

ターであり、*SLC19A1* 80G/A 多型は細胞内への取り込み効率に影響を及ぼすことが報告されている (Chango, 2000)。小児 ALL 例において *SLC19A1* 80A アレルを有する例の無イベント生存率は *SLC19A1* 80GG 例よりも低いこと、*SLC19A1* 80AA 例の大量 MTX 後の MTX 血中濃度は他の遺伝子型例よりも遷延することが報告されている (Laverdiere, 2002)。

- DHFR

MTX 及び MTX polyglutamate の標的酵素である dihydrofolate reductase (DHFR) と thymidylate synthase (TYMS) の遺伝子多型は、酵素の発現量や小児 ALL の予後と関連することが報告されている (Goto, 2001, Rocha, 2005)。

- MTHFR

葉酸およびメチオニン代謝に重要な役割を担う methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の遺伝子多型は、低用量 MTX 投与に伴う肝、消化器、血液毒性と関連することが報告されている (Ulrich, 2001, van Ede, 2001, Toffoli, 2003)。

- TPMT

6MP を不活化する作用を有する thiopurine S-methyltransferase (TPMT) の活性が低下する遺伝子多型を有する例においては、6MP の効果は増強し通常の投与量においても毒性を生じ得る (Relling, 1999)。

- ABC transporters

代謝された VCR、ANTs は、ABC トランスポーターから排泄される。*ABCB1* 3435C>T 多型は薬剤耐性に関連する P 糖蛋白質発現量に関与することが報告されている (Hoffmeyer, 2000)。

このほかに以下の遺伝子群も解析対象候補と考えられる。*CYP*, *aldehyde oxidase*, *xanthine oxidase* (*XO*), *hypoxanthine phosphoribosyltransferase* (*HPRT*), *CR*, *AKR*, *TYMS*, *NR3C1*, *FPGS*, *GGH*, *methylenetetrahydrofolate dehydrogenase* (*MTHFRD1*), *metionine synthase* (*MS*), *serine hydroxymethyltransferase* (*SHMT*), *transcobalamin2* (*Tc2*), *cystathionase*, *cystathionine-β-synthase*, *cyclin D1* (*CCND1*), *inosine triphosphate pyrophosphatase* (*ITPase*), *VDR*, *NQO1*。

4) 解析方法

遺伝子多型解析は、末梢血全血からゲノ

ム DNA を抽出し PCR 増幅を行い、直接シーケンシング法等によりジェノタイピングを行う。治療効果、毒性などに関する臨床情報は、TCCSG ALL07-16-02 研究により TCCSG データセンターに提出されたフローシートなどから入手する。遺伝子多型と治療効果・毒性などに関する臨床情報の関連を統計学的に解析する。主な評価予定項目は、①遺伝子多型と minimum residual disease ; MRD により評価された治療効果との関連、②遺伝子多型と再発率の関連、③遺伝子多型と生存率の関連、④遺伝子多型と治療関連毒性の関連である。TCCSG ALL07-16-02 研究には約 150 例の登録が見込まれている。本研究は探索的研究であり、事前に統計学的に必要な症例数を設定しない。

(倫理面への配慮)

TCCSG ALL07-16-02 研究への参加者の中から、自由意思により本研究に参加する者のみを研究対象とする。本研究の対象である患者は未成年者であるため、担当医は代諾者からインフォームドコンセントを取得する。また、患者が研究参加の決定等の意志を表すことができる場合は、法的な資格のある代諾者からの同意の他、さらに未成年者である患者の意志を確認する。TCCSG ALL07-16-02 研究登録患者には TCCSG データセンターから登録番号が付与され、登録患者の個人情報が患者診療施設から外部に知られることはない。対象患者から採取された検体、臨床情報を示すフローシートには登録番号のみが添付される。したがって、本研究の担当者・関係者が対象患者の個人情報を知り得る機会はない。検体提供患者の診療施設において、TCCSG ALL07-16-02 研究、および本研究の倫理審査が行われ、承認されていることを必須とする。本研究に提供される検体は末梢血 5ml のみである。本研究の遺伝子解析の結果は、現時点で対象患者の治療を変更するための明確な根拠にはなり得ず、対象患者の治療に介入するものではない。したがって本研究が対象患者の治療に危険を及ぼすことはない。

C. 研究結果

「小児急性リンパ性白血病に対する寛解導入療法と早期強化療法の有効性・安全性に関する検討試験（TCCSG ALL L04-16, 改訂第2版 L07-16-02）付随研究 小児急性リンパ性白血病における治療反応性、毒性の個体差と薬物代謝関連遺伝子多型の検討」研究計画書を作成し、多施設共同研究における検体受領、処理、保存体制の整備・確認を行った。2007年11月に本遺伝子解析研究、12月にTCCSG ALL L07-16-02 臨床研究の実行について、国立成育医療センター倫理審査委員会の承認を得た。TCCSGに多施設共同研究による検体提供の手配を依頼した。GST, TYMS 遺伝子多型解析の準備を開始した。

D. 考察

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、それぞれの治療レジメンに特異的な効果、毒性を生じ得ると考えられ、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。

大部分の小児がん臨床研究は、疾患の頻度、診療施設の受け入れの問題から多施設共同研究として行われている。これまで、国内の多施設共同小児がん臨床研究において、前方視的な胚細胞系列の遺伝子解析研究は行われていない。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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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*. 2007; 84: 1067-9

2) 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*. 2007; 84: 798-9.

3) Mori T. [Malignant lymphoma] Gan To Kagaku Ryoho. 2007; 34: 162-6. Review. Japanese.

4) 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. 東京医学社, 2007; 39; 2216-18

5) 嶋 晴子, 森 鉄也：合併症と支持療法・臓器合併症対策. 「新小児がんの診断と治療」別所文雄, 杉本 徹, 横森欣司編, 診断と治療社, 2007; 111-116

6) 森 鉄也：小児悪性リンパ腫患児の看護. 「がん看護実践シリーズ13 小児がん」牧本 敦編, メジカルフレンド社, 2007; 79-110

2. 学会発表

1) 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MTX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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者 大喜多 肇 国立成育医療センター研究所
発生・分化研究部 機能分化研究室 室長

研究要旨： 難治性小児がんの一つである Ewing 肉腫の発症モデル系 UET-13/TR/EWS/ETS を用いた解析により EWS/ETS 融合遺伝子の腫瘍発生における機能を解析した。また、新たな EWS/ETS キメラ遺伝子の標的遺伝子として DKK2 を同定した。同分子の発現制御異常が腫瘍発生・進展に関わっていると考えられ、その腫瘍化における機能解析に着手した。

A. 研究目的

Ewing 肉腫は、小児期～若年成人期に好発する骨軟部の悪性腫瘍である。近年、化学療法をはじめとする治療法の進歩により治療成績は向上しつつあるものの、治癒率は 50 %程度でありいまだに難治性の腫瘍である。本腫瘍の 90 %以上では、EWS 遺伝子と ETS ファミリーの転写因子が染色体転座によって融合し、キメラ遺伝子が形成される（EWS/ETS キメラ遺伝子）。このキメラ遺伝子は、本腫瘍に極めて特異性が高く、確定診断をつける上で重要であり、かつ、腫瘍発生にも重要な役割を演じている。このキメラ遺伝子の機能を明らかにすることが、Ewing 肉腫の発生機序の解明に役立つばかりでなく、新たな治療法の開発の基盤情報を提供するものとなると考えられる。

そこで、本研究は、Ewing 肉腫特異的キメラ遺伝子とその発生母地と想定される骨髄間質細胞に発現させる Ewing 肉腫発症モデルの解析を更に進め、それによって新たな治療標的分子を探索することを目的とした。特に Ewing 肉腫や他の小児腫瘍のトランスクリプトーム解析により、キメラ遺伝子によって転写を調節される標的遺伝子を探索した。

B. 研究方法

Ewing 肉腫の発生母地と想定される未熟な間葉系細胞である U-ET13 細胞と tetracycline repressor (tetR) を用いた

誘導発現系である U-ET13/TR 細胞に tetracycline operon 制御下に Ewing 肉腫特異的キメラ遺伝子（EWS/FLI1 あるいは EWS/ERG）を発現する発現ベクターを導入した細胞（U-ET13/TR/EWS/FLI1, U-ET13/TR/EWS/ERG、）は、テトラサイクリン制御下に EWS/FLI1 あるいは、EWS/ERG を発現する。本細胞が腫瘍形質を有するかどうか検討するために、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。

Ewing 肉腫の細胞株、神経芽腫、横紋筋肉腫、その他の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った。その中で Ewing 肉腫のみに特異的に発現が高い分子を選択した。同分子の発現を定量 PCR 法で確認した。同分子の発現が EWS/ETS によって制御されているかどうかを確認するために、UET-13/TR/EWS/FLI1 細胞、UET-13/TR/EWS/ERG 細胞にて、EWS/FLI1 あるいは EWS/ERG を誘導し、時間経過を追って定量 PCR 法にて同分子の発現量を測定した。

更に、同分子の上流の転写調節領域をルシフェラーゼの上流に結合させたレポーターベクターと EWS/FLI1 あるいは EWS/ERG の発現ベクターを 293 細胞に同時に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。また、同分子の転写活性化が ETS を介しているかどうかを検討するために、転写調節領域の欠失変異体、3 箇所存在す

る ETS 認識配列への変異を導入したレポーターベクターを作成した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、関連法規を遵守し、あらかじめ国立成育医療センター動物実験委員会へ申請し、承認を得て行った。

C. 研究結果

骨髄間質細胞である U-ET13 細胞に EWS/ETS キメラ遺伝子をコンディショナルに発現する U-ET13/TR/EWS/FLI1 細胞、U-ET13/TR/EWS/ERG 細胞をヌードマウスの皮下に移植しキメラ遺伝子の発現を誘導したが、明らかな腫瘍形成は認めなかった。また、同細胞は soft agar 上でのコロニー形成能がなく、遊走能にも有意な変化は認めなかった。一方で、U-ET13/TR/EWS/FLI1 細胞、U-ET13/TR/EWS/ERG 細胞は、キメラ遺伝子発現によりマトリゲル中を浸潤する能力が有意に上昇した。これらの結果から、EWS/FLI1、EWS/ERG キメラ遺伝子のみでは U-ET13 細胞の完全なトランスフォームには不十分であるものの、部分的には EWS/ETS は UET-13 細胞に腫瘍細胞の形質を与えるものであると考えられた。

Ewing 肉腫、神経芽腫、その他の小児腫瘍細胞のトランスクリプトーム解析より Ewing 肉腫のみで高発現あるいは低発現である複数の遺伝子を同定した。その中で、Wnt シグナル関連分子である DKK2 に着目した。DKK は Dickkopf family に属する分泌型の分子で、Wnt シグナルを抑制することが報告されている。DKK family には DKK1 ~ DKK4 の 4 種類の分子が確認されている。この中で、Ewing 肉腫において DKK2 の発現が高く、DKK1 の発現が低いことから両分子に着目した。DKK1 及び DKK2 の発現を Ewing 肉腫細胞及び他の小児腫瘍細胞において定量 PCR 法で測定した結果、Ewing 肉腫に特異的に DKK2 の発現が高く、DKK1 の発現が低いことが判明した。

DKK2 の発現が EWS/ETS によって制御されているかどうかを確認するために、UET-13/TR/EWS/FLI1 細胞、UET-13/TR/EWS/ERG 細胞にて、EWS/FLI1 あるいは EWS/ERG を誘導したところ、時間を

経るに従って DKK2 の発現が上昇し、DKK1 の発現が減少することが明らかとなった。

さらにルシフェラーゼアッセイの結果、EWS/FLI1、EWS/ERG、EWS/E1AF のすべてが、DKK2 の転写調節領域を活性化することが明らかとなった。欠失変異体を用いた検討で、単離した転写調節領域中の 3 ヶ所の ETS 認識配列のうち 5'側に存在する 2 ヶ所が重要であることが推測され、それらの配列に変異を導入すると、EWS/ETS による転写活性化がほとんど消失した。

以上より DKK2 が EWS/ETS によって転写を調節される標的遺伝子であることが判明し、DKK2 の転写調節領域に存在する 2 個の ETS 認識配列が関与することが示唆された。

D. 考察

本年度の研究結果より、EWS/FLI1、EWS/ERG キメラ遺伝子が、骨髄間質細胞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。過去に我々が示してきた遺伝子発現レベル、形態解析の結果とあわせ Ewing 肉腫の形質は、腫瘍の発生源地が有する環境下においてキメラ遺伝子によって与えられることが示唆された。本培養実験系は、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。

本研究で着目した DKK1、DKK2 はいずれも Wnt シグナルのアンタゴニストとして報告されている。しかしながら、ノックアウトマウスの形質などをみると両分子の機能が必ずしも同一ではない可能性が考えられる。Ewing 肉腫における Wnt シグナルの解析はほとんどなされておらず、EWS/ETS による DKK1/DKK2 の制御異常は、細胞分化、腫瘍化の両面に関わっている可能性がある。現在、Wnt シグナルの調節、そのほかの機能に着目して解析している。これらの分子は、新規治療

標的となる可能性もあり、今後、DKK1/2 の Ewing 肉腫における機能を解析する予定である。

E. 結論

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。

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) 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.
- 4) 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.
- 5) 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)
- 6) 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)

7) 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.

8) 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.

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-Fli1 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, 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 (TCCSGL04-16/06-16) 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) 齊藤洋平, 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, 齊藤正博, 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) 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, 齊藤正博,

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.

15) 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.

16) 陳基明, 中館尚也, 齊藤正博, 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.

17) 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, 齊藤正博, 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.

18) 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.

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

分担研究者 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 室長

研究要旨：小児急性骨髄性白血病の診断時の検体を用いたキメラ遺伝子のスクリーニングを行った結果、110例中49例（44%）に検討した8種類のキメラ遺伝子のいずれかが検出された。急性骨髄性白血病の代表的な染色体異常であるt(8;21)によって生じるAML1-ETOのキメラ遺伝子は110例中27例（約25%）にみとめられ、欧米に比較して高頻度であった。このキメラ遺伝子を利用した治療後の微小残存病変の解析では、治療初期のAML1-ETOのキメラ遺伝子の発現レベルの推移には多様性がみられ、治療反応性の指標となる可能性が示唆され、解析を進めている。

A. 研究目的

小児急性骨髄性白血病（AML）の臨床試験であるJPLSG AML-05プロトコールの登録時に、主なキメラ遺伝子のスクリーニングを実施し、同時に行われる染色体分析結果と比較することで、キメラ遺伝子を対象にした遺伝子診断の臨床的意義に関して検討を行う。診断時に染色体分析不能例や染色体分析では異常を検出されない症例も存在すると予想され、キメラ遺伝子のスクリーニングを実施することでより正確な分子診断が可能になると期待される。また診断時にキメラ遺伝子が検出された症例を対象に、同一の治療法における治療早期から治療終了時点まで経時的にキメラ遺伝子の発現量を定量することで、完全寛解例でのいわゆる微小残存病変（Minimal residual disease, MRD）の評価を行い、寛解導入療法および寛解後療法に対する治療反応性と再発との関連について検討を行う。今までのAMLにおけるキメラ遺伝子を用いたMRD研究は主に再発の予知として検討されてきたが、明確な関連は示されていない。しかし治療反応性の指標としての治療早期のMRDと再発との間に関連が見いだされれば、治療における層別化因子となることが期待できる。

B. 研究方法

診断時の骨髄液あるいは末梢血の有核細胞から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（AML1-ETO、CBF β -MYH11、MLL-AF6、MLL-AF9、MLL-ELL、TLS/FUS-ERG、PML-RAR α 、NUP98-HOXA9）の測定を行った。治療後のMRD解析では、全て骨髄液からRNAを抽出し、該当するキメラ遺伝子の発現を定量した。

（倫理面への配慮）

本研究は、関連法規を遵守し、施設の臨床研究審査委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で実施した。全ての検体は、文書によるインフォームドコンセントを得た後に収集された。また検体提出、収集において全て匿名化を行い、検体提供者の人権の保護、個人情報保護に注意を払って実施した。

C. 研究結果

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は、解析した110例中49例（44%）にいずれかのキメラ遺伝子が検出された。その内訳は、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例であった。NUP98-HOXA9は1例も検出されなかった。

治療後のキメラ遺伝子の経時的なモニタリングを行うMRD解析には、診断時のスクリーニングでキメラ遺伝子が陽性の症例から21例が登録され、57検体の解析を行った。21例中15例がAML1-ETO陽性の症例であり、現時点で少数例での経時的な検討が可能であった。AML1-ETOの診断時のRNA 1 μ gあたりの発現量は中央値で6.4 x 10⁵コピー（範囲；5.9 x 10⁴～1.4 x 10⁶コピー、n=15）であったが、寛解導入療法1コース後では、中央値7.6 x 10²コピー（範囲；4.0 x 10¹～6.1 x 10⁴コピー、n=13）、寛解導入療法第2コース後では、中央値4.3 x 10²コピー（範囲；0～4.0 x 10³コピー、n=10）、強化療法1コース後では、中央値5.8 x 10¹コピー（範囲；0～1.1 x 10³コピー、n=6）であった。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みられた。寛解導入療法第2コース以降のMRDは緩徐な低下を示す傾向がみられた。

D. 考察

現在までに小児AML110例の診断時のキメラ遺伝子スクリーニングを行い、27例においてt(8;21)(q22;q22)の染色体異常の結果として形成されるAML1-ETOのキメラ遺伝子が検出された。その頻度は約25%であり、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る。今後は染色体分析結果との比較を行う必要がある。またAML1-ETOのキメラ遺伝子を対象にしたMRDの解析では、寛解導入療法終了時の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。

E. 結論

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が44%の症例で陽性であった。今後は染色体分析との比較を行い、その頻度をより明らかにしていく。またこのキメラ遺伝子を利用したMRDの解析により、AML1-ETO陽性例では経時的なAML1-ETOの減少様式に多様性がみられるため、さらに解析を続けその臨床経過（再発）との関連について明らかにする予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

4) 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

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
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	新小児がんの診断と治療.	診断と治療社	東京	2007	20-24
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	新小児がんの診断と治療.	診断と治療社	東京	2007	111-116
森鉄也	小児悪性リンパ腫患児の看護.	牧本敦	がん看護実践シリーズ13 小児がん.	メジカルフレンド社,	東京	2007	79-110

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
Suzuki K, <u>Kiyokawa N</u> , Taguchi T, Takenouchi H, Saito M, Shimizu T, <u>Okita H</u> , <u>Fujimoto J</u> .	Characterization of monocyte-macrophage-lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro.	Int J Hematol	85	384-389	2007
Taguchi T, Takenouchi H, Shiozawa Y, Matsui J, Kitamura N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Takahashi T, <u>Okita H</u> , <u>Fujimoto J</u> , <u>Kiyokawa N</u> .	Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system.	Exp Hematol	35	1398-1407	2007
Miyagawa Y, <u>Okita H</u> , Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, <u>Fujimoto J</u> , Hata J-I, Umezawa A, <u>Kiyokawa N</u> .	Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells.	Mol Cell Biol	印刷中		
Katagiri YU, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, <u>Okita H</u> , <u>Fujimoto J</u> , <u>Kiyokawa N</u> .	The detergent-insoluble microdomains, rafts can be used as an effective immunogen.	Glycoconj J	印刷中		
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
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
Kikuchi A, <u>Mori T</u> , <u>Fujimoto J</u> , 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	印刷中		
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
Ashihara E, Nakamura S, Inaba T, Taki T, <u>Hayashi Y</u> , Shimazaki C.	A novel AF10-CALM fusion transcript in gamma/delta-T cell type lymphoblastic lymphoma.	Am J Hematol	82	859-860	2007
Chen Y, Takita J, Mizuguchi M, Tanaka K, Ida K, Koh K, Igarashi T, Hanada R, Tanaka Y, Park MJ, <u>Hayashi Y</u> .	Mutation and expression analyses of the MET and CDKN2A genes in rhabdomyosarcoma with emphasis on MET overexpression.	Genes Chromosomes Cancer	46	348-358	2007
Shimada A, Ichikawa H, Taki T, Kubota C, Hongo T, Sako M, Morimoto A, Tawa A, Tsukimoto I, <u>Hayashi Y</u> .	Low Frequency of KIT Gene Mutation 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

Furuichi Y, Goi K, Inukai T, Sato H, Nemoto A, Takahashi K, Akahane K, Hirose K, Honna H, Kuroda I, Zhang X, Kagami K, <u>Hayashi Y</u> , 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
Shimada A, Taketani T, Kikuchi A, Hanada R, Arakawa H, Kimura H, Chen Y, <u>Hayashi Y</u> .	AML1 mutation and FLT3-internal tandem duplication in leukemia transformed from myelodysplastic syndrome.	J Pediatr Hematol Oncol	29	666-667	2007
Tomizawa D, Koh K, Sato T, Kinukawa N, Morimoto A, Isoyama K, Kosaka Y, Oda T, Oda M, <u>Hayashi Y</u> , 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
Nemoto N, Suzukawa K, Shimizu S, Shinagawa A, Takei N, Taki T, <u>Hayashi Y</u> , 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
Shimada A, Taki T, Kubota C, Itou T, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, <u>Hayashi Y</u> .	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
Shimada A, Taki T, Kubota C, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, <u>Hayashi Y</u> .	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
Shimada A, <u>Hayashi Y</u> , 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
Komuro H, Saihara R, Shinya M, Takita J, Kaneko S, Kaneko M, <u>Hayashi Y</u> .	Identification of side population cells (stem-like cell population) in pediatric solid tumor cell lines.	J Pediatr Surg.	42	2040-2045	2007
Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, <u>Hayashi Y</u> .	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
Shimada A, Hirato J, Kuroiwa M, Kikuchi A, Hanada R, Wakai K, <u>Hayashi Y</u> .	Expression of KIT and PDGFR is associated with a good prognosis in neuroblastoma.	Pediatr Blood Cancer	50	213-217	2008
Kawamura M, Kaku H, Taketani T, Taki T, Shimada A, <u>Hayashi Y</u> .	Mutations of GATA1, FLT3, MLL-partial tandem duplication, NRAS, and RUNX1 genes are not found in a 7-year-old Down syndrome patient with acute myeloid leukemia (FAB-M2) having a good prognosis.	Cancer Genet Cytogenet	180	74-78,	2008
Suzuki M, Kato M, Chen Y, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Atsushi Takahashi A, Ikeda H, Kuwano H, <u>Ogawa S</u> , <u>Hayashi Y</u> .	Whole genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single nucleotide polymorphism genotyping-microarrays	Cancer Science	印刷中		

Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, <u>Hayashi Y</u> , 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	印刷中		
Shimada A, Kato M, Tamura K, Hirato J, Kanegane H, Takechi Y, Park MJ, Sotomatsu M, Hatakeyama S, <u>Hayashi Y</u> .	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	印刷中		
Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A, Kurokawa M, Chiba S, Gilliland DG, Koeffler HP, <u>Ogawa S</u> .	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
Nannya Y, Taura K, Kurokawa M, Chiba S, <u>Ogawa S</u> .	Evaluation of genome-wide power of genetic association studies based on empirical data from the HapMap project.	Hum Mol Genet	16	3494-3505	2007
Lips EH, de Graaf EJ, Tollenaar RA, van Eijk R, Oosting J, Szuhai K, Karsten T, Nanya Y, <u>Ogawa S</u> , 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
Kawazu M, Yamamoto G, Yoshimi M, Yamamoto K, Asai T, Ichikawa M, Seo S, Nakagawa M, Chiba S, Kurokawa M, <u>Ogawa S</u> .	Expression profiling of immature thymocytes revealed a novel homeobox gene that regulates double-negative thymocyte development.	J Immunol	179	5335-5345	2007
Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, <u>Ogawa S</u> , 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
Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, <u>Ohira M</u> , 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
Kaneko S, <u>Ohira M</u> , 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
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
Tomioka N, Oba S, <u>Ohira M</u> , 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
Kurata K, Yanagisawa R, <u>Ohira M</u> , Kitagawa M, Nakagawara A, Kamijo T.	Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa up-regulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells.	Oncogene	27	741-754	2008

Toita N, Hatano N, Ono S, Yamada, Kobayashi R, Kobayashi I, Kawamura N, Okano M, Satoh A, <u>Nakagawa A</u> , 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
Li C, Takino H, Eimoto T, Ishida T, Inagaki A, Ueda R, Suzuki R, Yoshino T, <u>Nakagawa A</u> , Nakamura S, Inagaki H.	Prognostic significance of NPM-ALK fusion transcript overexpression in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma.	Mod Pathol	20	648-655	2007
Yokoyama S, Kasahara M, Morioka D, Fukuda A, Arai K, Mori T, Shioda Y, Nakagawa S, Shimizu N, <u>Nakagawa A</u> .	Successful living-donor liver transplantation for Wilson's disease with hemophagocytic syndrome.	Transplantation	84	1067-1069	2007
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
森鉄也.	悪性リンパ腫.	癌と化学療法	34	162-166	2007
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
Watanabe N, Haruta M, Soejima H, Fukushi D, Yokomori K, Nakadate H, <u>Okita H</u> , 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
Maeda M, Tsuda A, Yamanishi S, Uchikoba Y, Fukunaga Y, <u>Okita H</u> , Hata J.	Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney in a child.	Pediatr Blood Cancer	50	180-183	2008
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
Narimatsu H, <u>Yokozawa T</u> , 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
Narimatsu H, Emi N, Kohno A, Iwai M, Yanada M, <u>Yokozawa T</u> , 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