

■ 特集 小児固形腫瘍の分子生物学 (その3) : 最新の知見

細胞処理と検体保存ならびに検体供給システム

清河 信敬* 藤本 純一郎**

はじめに

近年の分子生物学の進歩にともない、小児固形腫瘍に対する分子生物学的解析研究は研究対象や方法論がますます多様化してきている。これに対して、小児固形腫瘍は頻度としては非常にまれな疾患であり、今後小児固形腫瘍研究を推進していくためには、各症例から得られる組織検体を意識的、体系的、かつ研究の多様性に対応できる状態で保存し、活用していくことが重要である。小児がんの年間発症数はごく少数であり、検体そのものが大変貴重である。「意識的に」とは医師ならびに研究者が、小児がん患者検体の保存が大変重要であることの意識を持ち、使命感を持って行うことであると考え。「体系的に」とは貴重な検体を効率的に利用できるような保存を最初から考案し、統一した考えに基づいて保存を実施することであると考え。このことは「研究の多様性に対応できる」こととも密接に結びついており、システムとして保存することが質の保証にもつながると考える。最近、小児固形腫瘍に対する複数の臨床試験が実施されているが、質の高い臨床試験で得られた臨床情報を検体に付加することによって研究用検体ははるかに高い価値を持つことになる。筆者らは小児がんの克服には図1に記載した4つの柱が必須であると考えている。ここで記載する事項は、この柱のひとつであると考えている。本稿では、とくに臨床試験の中央診断の一環として行われる細胞処理、保存ならびに検体供給という一連のシステムについて、一部具体的な方法を

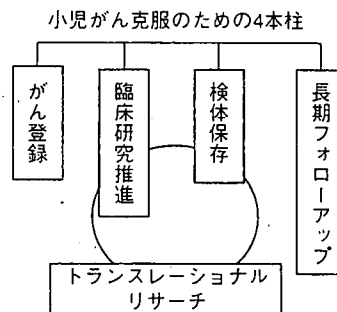


図1 小児がん克服のための4本柱
4つの柱は独立して機能するのではなく相互に関連しながら機能することによって大きな力となる。

記載しながら概説する。

I. 細胞処理と保存

小児固形腫瘍の場合、血液腫瘍のように比較的簡単に浮遊細胞を得ることができない。リンパ腫に比較すると間質成分がめだつものもあり、また、壊死等が存在する可能性も高い。したがって、診断用・研究用に検体を使用・保存する場合、適切な検体か否かを確認していることが重要である。この作業にはやはり病理医が関与しているほうが良い。病理医と良好な関係を築きながら質の高い検体入手を心がけることが大切である。

1. ホルマリン液固定標本

生検や腫瘍摘出手術に伴う腫瘍切除標本が提出された場合、通常の病理組織学的検索のためのホルマリン液固定標本作製が行われ、パラフィン包埋組織標本として保存される。以降の分子生物学的解析の根拠となる適切な病理組織学的診断を得るためには、組織の最大断面を含んだ、最も良好な部分をホルマリン液固定標本にすることが基本

* 国立成育医療センター研究所発生・分化研究部
〔〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1〕

** 国立成育医療センター研究所副所長

である。パラフィン包埋ブロックとして、常温で半永久的に保存が可能であり、保存方法として非常に簡便なため、後方視的研究を行う場合でも、検体を得やすい利点がある。近年の解析技術の進歩に伴い、ホルマリン固定パラフィン包埋切片標本に対して *in situ* hybridization (ISH) 法による mRNA 発現解析が行われるほか、この標本から DNA および RNA を抽出して解析することが可能となっており^{1,2)}、とくにマイクロダイセクションによって組織中の腫瘍細胞を選択的に回収して分子生物学的解析を行う場合には非常に有利な方法である。また、同様にパラフィン切片から腫瘍細胞の核を分離してフローサイトメトリーを用いた DNA ploidy の検索を行うことも可能である。また、パラフィン切片を用いた免疫組織化学的解析を合わせて行うことにより、遺伝子発現の状況と蛋白発現の状況とを比較検討することが可能であるが、パラフィン切片に用いることができる抗体はある程度限定されてしまう。

パラフィン包埋標本からの DNA 抽出は、有機溶剤により脱パラフィン処理を行い、蛋白消化後、フェノール/クロロホルムで精製する方法が一般的で、さらにさまざまな改良が試みられている³⁾。RNA 抽出は同様に切片を脱パラフィン処理、蛋白消化後、酸性フェノール等で抽出する方法 (AGPC 法) などがある。現在、カラム精製を用いたものなど、パラフィン包埋標本に対応したさまざまな核酸抽出キットも複数発売されており、簡便に核酸抽出を行うことができる。

しかし、パラフィン包埋切片標本を用いた解析の場合、どうしても検体の質という面で十分ではない場合が多い。とくに、ホルマリン液による固定時間が長いと、DNA の断片化など、核酸の劣化が起こり、とくに 24 時間以上固定した組織ではその傾向が著しいとされている。そのため、細胞や組織を処理する場合、通常の組織学的検索のためのホルマリン液固定標本のみでなく、さまざまな分子生物学的検索を想定した細胞の処理が望ましい。

2. 新鮮凍結組織の保存

ホルマリン液固定以外の細胞処理としては、まず、新鮮凍結組織の保存が必要である。通常、ド

ライアイスアセトン等を用いて、組織を急速に凍結し、 $-85\sim-75^{\circ}\text{C}$ で保存する。容器に入れた組織をそのまま凍結する方法のほか、OCT コンパウンドに包埋して保存することができる。とくに、OCT 包埋は、迅速診断の際に作製したブロックをそのまま冷凍で保存すれば良いので便利であり、切片を作製して組織中の腫瘍細胞の存在やおおまかな比率を確認できるほか、組織を必要な分量だけ切り出すことができる。また、新鮮凍結切片の免疫組織科学的解析では、パラフィン切片に比較して、より多彩な抗体を用いた検討が可能である。OCT 包埋による新鮮凍結組織は、通常の方法によって質の高い DNA および RNA を抽出することが可能である。保存検体を研究目的で配布する場合も、組織の状況を HE 染色で確認することが可能であるため検体の質の管理に極めて有利と思われる。

3. 浮遊細胞の調製と保存

組織を培養液中で細切して遊離した細胞を回収し、さまざまな解析に用いることができる。染色体検査はその代表的なものであるが、この場合は無菌的に操作することが必要である。また、フローサイトメトリーを用いた表面抗原解析や、DNA ploidy 解析を行うことができる。また、特定の抗原の発現を指標にして腫瘍細胞をセルソーターあるいはマグネットビーズ等を用いて分離することで、純化した細胞集団の核酸抽出を行うことが可能である。余剰の細胞は、細胞凍結液 (10% DMSO 添加牛胎児血清や、市販の細胞凍結液) に浮遊させた状態で液体窒素中に凍結保存することができる。

4. その他の細胞処理と保存

その他、分子生物学的検索ではないが、電子顕微鏡的検索用に組織をグルタルアルデヒドで固定し、保存することも有用である。また、蛋白質、核酸とも一定の水準で保たれ、組織構築も保存されている固定方法として、AMeX (固定に用いる試薬アセトン、安息香酸メチル、キシレンのそれぞれ頭文字) 固定法が報告されており⁴⁾、今後汎用されていく可能性がある。また、以上に述べてきたような保存検体から核酸抽出することはもちろん可能ではあるが、やはり新鮮組織から直接抽

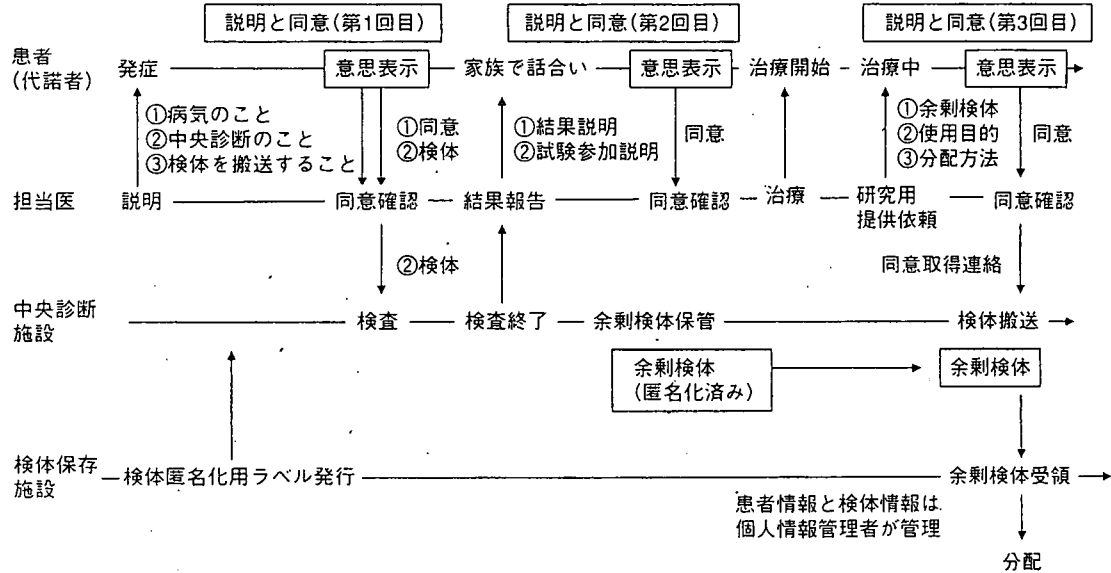


図2 検体の提出、提供、保存、分配に関する倫理的配慮
わが国で行われている小児がんの臨床試験では多くでこのような手順で検体提供者からの協力を得ている。連結可能状態の間なら同意の撤回はいつでもできることが保障されていること。

出するほうが、より良好な検体を得ることができると。そのため、あらかじめ特定の検索を行う予定がある場合は、新鮮組織から直接 RNA あるいは DNA 抽出して解析、あるいは保存することが好ましい。

II. 検体保存と供給システム

小児がんに対する臨床試験ではそのほとんどで中央診断、検体保存ならびに供給というシステムを採用している。国立成育医療センターでは、複数の臨床試験と連携して検体の保存と供給を可能とするシステムを構築しつつある。ここでは、われわれが作りつつあるシステムの紹介を含め小児がん患者の検体保存と供給システムを概説する。

1. 小児がん臨床試験の現状

小児がんについては血液腫瘍、神経芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、肝芽腫、脳腫瘍などに対して各種規模の治療研究グループが組織され、一部で公的資金の支援を受けながら多施設共同臨床試験が実施されている。大まかな数字だが、血液腫瘍に対する臨床試験が10数件、神経芽腫2件、横紋筋肉腫4件、ユーイング肉腫1件等が2007年8月現在公的資金を受けて実施中の臨床

試験である。これらの臨床試験の多くでなんらかの形の中央診断が実施されている。小児がんの検体バンクは、この中央診断のプロセスを経た後に、もはや診断には必要なくなった検体（これを余剰検体と呼ぶ）を対象として将来の研究用に使用することを目的に保存している。かつ、臨床試験で得られた臨床情報（年齢、性、病型、部位、治療成績等）を検体に付与した上で保存し使用することを目的としている。研究として余剰検体を保存する場合、当然のことながら必要性を説明し、十分に理解していただいた上で自由意思に基づいた同意を得て保存が可能となる。このような配慮も含め、上記の臨床試験のほとんどで統一した考えに基づいた説明と同意手順を採用している。以下に、このような配慮を含めて保存に際し必要な手順を示す。

2. 中央診断ならびに検体保存に対する倫理的配慮

ここでは、臨床試験全体の流れを説明しながら検体保存の手順を作成する（図2）。当然ながら、臨床試験を実施する施設ではその試験に対して倫理審査を受け施設長の承認が得られていることが前提である。現在、医学研究に関わる指針は、「ヒト

ゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」,「臨床研究に関する倫理指針」,「疫学研究に関する倫理指針」,「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」,「遺伝子治療臨床研究に関する指針」の5つがあり,また採取組織に対する考え方は「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」として発表されている。医学研究者はまずはこれらの指針をよく読み,その精神を十分に理解する必要がある。とくに,ゲノム指針はわが国における最初の指針でありその基本的考え方が他の指針にも生かされていることより,必ず熟読しておく必要がある。文末に指針等のホームページ情報を載せておく。なお,米国では,施設の倫理委員会委員に対する教育・研修は当然あるが,医学研究者に対しても教育・研修コースが設けられておりそれを修了した後に臨床研究に参加できる仕組みが作られている。わが国でも同様のシステム作りが必要になってくると思う。

1) 検体採取と中央診断用検体搬送

特定の臨床試験に適合する可能性のある小児がん患者を診た場合,担当医は,試験への参加の可能性を説明しつつ臨床試験が定める中央診断への検体搬送の説明を行い同意を得る(第1回目:中央診断のための検体搬送に関する説明と同意)。同意が得られて初めて検体を中央診断施設に搬送することが可能となる。

2) 余剰検体の保存

検体に対して節約を心がけながら診断を進めていき,診断結果を下して報告した時点で検体は基本的には余剰となる。余剰検体を保存する目的は再検査も当然あるものの,その必要がある場合は少ない。中央診断結果ならびにその他の情報に基づいて臨床試験への適合性が確認されれば,担当医は臨床試験への参加について説明を行い同意を得る(第2回目:臨床試験への参加に関する説明と同意)。この同意に基づいて治療が開始されるわけだが,通常この時期は患児・家族ともに不安定な時期でもある。一般に治療開始後1カ月程度で患児の状態も改善し患児・家族と医療関係者との関係も確立してくるといえる。したがって,この頃に余剰検体の研究用保存について説明を行い同意を得ることを臨床試験計画書では推奨している

(第3回目:余剰検体の保存に関する説明と同意。検体の研究用提供に関する説明と同意とも言える)。

3) 匿名化のルール

上記のプロセスを経て余剰検体を研究用に保存することが可能となる。その際,治療の進行に伴って蓄積されていく臨床情報を最終的に付加できるシステムを確保しながら個人情報にも配慮した保存システムとする必要がある。また,分配のルールで述べるが,分配する検体に付与する番号はすべて異なることが望ましい。そのような点を配慮した匿名化システムを考慮する必要があり,①保存用匿名化番号は症例登録番号や研究参加番号など臨床試験で使用するものとは異なること,②検体は可能な限り複数本に分けて保存し個々の検体に別の匿名化番号を付与する,といったルールが考えられる。現在使用しているシステムは,同一患者検体を複数に分割(あるいは分注)した場合,それぞれのピース(あるいはチューブ)に個別の匿名化番号シールを貼付するというものである。匿名化番号シールは匿名化プログラムを掲載したパソコンとシール印刷用プリンタで作成する。これらを保存用チューブであればチューブ,OCTコンパウンド包埋凍結であれば,検体を包んだパラフィルム等にシールを貼付することになる。

4) 分配のルール

臨床試験の中で検体が保存されている場合,当然のことながら,その検体は臨床試験を実施している研究グループの財産であると言える。したがって,分配については各々のグループが持つ基準に従って配分が決まる。一般には,グループ内に研究審査委員会が存在し,グループに属する研究者から申請のあった研究計画について,その科学的妥当性ならびに倫理的妥当性(とくに同意の範囲内の使用かどうか)について審査し,許可を得るという仕組みである。研究者は当然所属する施設の倫理審査を得ている必要がある。このような二重審査によって科学性と倫理性を担保している。研究グループ以外に分配が可能か否かについては研究グループの考え次第である。小児がん検体はきわめて微量であるため,効率的な使用を考慮する必要がある。ある特定の mRNA 発現を

みたいという研究計画に対して、例えば cDNA を 1~2 μ l, 希望する症例分を送付する, といった作業が果たして効率的かどうかははなはだ疑問である。むしろ, 研究グループあるいはグループ外で解析を専門に行う施設を設置し, 研究者はアイデアのみを提供するといったシステムが効率的なのかも知れない。今後の検討課題であろう。また, 検体の保存や分配が正しく行われているかといった監査システムも今後検討すべき事項である。公開と透明性確保に担保されたシステムの構築が望まれる。

補 1: 小児血液腫瘍の治療研究グループでは, 患者の寛解期末白血球等を保存する計画を立てており近くその計画が開始される。すでに薬物代謝酵素等の SNP が薬効に影響する等の報告も多数あり, 今後そのような解析結果に基づいた研究計画が立案されるものと思われる。また, そのような発症機序, 各種の late effect の現れやすさ等ゲノムと深くかかわる事項の研究が必要となってきた。検体の保存と供給システムはそのような要請にも答える必要がある。

補 2: 医学研究に関する倫理指針は以下のホームページで閲覧できる。

厚生労働省: 医学研究に係る厚生労働省の指針一覧

<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/index.html>

文部科学省: ライフサイエンスの広場 | 生命倫理・安全に対する取組

http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/seimei_rinri.html

国立保健医療科学院: 疫学倫理指針

<http://www.niph.go.jp/wadai/ekigakurinri/>

[index.htm](#)

おわりに

小児がんの臨床試験における中央診断システムは財政面での検討は必要ではあるが, ほぼ確立されたと言える。診断後の余剰検体の保存システムは構築しつつあるのが現状だが, 質の高い検体を研究用に確保することは診療に携わる医師らと保存する側の研究者らとの連携で成立するものである。したがって強固な信頼関係が築かれているか否かが大切な要素だと思う。小児がん臨床試験の財政的基盤は磐石ではないのと同じように, 中央診断や検体保存・供給システムの経費についてもその基盤はまだまだ弱い。関係者の連携と努力によって基盤の部分の地固めを望む。

文 献

- 1) Takano Y, Kato Y, Sato Y, et al: Clonal Ig-gene rearrangement in some cases of gastric RLH detected by PCR method. *Pathol Res Pract* 188 (8): 973-980, 1992
- 2) Martin RK, Archer KT, Tuttle RM: Detection of ptc in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Comparison of radiolabeled DNA hybridization and direct incorporation of digoxigenin-11-dUTP into RT-PCR products. *Diagn Mol Pathol* 3 (4): 233-239, 1994
- 3) Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, et al: Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 10 (4): 265-271, 2001
- 4) 佐藤雄一, 土屋紅緒, 亀谷 徹: AMeX 固定標本の作製と分子形態学的診断への応用, III. 分子生物学的手法を用いた形態学的同定-4. 検体の取り扱い, 病理診断と分子生物学・遺伝学, 病理と臨床 14: 251-254, 1996

Cell Processing, Storage, and Distribution

NOBUTAKA KIYOKAWA*¹, JUNICHIRO FUJIMOTO*²

Department of Developmental Biology*¹, and Vice General Director*², National Research Institute for Child Health and Development

Key words : Childhood cancer, Tissue bank, Translational research, Clinical research, Ethical considerations.

Jpn. J. Pediatr. Surg., 39(11) ; 1266~1271, 2007.

In order to improve the clinical outcome for children suffering from solid tumors, it is crucial to build up systems to perform central diagnosis, cell/tissue storage, and distribution in a form that takes advantage of progress in molecular biological analysis and clinical research. Recently, not outcomes for such patients have begun to improve. Here, the way tissues are processed, stored, and distributed is discussed, including ethical considerations in this process.

周産期医学

第 37 卷 11 号 (11 月号) 定価 2,680 円

特集 新生児の消化管疾患

<生理・発達>

| | |
|-----------------|-------|
| 胎児消化管機能の発達 | 佐世正勝 |
| 新生児の消化吸収機能の発達 | 東海林宏道 |
| 羊水と消化管の発達 | 市場博幸 |
| 腸管免疫の機能と発達 | 伊藤良子 |
| 母乳栄養と消化・吸収機能の発達 | 水野克己 |
| 吸啜・嚥下の発達とその評価 | 向井美恵 |

<臨床編>

| | |
|--------------------------------------|-------|
| 消化管疾患の出生前診断 | 伊藤茂 |
| 新生児ミルクアレルギーの病態と診断・治療 | 宮沢篤生 |
| 新生児消化管出血; 当院外科症例の検討 | 黒田達夫 |
| 新生児医療における probiotics, prebiotics の効能 | 和田万里子 |

新生児消化器外科疾患の統計と

| | |
|------------------------|-------------------------------------|
| その変遷・予後 | 田口智章 |
| 主要な新生児消化管外科疾患の診断と治療の要点 | 先天性食道閉鎖症, 上部消化管閉鎖, 下部消化管閉鎖, ヒルシュスプル |
| ング病, 鎖肛 | 毛利健 |
| 腸回転異常症, 腹壁破裂臍帯ヘルニア | 森村絵里 |
| 新生児壊死性腸炎: 病態と診断, 予防 | 向井基 |
| 胎便関連性腸閉塞の概念と診断・治療 | 窪田昭男 |
| 新生児における胃食道逆流症の診断と治療 | 鈴木則夫 |
| 臍帯潰瘍を伴う上部消化管閉鎖 | 大山牧子 |
| 新生児消化器疾患におけるストーマ | ケア |
| | 山崎紀江 |

小児腫瘍・胚細胞腫瘍における癌幹細胞

大喜多 肇 秦 順一
清河信敬

はじめに

小児腫瘍，なかでも神経芽腫，Wilms腫瘍，肝芽腫に代表される胎児性腫瘍は，乳幼児期に好発する。これらの腫瘍は，胎生期の発生途上の組織が腫瘍化すると想定され，腫瘍細胞が発生母地の有する分化能を保持している。一方，胚細胞腫瘍は，原始生殖細胞から配偶子へ分化する過程の生殖細胞に由来する腫瘍であり，他の腫瘍と比較して広範な分化能を有しており，胚体外組織を含むさまざまな組織へ分化する。そのなかに多分化能を有する幹細胞が存在することが古くより示唆されてきた。近年，癌幹細胞の概念が脚光を浴びているが，胎児性腫瘍と胚細胞腫瘍は，その原型ということもできるであろう。ここでは，胎児性腫瘍の幹細胞的性格と近年における癌幹細胞研究の現状，胚細胞腫瘍の幹細胞としての特性について概説する。

I. 小児腫瘍

1. 胎児性腫瘍

胎児性腫瘍は，胎児組織に由来する腫瘍であり，主に新生児期から乳幼児期にかけて発生する。発生途上の器官，組織の原基が発生母地と考えられており，腫瘍細胞が発生母地の有する分化能・成熟能を形態学的，機能的に保持している。代表的な胎児性腫瘍としては，神経芽腫，腎芽腫，肝芽腫，網膜芽腫，髄芽腫などが挙げられる。成人の癌の場合は，組織の幹細胞，前駆細胞あるいは分化・成熟した細胞から腫瘍が発生すると考えられており，癌幹細胞の存在が想定されている。しかし，この幹細胞が発生母地であるのか，癌化の過程で幹細胞的性質を得るのかは解明されていない。これに対して，胎児性腫瘍の場合は，発生母地が，

元々自己複製能と多分化能を有する組織形成の原基(芽組織)であることが特徴であり，幹細胞の性質を有する組織から腫瘍が発生している可能性が極めて高い。そこでまず，胎児性腫瘍のなかでも腎芽腫を例に挙げ，腫瘍細胞の有する幹細胞的性質に関して概説し，次に胎児性腫瘍における癌細胞研究の現状について，研究が先行している神経芽腫，網膜芽腫での知見を解説したい。

2. 腎芽腫(Wilms腫瘍)

腎芽腫(Wilms腫瘍)は，代表的な胎児性腫瘍であり，小児腎腫瘍では最も頻度が高い。本腫瘍は，胎生期腎組織(後腎組織)と類似した組織像を示すことが特徴である。ヒトでは，胎生5週頃に中間中胚葉の尾側に造後腎間葉が形成され，中腎管から尿管芽と呼ばれる上皮の管を誘導する。造後腎間葉には，後腎芽細胞と呼ばれる未熟な間葉系細胞が存在する。尿管芽は造後腎間葉の凝集と分化を誘導し，分岐を繰り返す。最終的には造後腎間葉より，糸球体や近位尿細管，遠位尿細管や間質が，尿管芽からは集合管や尿管が，それぞれ形成され，腎が形作られる。これに対してWilms腫瘍は，胎児期の後腎芽細胞に類似する腫瘍細胞(blastemal cell)と共に上皮成分，間葉成分から構成される(図1)。上皮成分には尿細管や糸球体に類似した上皮，稀に異所性上皮(扁平上皮，粘液上皮など)がみられる。間葉成分としては，未分化な線維芽細胞様細胞から成る間葉組織，通常，腎には存在しない横紋筋がみられる。まれに平滑筋，軟骨，脂肪組織などがみられることがある。後腎組織成分が優位な腫瘍，上皮成分が優位な腫瘍，間葉成分が優位な腫瘍など，さまざまである。Wilms腫瘍は，胎児性腫瘍のなかでも最も器官発生を模倣する腫瘍であり，1つのWilms腫瘍内に腎発生過程が再現されるということもできる。また，Wilms腫瘍の前駆病変として造腎組織遺残nephrogenic rest(腎芽腫症nephroblastomatosis)が知られている。造腎組織遺残は，生後の腎実質内に後

*国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部

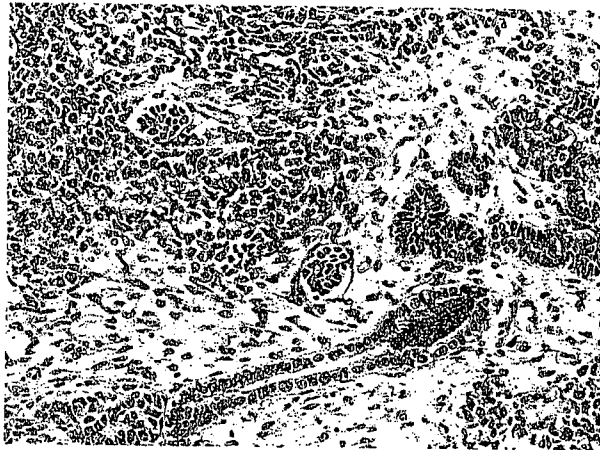


図1 Wilms腫瘍の組織像 後腎芽細胞類似細胞と共に、未熟な尿管、糸球体様構造を認める。

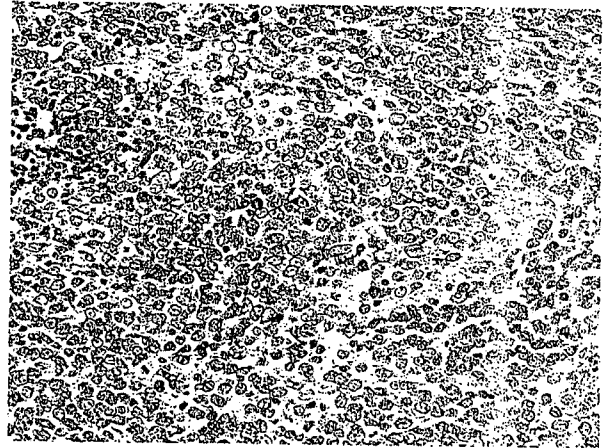


図2 神経芽腫の組織像 未熟な神経芽細胞が神経細線維を伴って増殖している。

腎組織類似組織が巣状に遺残する病変であり、多巣性ないしびまん性に認められる場合は、腎芽腫症と呼ばれる。Wilms腫瘍では、15～30%程度に造腎組織遺残あるいは腎芽腫症を合併すると考えられる。このこともWilms腫瘍が胎児期の後腎組織を発生母地とし、胎児期の未熟な腎組織(後腎組織)の異常な増殖により発生することの一つの根拠となっている。

Wilms腫瘍のblastemal cellが発生途上の後腎芽細胞に形態学的に類似すること、1つの腫瘍内にblastemal cell、上皮、間葉成分が混在する場合でも、共通の遺伝子異常が認められ、共通の腫瘍性幹細胞から上皮、間葉成分が生じていると考えられること、blastemal cellが幹細胞に特有に発現する遺伝子群を発現することなどから、Wilms腫瘍内に存在するblastemal cellが多分化能と自己複製能を含む幹細胞的性質を有すると想定される。また、本腫瘍のなかには化学療法によってblastemal cellが消失して間葉成分(特に横紋筋成分)のみが残存する症例が存在するが、このような症例はviableな腫瘍成分が残存するにもかかわらず予後良好であること、一方、化学療法によってもblastemal cellがびまん性に残存する腫瘍では予後が悪いことなども、blastemal cell中に癌幹細胞が含まれているとの仮説を支持する所見である。以上のように、Wilms腫瘍のblastemal cellが発生途上の後腎芽組織と同様の幹細胞的性格を有する組織であること、Wilms腫瘍のblastemal cellのなかには癌幹細胞が含まれている可能性が高いことが想定されるが、Wilms腫瘍は培養実験系が難しいこともあり、腫瘍内に存在

する癌幹細胞の同定はなされていない。

3. 神経芽腫

神経芽腫は、最も代表的な小児期の固形腫瘍で、神経堤を発生母地とする。神経堤は、神経板の側方から発生する胎児期に一過性に存在する組織で、神経堤細胞は、遊走して、末梢神経細胞(交感神経節細胞、副腎髄質細胞)、Schwann細胞、メラノサイト、腸管内分泌細胞などに分化する。神経芽腫は、そのうち交感神経節細胞あるいは副腎髄質細胞に分化する途上で腫瘍化したものと考えられる。一般的には神経芽腫と呼ばれる場合が多いが、実際は一連の成熟段階を示す腫瘍より成り、神経芽腫、神経節芽腫、神経節腫と分類され、神経芽腫群腫瘍とも総称される。このうち最も未熟な腫瘍が神経芽腫であり、小型で未熟な神経芽細胞が神経細線維を伴って増殖する(図2)。神経芽細胞と神経節様細胞に分化した細胞が混在するものが神経節芽腫で、成熟した神経節細胞のみから構成される腫瘍は、神経節腫と呼ばれる。また、神経芽腫で特筆すべきことは、1歳6ヵ月未満に発見される腫瘍では、自然に退縮するか分化する腫瘍が多いことである。また、成熟傾向にある神経芽腫では、間質にSchwann(様)細胞が比較的豊富にみられる。

神経芽腫における癌幹細胞の存在は、細胞株を用いた研究により示唆されている。本腫瘍は、さまざまな分化・成熟度の神経芽細胞より構成されるが、神経芽腫から樹立された細胞株は、交感神経系の細胞のみならず、Schwann細胞やメラノサイトなどの神経堤由来組織の形質を示す細胞も出現しうる。Rossらは、

神経芽腫の培養細胞を形態と形質によって3種類に分類する試みを行っている¹⁾。すなわち、神経芽細胞様の形質を有するN-type細胞、大型扁平で基質への接着性が強いS-type細胞、形態学的に両者の中間のI-type細胞である。N-typeは、交感神経の神経芽細胞に類似した細胞で、小型で神経突起様の突起を有する。基質に弱く接着するが、細胞同士はよく接着する。一方、S-typeは、神経細胞ではなく、メラノサイトやSchwann細胞、平滑筋のマーカーを示すことがある。I-typeは、当初はN-typeとS-typeの中間intermediateの形態を示す細胞として同定された。すなわち、短い神経突起様の突起と基質への強い接着性と遊走性を示す細胞である。しかしながら、I-type細胞は、N-typeあるいはS-type様の細胞に分化できることから、現在では神経芽腫の癌幹細胞の候補と考えられている。N-typeと比較して、soft agar上でのコロニー形成能や免疫不全マウスでの腫瘍形成能が高いことも、この細胞が神経芽腫の癌幹細胞に近いことを示唆している。ただし、I-typeの細胞が全て神経芽腫の癌幹細胞と証明されたわけではなく、I-typeの細胞のなかに幹細胞が含まれているものと思われる。

近年、さらに詳細な神経芽腫の癌幹細胞の研究が行われている。神経芽腫の中にHoechst色素を排出できるSP (side population) 細胞が存在し非対称性分裂によりSP細胞と非SP細胞になることが示され、同細胞が、ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2) や ABCA3 といったABCトランスポーターを発現すること、高い薬剤排出能を有することから化学療法抵抗性の癌幹細胞である可能性が示唆されている²⁾。神経芽腫は、小児固形腫瘍で最も頻度が高く、未だに治療抵抗性の症例が存在することから、癌幹細胞の研究がこれからも盛んに行われるものと考えられる。

4. 網膜芽腫

網膜芽腫は、乳幼児に好発する眼球内の悪性腫瘍で、網膜構成細胞由来の腫瘍と考えられる。網膜芽腫では、少数の網膜芽腫細胞が ABCG2 や aldehyde dehydrogenase 1, minichromosome maintenance 2 (MCM2), stem cell antigen-1 (Sca-1), p63 などの幹細胞マーカーを発現することが示されている³⁾。また網膜芽腫の細胞株にはHoechst色素を排出できるside population細胞が極少数ながら存在することが示されている。以上の知見は網膜芽腫における癌幹細胞の存在を示唆している。しかし、これらの細胞が自己複製能や分化能を有しているかなどの検討は未だなされていない。

II. 胚細胞腫瘍

1. 胚細胞腫瘍の組織発生

胚細胞腫瘍は、原始生殖細胞が成熟した胚細胞になる過程に発生した腫瘍と考えられている。多くは、性腺(精巣、卵巣)に発生するが、仙尾部、縦隔、後腹膜、松果体などの性腺外組織からも発生する。性腺外組織からの発生例は、迷入遺残した原始生殖細胞由来と考えられている。組織型としては、胚細胞腫(セミノーマ)、胎児性癌、卵黄嚢腫瘍、絨毛癌、奇形腫(成熟型、未熟型)などが含まれる。精巣胚細胞腫瘍の場合、半数以上は単一組織型であるが、30~40%は1つの腫瘍内に複数の組織型が存在する複合組織型である。胚細胞性腫瘍の組織発生は未だ明らかではないが、精巣の場合、大部分の胚細胞腫瘍は精細管内胚細胞腫瘍 intratubular germ cell neoplasia (ITGCN) を経て発生するとの考え方が最も有力である(図3)⁴⁾。精母細胞性セミノーマや乳児の卵黄嚢腫瘍と奇形腫は、ITGCNを伴うことがなく、別の発生経路が存在すると考えられている。浸潤性の腫瘍では、ITGCNとの類似点や未熟な形質よりセミノーマが最も上流の病変と考えられている。未分化な胎児性癌やセミノーマと共に分化した腫瘍である奇形腫が混在すること、時に原発巣が胎児性癌で転移巣が奇形腫という症例が存在することなどから、腫瘍内に多分化能を有する腫瘍性の幹細胞が存在することが古くより想定されてきた。

2. マウスとヒトの胎児性癌細胞

胚細胞腫瘍内に存在する幹細胞の研究は、ヒトよりもマウスにおいて先行して研究されてきた。ヒトでは、胚細胞性腫瘍が初期胚のモデル系として考えられるが、マウスでは、ヒトよりも古くからテラトーマ(奇形腫)、テラトカルシノーマ(奇形癌)が胚細胞由来腫瘍の実験系として用いられてきた。マウスでは、テラトーマを高率で自然発症する近交系が確立され、また系統によらず、初期胚を精巣や腎被膜に移植することによりテラトカルシノーマを誘発することができる。マウスのテラトカルシノーマには3胚葉性の組織と共に、幹細胞が存在すると考えられており胎児性癌細胞 embryonic carcinoma cell (EC細胞) と呼ばれ、同細胞がヒトの胎児性癌細胞に相当すると考えられている。実際にマウスのEC細胞は、1個の細胞でテラトカルシノーマを形成することができること⁵⁾、また、EC細胞を胚盤胞に注入することによりキメラマウスを作製可能で、EC細胞由来の細胞が体細胞に寄与し

図3 精巣胚細胞腫瘍の組織発生の概念と初期発生 精巣胚細胞腫瘍の組織発生の概念を簡略化して示した。胚細胞からITGCNを経てセミノーマが発生すると想定されている。胎児性癌は初期胚の胚盤胞に近い形質を示すと考えられる。乳児奇形腫、乳児卵黄嚢腫瘍、精母細胞性セミノーマの前駆病変は明らかではない。

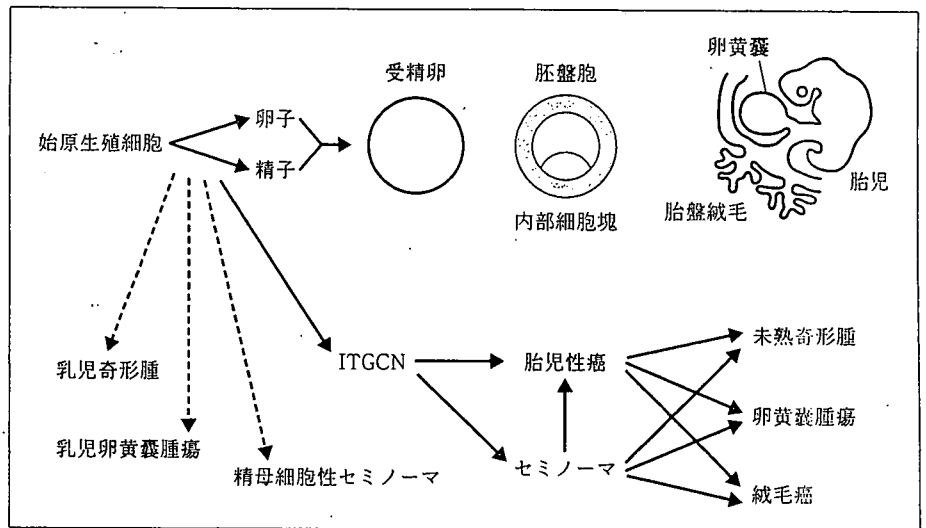


表1 胎児性癌(EC)細胞と胚性幹(ES)細胞, 胚性生殖(EG)細胞の比較

| | ヒト | | | マウス | | |
|----------|------------------|-----------|--------|--------------------|-----------|--------|
| | EC細胞 | ES細胞 | EG細胞 | EC細胞 | ES細胞 | EG細胞 |
| 主な起源 | 精巣, 卵巣, その他の生殖細胞 | 胚盤胞の内部細胞塊 | 始原生殖細胞 | 精巣, 卵巣あるいは初期胚の異所移植 | 胚盤胞の内部細胞塊 | 始原生殖細胞 |
| Oct-3/4 | + | + | + | + | + | + |
| SSEA-1 | - | - | + | - | - | - |
| SSEA-3 | + | + | + | - | - | - |
| SSEA-4 | + | + | + | - | - | / |
| TRA-1-60 | + | + | + | - | - | - |
| TRA-1-81 | + | + | + | - | - | - |

うることから、同細胞の幹細胞としての性質が証明されている。

ヒトにおいては、胚細胞腫瘍のなかで、胎児性癌やセミノーマ内に多分化能を有する幹細胞が存在すると考えられる。セミノーマの培養細胞はほとんど樹立されておらず、胎児性癌を用いた実験系が用いられている。Andrewsらは、精巣原発胎児性癌の肺転移からTera-2という培養細胞株を樹立した。その細胞株をヌードマウスに移植した後、移植腫瘍から培養系に戻し、胎児性癌幹細胞を含むと思われるいくつかのsubcloneを樹立した⁶⁾。これらのEC細胞をヌードマウスへ移植すると神経を含むいくつかの組織へ分化した。また、我々は、精巣由来混合型胎児性癌より細胞株NCR-G3を樹立した⁷⁾。同細胞は、浮遊細胞と付着細胞から成るが、浮遊細胞では、胎児性癌や初期胚に特異的なマーカーである stage specific embryonal

antigen-3 (SSEA-3)やSSEA-4が発現しているのに対し、付着細胞には、SSEA-1, carcinoembryonic antigen (CEA), human chorionic gonadotropin (hCG), desminなど種々の分化形質が出現する。さらにレチノイン酸処理により分化が促進される。G3細胞はクローニングによっても同一の形質を示すのでヒト胚細胞性腫瘍の幹細胞を含んでいると考えられる。

これらのEC細胞の形質は、胚性幹細胞 embryonic stem cell (ES細胞)や初期胚と比較のもとに解析されている。マウスEC細胞はSSEA-1⁺, SSEA-3⁻, SSEA-4⁻, TRA-1-60⁻, TRA-1-81⁻であり、ES細胞、胚盤胞の内部細胞塊と同じ発現パターンを示す(表1)。一方、ヒトEC細胞は、SSEA-1⁻, SSEA-3⁺, SSEA-4⁺, TRA-1-60⁺, TRA-1-81⁺であり、マウスEC細胞とは異なる発現パターンを示すが、ヒトES細胞と同じパターンである。このように、マウスとヒ

トのEC細胞は胚盤胞の内部細胞塊あるいはそれに由来するES細胞に類似したマーカーを発現している。興味深いことに胎児の始原胚細胞由来である胚性生殖細胞embryonic germ cell (EG細胞)とEC細胞は異なったマーカーを発現している。また、遺伝子プロファイリングの結果からも、ヒト胚細胞性腫瘍のなかで、胎児性癌が、ヒトES細胞と最も類似した遺伝子発現プロファイルを示しており、セミソーマがそれに次いでいる⁸⁾。特に、転写因子であるoctamer-binding transcription factor 3/4 (Oct3/4), sex determining region Y-box 2 (Sox2), forkhead box protein D3 (FOXD3) やDNAメチル基転移酵素であるDNA methyltransferase 3B (DNMT3B) など、初期胚で機能する分子が胎児性癌、ES細胞で共通して発現している。これらのことから、EC細胞が、三胚葉系の細胞へ分化しうる全能性をもった細胞である胚盤胞の内部細胞塊に相当する形質を有することが示唆される。さらにこれらの発現解析からOct3/4のような幹細胞マーカーが胎児性癌の診断に有用であることが示されるなど診断病理へ応用されつつある。今後は、ヒト胚細胞腫瘍組織内に潜む幹細胞の同定が課題であると共に、それらの幹細胞と成人癌の癌幹細胞の特性の異同等の検討が重要と考えられる。

おわりに

胎児性腫瘍や胚細胞性腫瘍は、古くから現在の癌幹細胞仮説に相当する概念でとらえられてきた。癌幹細胞研究は、実験系の容易さなどから血液系腫瘍が先行している。しかし、最近、神経芽腫などの難治性胎児性腫瘍の癌幹細胞研究が注目されており、今後、その

知見が蓄積されていくと期待される。一方、ヒト胎児性癌は、これまでもヒト初期胚のモデルとして研究されてきたが、近年のヒトES細胞、EG細胞の出現により、それらの細胞と共に初期胚発生のモデル系として、今まで以上に研究されていくものと考えられる。

文 献

- 1) Cheung, N.K.V., Cohn, S.L. eds. : Neuroblastoma, Springer, New York, 2005, 55-61
- 2) Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G. et al. : A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. Proc Nat Acad Sci 2004, 101 : 14228-14233
- 3) Seigel, G.M., Campbell, L.M., Narayan, M. et al. : Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. Mol Vis 2005, 11 : 729-737
- 4) Ulbright, T.M., Amin, M.B., Young, R.H. : Tumors of the testis, adnexa, spermatic cord, and scrotum. Atlas of Tumor Pathology 3rd Series, AFIP, Washington, DC, 1999, 41-58
- 5) Kleinsmith, L.J., Pierce, B. : Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. Cancer Res 1964, 24 : 1544-1551
- 6) Andrews, P., Damjanov, I., Simon, D. et al. : Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. Lab Invest 1984, 50 : 147-162
- 7) Hata, J., Fujimoto, J., Ishii, E. et al. : Differentiation of human germ cell tumor cells in vivo and in vitro. Acta Histochem Cytochem 1992, 25 : 563-576
- 8) Sperger, J.M., Chen, X., draper, J.S. et al. : Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. Proc Natl Acad Sci 2003, 100 : 13350-13355

Experience with oral interferon-alpha in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera

To the Editor: Prolonged subcutaneous interferon-alpha (IFN- α) therapy frequently results in high drop-out rates because of toxicity [1]. IFN- α administered through the oromucosal route at doses ranging between 37.5 and 150 IU thrice daily [2,3] has resulted in significant responses with minimal toxicity in patients with Sjögren's syndrome [2] and hepatitis B [3]. We designed a pilot trial to evaluate the efficacy and tolerability of oral IFN- α for patients with essential thrombocythemia (ET) or polycythemia vera (PV). Patients were eligible if they refused to take, had failed, or were intolerant to standard medications. Failure to respond to standard medications was defined as, for ET, inability to reduce platelets to normal levels after a minimum of 6 months of therapy with hydroxyurea and/or anagrelide, and for PV, as inability to reduce by at least 50% the frequency of phlebotomy or splenomegaly after a minimum of 6 months of therapy with hydroxyurea. Prior IFN- α exposure was not allowed.

Oral IFN- α was administered at 150 IU thrice daily as a lozenge to 14 patients (8 PV and 6 ET). Median age was 57 years (range, 32–79), time from PV/ET diagnosis to oral IFN- α therapy was 2 months (range, 0–32), hemoglobin 14.2 gm/dL (range 11.2–15.4), white blood cells $9.75 \times 10^9/L$ (range 5.6–17.3), and platelets $812 \times 10^9/L$ (range, 360–1,389). Five patients previously received hydroxyurea, four anagrelide, and three imatinib mesylate. Six PV patients had received phlebotomies and two had marked splenomegaly. JAK2 V617F mutation was detected in 10 (91%) of 11 assessable patients; 2 (14%) of 14 had abnormal cytogenetics. A total of 16 cycles were administered. The median duration of therapy was 3 months (range, 2.5–6). Thirteen patients discontinued therapy because of lack of a response, and one due to disease progression. Tolerance of oral IFN- α was excellent. All reported toxicities were Grade 1: headache in two, and paresthesias in one patient.

IFN- α is a protein and, therefore, it is not considered to be orally bioavailable owing to rapid denaturation upon contact with gastric secretions [4]. To bypass this hindrance, patients were required to keep the lozenges in the mouth until they completely dissolved to maximize oral absorption. The actual absorption of oral IFN- α in humans, however, is questionable, since no IFN- α receptor has been isolated in the buccal mucosa [4]. Furthermore, studies in different animals and healthy human volunteers have shown that IFN- α administered orally was extremely rarely detected in the blood [5]. Yet, the administration of IFN- α via the oromucosal route has been shown to exert significant systemic antitumoral and immunomodulatory effects through the activation of gene transcription in the lymphoid tissue of the oropharyngeal cavity [5]. The dose of oral IFN- α used in our study was deemed optimal based on prior reports [2,5].

In conclusion, oral IFN- α at 150 IU thrice daily for patients with PV or ET is very safe but renders no appreciable clinical benefit.

ALFONSO QUINTÁS-CARDAMA
SRDAN VERSTOVSEK

Department of Leukemia, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas

Published online 27 June 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/ajh.20946

References

1. Silver RT. Interferon in the treatment of myeloproliferative diseases. *Semin Hematol* 1990;27(3 Suppl 4):6–14.
2. Cummings MJ, Papas A, Kammer GM, et al. Treatment of primary Sjogren's syndrome with low-dose human interferon alfa administered by the oromucosal route: Combined phase III results. *Arthritis Rheum* 2003;15:49:585–593.
3. Zielinska W, Korczak-Rogon A, Paszkiewicz J, et al. Comparison of the long-term effects of treatment with oral and parenteral interferon alpha in chronic viral hepatitis patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1996;44:359–366.
4. National Institutes of Health. Interim Report: Low-Dose Oral Interferon Alpha as a Therapy for Human Immunodeficiency Virus Infection (HIV-1): Completed and Ongoing Clinical Trials. Washington, DC: National Institutes of Health; 1992. Re-edited June 1, 1992.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

American Journal of Hematology

5. Cummins JM, Krakowka GS, Thompson CG. Systemic effects of interferons after oral administration in animals and humans. *Am J Vet Res* 2005;66:164–176.

A novel *AF10-CALM* fusion transcript in γ/δ -T cell type lymphoblastic lymphoma

To the Editor: So far, *CALM-AF10* transcript and reciprocal *AF10-CALM* transcript are shown in patients with various hematological malignancies [1–4]. Recently, it is demonstrated that *CALM-AF10* fusion transcript was a common feature of TCR γ/δ lineage of T-acute lymphoblastic leukemia [2]. We here report a case of γ/δ -T cell type LBL with t(10;11)(p13;q21), having several types of *CALM-AF10* and *AF10-CALM* fusion transcripts; one of them is a novel *AF10-CALM* fusion transcript.

A 21-year-old male was admitted for further examinations of systemic lymphadenopathies without hepatosplenomegaly. Complete blood cell counts were within normal ranges. Soluble interleukin-2 receptor levels were elevated up to 1439 U/ml. Bone marrow was normocellular with 3.6% of atypical lymphoid cells. Radiological examinations showed a huge mass at the right superior mediastinum and swelling of paraaortic lymph nodes in the abdomen. The imprint preparation of the resected inguinal lymph node showed the diffused proliferation of abnormal cells. In flow cytometric analysis, CD3^{dim}, CD5, CD7, CD45, CD56, and TCR γ/δ were expressed on abnormal cells. Southern blotting analysis revealed the gene rearrangement of the γ chain of TCR. The patient was diagnosed as having γ/δ -T cell type LBL. He was treated with intensive chemotherapies including high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation. However, he relapsed in the central nervous system and died of disease progression.

Chromosomal analysis revealed t(10;11)(p13;q21). After informed consent was obtained, we performed RT-PCR analysis of lymphoma cells to examine the fusion transcript of *CALM-AF10* as described previously [3]. PCR products, which were subcloned and sequenced as described previously [3], were ~200 bps (Fig. 1a). Nucleotide sequencing of the amplified fragments demonstrated type VI *CALM-AF10* fusion transcript (Fig. 1b). Three reciprocal PCR products of *AF10-CALM* fusion transcripts were generated by RT-PCR using the sense primer for *AF10* (A-S3) and the antisense primer for *CALM* (C-A1), and nucleotide sequencing of the amplified fragments demonstrated types IV', VI', and VII' *AF10-CALM* fusion transcripts (Fig. 1b). Type VII' transcript was a novel *AF10-CALM* fusion transcript.

The *CALM-AF10* fusion is characterized by poor prognosis and young age of the patients [3,4]. Asnafi et al. demonstrated that *CALM-AF10* fusion transcript was a common feature of TCR γ/δ lineage of T-ALL and that the patients with *CALM-AF10* fusion transcript (+) γ/δ of T-ALL are of poor prognosis [2]. The clinical features of our case are compatible with *CALM-AF10* fusion transcript (+) γ/δ T-ALL [2]. We performed RT-PCR analysis and obtained PCR products; *CALM-AF10* and *AF10-CALM*. The breakpoints were determined between nucleotides 1926 and 1927 of *CALM* and between 978 and 979 of *AF10* in the present study and type VII' transcript is a novel type of *AF10-CALM* fusion transcript. The function of the *AF10-CALM* transcript has not been analyzed yet and it is not obvious, which transcript of four *CALM* and *AF10* fusions induced T-LBL in our case. However, Kumon et al. described that *AF10-CALM* as well as *CALM-AF10* may play a role in leukemogenesis in t(10;11) leukemia [4]. Further examinations are necessary to clarify the function of *AF10-CALM* fusion transcripts.

EISHI ASHIHARA¹
SHIGEO NAKAMURA³
TOHRU INABA⁴
TOMOHIKO TAKI⁴
YASUHIDE HAYASHI⁵
CHIHIRO SHIMAZAKI²

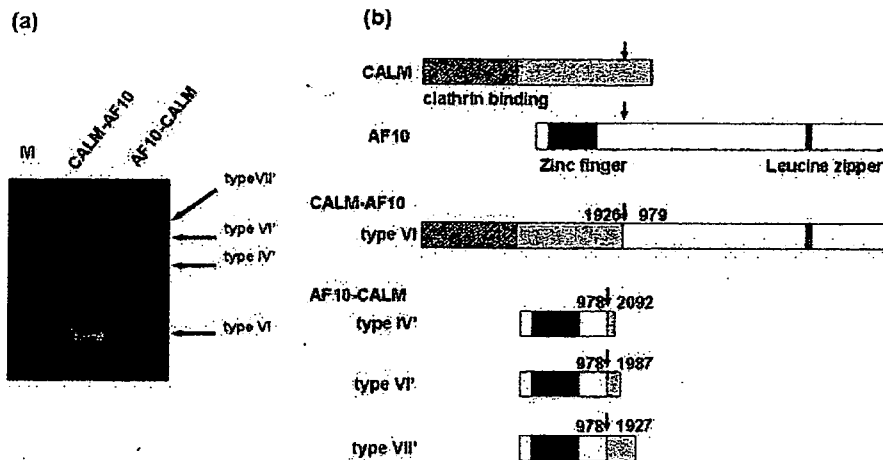


Figure 1.

¹Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

²Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

³Department of Pathology and Molecular Diagnostic, Aichi Cancer Center, Nagoya, Japan

⁴Department of Clinical Molecular Genetics and Laboratory Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

⁵Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan

Published online 27 June 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/ajh.21021

References

- Dreyling MH, Martinez-Climent JA, Zheng M, Mao J, Rowley JD, Bohlander SK. The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4804–4809.
- Asnafi V, Radford-Weiss I, Dastugue N, et al. CALM-AF10 is a common fusion transcript in T-ALL and is specific to the TCRγ/δ lineage. *Blood* 2003;102:1000–1006.
- Narita M, Shimizu K, Hayashi Y, et al. Consistent detection of CALM-AF10 chimeric transcripts in hematological malignancies with t(10;11)(p13;q14) and identification of novel transcripts. *Br J Haematol* 1999;105:928–937.
- Kumon K, Kobayashi H, Maseki N, et al. Mixed-lineage leukemia with t(10;11)(p13;q21): An analysis of AF10-CALM and CALM-AF10 fusion mRNA and clinical features. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:33–39.

Alopecia areata universalis and acute lymphoblastic leukemia

To the Editor: Alopecia areata is considered by most authors to be an autoimmune disease. Corticosteroids have been used with varying success in patchy alopecia though their side effects at high doses and frequent relapses on suspension of treatment have limited their use. The case is presented of a 20-year-old man diagnosed as having acute lymphoblastic leukemia who had a 13-year history of alopecia areata universalis.

He was induced successfully according to the MRC ALL XII protocol with vincristine 1.4 mg/m² IV (maximum 2 mg) 4 weekly doses; prednisolone 60 mg/m² orally for 28 days; daunorubicin 60 mg/m² IV 4 weekly doses; asparaginase 10,000 units 12 intramuscular doses; cytarabine 75 mg/m² IV 12 doses; cyclophosphamide 650 mg/m² IV 3 doses, and 6-mercaptopurine 60 mg/m² orally for 28 days. Within a month of discontinuation of chemotherapy, regrowth of facial, scalp, and body hair was noted.

Induction was followed by consolidation with three cycles of high dose methotrexate 3 g/m² IV. He underwent an autologous peripheral blood stem

cell transplant receiving high dose melphalan 420 mg IV as conditioning. During this period, the hair growth persisted and he was then put on maintenance with vincristine 1.4 mg/m² IV monthly with prednisolone 60 mg/m² orally for 5 days repeated monthly. This, on a background of 6-mercaptopurine 150 mg daily and once weekly methotrexate 10 mg/m². It was intended to continue maintenance for 2 years. However, relapse of the lymphoblastic leukaemia was confirmed after 14 months of maintenance and he died from sepsis 2 months later. During the maintenance period, he did not develop the chemotherapy-induced alopecia that one would normally expect.

There are several reports of immunosuppressive treatment with high dose pulsed corticosteroids [1–3] and while ~60% of cases with patchy extensive alopecia areata show a cosmetically worthwhile response, the response in the universalis form is very disappointing.

This patient had alopecia areata with all the features predictive of steroid unresponsiveness: the universalis type of distribution, prepubertal age of onset, and 13 years' duration with no spontaneous recovery.

The hair growth in this case was attributed to the only two specifically lymphocytotoxic drugs in the induction regimen, i.e., vincristine and prednisolone. The immunosuppressive cytotoxic cyclophosphamide also contributed to this effect. The regrowth was complete and was sustained during the maintenance phase. This is unusual as the regimen ordinarily causes alopecia.

An analogy can be made with the situation of severe steroid-refractory autoimmune thrombocytopenic purpura where the use of vincristine alone or in combination with steroids gives good but nonsustained results. The addition of cyclophosphamide however gives durable responses in the majority of cases.

This is the first report of a poor risk alopecia areata universalis responding convincingly to a combination immunosuppressive regimen. However, because of the long-term use of high dose steroids, this regimen is too toxic for routine use in what is essentially a cosmetic condition. It is possible to arrive at a simplified, less toxic cyclical regimen consisting of pulsed steroids, vincristine and cyclophosphamide for the treatment of alopecia areata universalis.

D.P. BUSUTTIL

Department of Haematology, St. Luke's Hospital, Gwardamangia, MSD 07, Malta

Published online 6 July 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/ajh.20915

References

- Seiter S, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. High dose pulse corticosteroid therapy in the treatment of severe alopecia areata. *Dermatology* 2001;202:230–234.
- Friedli A, Labarthe MP, Engelhardt E, et al. Pulse methylprednisolone therapy for severe alopecia areata: An open prospective study of 45 patients. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:597–602.
- Friedli A, Salomon D, Saurat JH. High-dose pulse corticosteroid therapy: Is it indicated for severe alopecia areata? *Dermatology* 2001;202:191–192.

Mutation and Expression Analyses of the *MET* and *CDKN2A* Genes in Rhabdomyosarcoma with Emphasis on *MET* Overexpression

Yuyan Chen,¹ Junko Takita,² Masashi Mizuguchi,¹ Kiyoshi Tanaka,³ Kohmei Ida,¹ Katsuyoshi Koh,¹ Takashi Igarashi,¹ Ryoji Hanada,⁴ Yukichi Tanaka,⁵ Myoung-Ja Park,⁶ and Yasuhide Hayashi^{6*}

¹Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

²Department of Cell Therapy and Transplantation Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

³Department of Surgery, School of Medicine, Kitasato University, Kanagawa, Japan

⁴Division of Hematology/Oncology, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan

⁵Division of Pathology, Kanagawa Children's Medical Center, Kanagawa, Japan

⁶Division of Hematology/Oncology, Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common soft-tissue sarcoma of childhood. The simultaneous loss of *Ink4a/Arf* function and disruption of Met signaling in *Ink4a/Arf*^{-/-} mice transgenic for hepatocyte growth factor/scatter factor (*HGF/SF*) induces RMS with extremely high penetrance and short latency. To address the roles of *MET* and *CDKN2A* (*p16^{INK4A}/p14^{ARF}*) in human RMS, we performed mutational analyses in 39 samples of RMS by PCR-SSCP. No mutations were detected in exons 14–21 of *MET* whereas a nonsense mutation at codon 80 of *p16^{INK4A}* was identified in an alveolar RMS cell line. We also quantified the relative expression levels and DNA copy numbers of these genes in seven cell lines and 17 fresh tumors by real-time quantitative PCR. Expression of *MET* was detected in all samples; however, more than 10-fold difference was found in the samples with higher or lower expression level, despite a normal DNA copy number. The protein expression level was consistent with that of mRNA, and in cell lines with a higher expression level, *MET* was constitutively activated. Notably, the expression level of *MET* was significantly higher in patients who died ($P = 0.02$), in patients with stage IV ($P = 0.04$), as well as in patients with *PAX3-FKHR* chimeric transcript ($P = 0.04$). On the other hand, reduced or absent expression of *p16^{INK4A}* and/or *p14^{ARF}* showed no significant correlation with the clinicopathological parameters, except for the age at diagnosis. Our data suggest that *MET* plays a role in the progression of RMS. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Rhabdomyosarcoma (RMS) is a heterogeneous group of malignant tumors of mesenchymal origin and is thought to arise from cells committed to the skeletal muscle lineage. RMS is the most common soft-tissue sarcoma in children, with an annual incidence of 4–7 per million of 15 years of age or younger, and is also the third most common extracranial solid tumor of childhood (Dagher and Helman, 1999; Merlino and Helman, 1999). Approximately 65% of cases are diagnosed in children less than 6 years of age with remaining cases noted in the 10–18-year-old age group. RMS falls into the broader category of small blue, round cell tumors of childhood, and is subdivided into two major histological subtypes, embryonal rhabdomyosarcoma (ERMS) and alveolar rhabdomyosarcoma (ARMS). ERMSs are typically comprised of spindle shaped cells, with a stromal rich appearance. In general, embryonal tumors tend to occur in the younger age group and occur more frequently in the head and

neck region and less frequently in the extremities. Approximately two thirds of all RMSs are of embryonal histology. ARMSs are typically comprised of small round densely packed cells, arranged around spaces resembling pulmonary alveoli. Alveolar tumors tend to occur in the older age group and are more frequently seen in extremity lesions. A number of molecular/genetic lesions have been associated with RMS. Embryonal tumors are characterized by loss of heterozygosity (LOH) at the 11p15 locus, a region harboring a

Supported by: A Grant-in-Aid for Cancer Research; Research on Children and Families from Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; Ministry of Education, Culture, Sports and Technology of Japan.

*Correspondence to: Yasuhide Hayashi, MD, Director, Gunma Children's Medical Center, 779 Shimohakoda, Hokkitsu, Shibukawa, Gunma 377-8577, Japan.
E-mail: hayashiy-ky@umin.ac.jp

Received 22 June 2006; Accepted 21 November 2006

DOI 10.1002/gcc.20416

Published online 22 January 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

number of genes implicated in oncogenesis, such as the insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) gene, and associated with alterations of imprinting. In contrast to ERMS, ~70–80% of ARMS carry a characteristic chromosomal translocation juxtaposing the 5' DNA-binding domains of *PAX3* or *PAX7*, members of the Paired Box transcription factor family, to the transactivation domain at the 3' portion of *FOXO1A* (forkhead box O1A, also *FKHR*), a member of the forkhead/HNF-3 transcription factor family, which results in two fusion genes, $t(2;13)(q35;q14)$ (*PAX3-FOXO1A*) in most cases, and $t(1;13)(p36;q14)$ (*PAX7-FOXO1A*) at a less frequency (Dagher and Helman, 1999; Merlino and Helman, 1999; Sorensen et al., 2002). It has been reported that ARMS is associated with a poor prognosis (Crist et al., 1990; Newton et al., 1995). Despite aggressive treatment including surgery, dose-intensive combination chemotherapy, and radiation therapy, the outcome for patients with metastatic tumors remains poor.

RMS has been thought to arise as a consequence of regulatory disruption of skeletal muscle progenitor cell growth and differentiation. The delicate balance between proliferation and differentiation is normally regulated in large part through the action of a multitude of growth factors, whose signals are transmitted by members of the MyoD family of helix-loop-helix proteins, and key regulatory cell cycle factors (Merlino and Helman, 1999). *PAX3* is important for regulation of myogenesis by activating transcription of several target genes such as *MyoD* and *MET* (Epstein et al., 1996; Buckingham et al., 2003). The *MET* proto-oncogene encodes a receptor tyrosine kinase that mediates the multifunctional and potentially oncogenic activities of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), including the promotion of cellular growth, motility and survival, extracellular matrix degradation, and angiogenesis (Jeffers et al., 1996; Matsumoto and Nakamura, 1996; Trusolino and Comoglio, 2002). *MET* is essential in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud and *Met* knockout mice have no limb muscles (Bladt et al., 1995). *MET* activity is deregulated by genetic mutations, gene amplification, protein overexpression and/or the creation of HGF/SF-*MET* autocrine loops, which have been implicated in the development and progression of a wide variety of human cancers, such as papillary renal-cell carcinoma (Schmidt et al., 1997), breast carcinoma (Tuck et al., 1996), hepatocellular carcinoma (Takeo et al., 2001), as well as osteosarcoma (Ferracini et al., 1995). It has also been reported in a pre-

vious study that *MET* is aberrantly expressed in RMS (Ferracini et al., 1996). On the other hand, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) has been identified as a suppressor of numerous human hematological malignancies and solid tumors (Sherr, 2001). The *CDKN2A* gene is remarkable in that it has alternative reading frames resulting in two tumor suppressor genes, *p16^{INK4A}* and *p14^{ARF}*, encoding two unrelated proteins (Robertson and Jones, 1999). *p16^{INK4A}* and *p14^{ARF}*, acting through the downstream retinoblastoma protein (RB1) and TP53, respectively, help regulate cellular transit through the cell cycle as well as senescence and apoptosis (Zhang et al., 1998). It has been shown that forced expression of cyclin D1 inhibited the ability of *MyoD* to transactivate muscle-specific genes and correlated with phosphorylation of MyoD, whereas transfection of myoblasts with cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitors *p21* and *p16^{INK4A}* augmented muscle-specific gene expression in cells (Skapek et al., 1995). Recently, it was found that RMS was induced with extremely high penetrance by the simultaneous loss of *Ink4a/Arf* function and disruption of *Met* signaling in *Ink4a/Arf^{-/-}* mice transgenic for *HGF/SF* (Sharp et al., 2002). It has also been reported that *Met* is necessary for *Pax3-Foxo1a*-mediated effect in mice, and *Met* had a role in both alveolar and embryonal RMS maintenance (Taulli et al., 2006). Furthermore, although it was shown that *Pax3-Foxo1a* was insufficient to cause tumors in knock-in mice (Lagutina et al., 2002; Keller et al., 2004b), *Pax3-Foxo1a* homozygosity with accompanying *Ink4a/Arf* or *Tp53* pathway disruption substantially increases the frequency of alveolar RMS tumor formation in mice (Keller et al., 2004a).

To clarify whether *MET* and *CDKN2A*, situated at the nexus of pathways regulating myogenic growth and differentiation, represent critical targets in RMS, we performed mutational and expression analyses for *MET* and *CDKN2A*, and evaluated the relationship between the expression levels of these genes and the clinicopathological parameters.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines, Primary Tumors, and Normal Controls

Seven RMS cell lines (SJRH-1, SJRH-4, SJRH-18, SJRH-30, RD, RMS, SCMC-RM2) were examined in this study (Uno et al., 2002). Cell lines SJRH-4, SJRH-18, SJRH-30, and SCMC-RM2 are alveolar type, whereas the others are embryonal type. All of the cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO, Invitrogen, Tokyo, Japan)

TABLE 1. Primers for the *MET*, *p16^{INK4A}*, and *p14^{ARF}* Genes for PCR-SSCP

| Exon | Primer sequence (5' → 3') | |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | Forward | Reverse |
| <i>MET</i> ^a | | |
| 14 | CCATGATAGCCGTCTTTAAC | ATACTTACTTGGCAGAGGT |
| 15 | GTCCCCATTAATGAGGTTT | ATCTGCAAAGGCCAAAGATA |
| 16 | ATGTTACGCAGTGCTAACC | GTAGCTGATTTTTCCACAAG |
| 17 | GAAGTTAATGTCTCCACCAC | TGGCTTACAGCTAGTTTGCC |
| 18 | TTCTAACTCTTTTGACTGC | CAGATTCCTCCTTGTCACTT |
| 19 | ATTCTATTTTCAGCCACGGG | AGGAGAAACTCAGAGATAACC |
| 20 | ACCTCATCTGTCCTGTTC | CCAAAAAGAAAGACATGCTG |
| 21 | GGGTCTTTACAGCATGTCT | GTGTGGACTGTTGCTTTGAC |
| <i>p16</i> ^b | | |
| 1 | GCTGCGGAGAGGGGGAGAGCAGGCA | CTGCAAACCTTCGTCTCCA |
| 2-1 | CTTCCTTTCCGTCATGCCG | CTCAGCCAGGTCCACGGGCA |
| 2-2 | TTCCTGGACACGCTGGTGGTG | GGAAGCTCTCAGGGTACAAA |
| 3 | TGCCACACATCTTTGACCTC | AAAACCTACGAAAGCGGGGTG |
| <i>p14</i> ^b | | |
| 1-1 | CGCTCAGGGAAGGCGGGTGC | AACCACGAAAACCCCTCACTC |
| 1-2 | ATGGTGCGCAGGTTCTTGGT | ACCAAACAAAACAAGTGCCG |

^aGenBank accession number for *MET* is NT_007933.

^bGenBank accession number for *CDKN2A* is NT_008413.

supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Thirty-two primary RMS tumors, obtained at the time of initial surgery or biopsy in several hospitals in Japan (1993–2005), were examined. Histopathological diagnosis was made by pathologists at each hospital. Of the 32 cases (age range, 0–20 years; median age, 5.8 years), 5 were classified as stage I, 5 as II, 10 as III, and 12 as IV, according to the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-IV (IRS-IV) staging classification. Twenty-one cases were ERMS, and 11 were ARMS. Patients with stage I or II were treated with surgery alone or surgery plus chemotherapy, mainly vincristine. Patients with stage III or IV were treated with surgery, radiotherapy, intensive multidrug chemotherapy, and if necessary, autologous bone marrow transplantation.

All of the cell lines and fresh tumors were previously screened for mutations of *TP53*.

Normal human skeletal muscle total RNA was obtained from two healthy patients (aged 3 and 5). Ten peripheral blood (PB) samples from healthy volunteers were also used as normal controls.

Informed consent was obtained from the patients and/or their parents as well as healthy volunteers.

DNA and RNA Preparation

High-molecular-weight DNA was extracted from all samples by proteinase K digestion and phenol/chloroform extraction. Total RNA was extracted

from all of the cell lines and 17 fresh tumors using the acid guanidine thiocyanate-phenol chloroform method. Randomly primed cDNA was synthesized from total RNA using a cDNA synthesis kit as previously described (Shibuya et al., 2001).

Mutational Analyses for *MET* and *CDKN2A* in RMS

The mutations of *MET* identified to date are clustered in the transmembrane domain and tyrosine kinase domain (Trusolino and Comoglio, 2002). Therefore, we examined exons 14–21 of *MET*, which encompassed the two domains and the juxtamembrane region, for all of the cell lines and fresh tumors by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analyses as described elsewhere (Chen et al., 2005). For *CDKN2A*, we screened its whole coding region by PCR-SSCP. The primers for PCR-SSCP are listed in Table 1. For samples that showed altered mobility, we subjected the PCR products to direct sequencing analyses (Chen et al., 2005, 2006). Furthermore, we performed another round of direct sequence analyses in all cell lines for *MET* and *CDKN2A* to verify the results of PCR-SSCP.

Real-Time Quantitative PCR

For seven RMS cell lines and 17 fresh tumors, real-time quantitative PCR (RQ-PCR) analyses were carried out to quantify the expression levels of *MET*, *p16^{INK4A}* and *p14^{ARF}*, using a QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Tokyo,

Japan) with an iCycler iQTM real-time PCR detection system (Bio-Rad Japan, Tokyo, Japan). The reaction mixture was prepared as follows: 1 μ l of cDNA, 1 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0.3 μ l of each primer and 0.5 U of uracil-*N*-glycosylase (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) in a final volume of 50 μ l. The amplification conditions for quantitation were an initial 2 min of incubation at 50°C, 15 min at 95°C, followed by 40 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at the respective temperatures for 30 sec, extension at 72°C for 30 sec) (Chen et al., 2003). The primer sets used for real-time quantitative reverse transcriptase-PCR were as follows: sense 5'-GGTTGCTGATTTTGGTCTTG-3' and antisense 5'-GCAGTATTCGGGTTGTAGGA-3' for *MET* (GenBank accession number NM_000245); sense 5'-GCCCAACGCACCGAATAG-3' for *p16^{INK4A}* (GenBank accession number NM_058197), 5'-TCTGGTTCTTTCAATCGGGGA-3' for *p14^{ARF}* (GenBank accession number NM_058195) and the same antisense 5'-ACCACCAGCGTGTCAGGAA-3' for *p16^{INK4A}* or *p14^{ARF}*. The β -*actin* gene served as an endogenous control. The primers for β -*actin* amplification were sense 5'-CTTCTACAATGAGCTGCGTG-3' and antisense 5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3'. For the purpose of normalization, the relative expression level was calculated by dividing the expression level of the respective gene by that of the β -*actin* gene for each sample.

For the seven RMS cell lines and 17 fresh tumors, the relative DNA copy number of *MET* or *CDKN2A* in each sample was quantified using RQ-PCR analyses similar to above. Each DNA sample had an $A_{260/280}$ ratio in the range 1.60–1.80 and was diluted to 100 ng/ μ l before use. The primer set for *MET* was that for mutational screening of exon 16 and the primer set for *CDKN2A* was that for mutational screening of the common exon 2, respectively (Table 1). The *B2M* (β -2-microglobulin) gene, which was a housekeeping gene on chromosome 15q21-q22.2 (Lillington et al., 2002), was used as an endogenous reference and the copy number of *MET* as well as *CDKN2A* in each sample was normalized by the corresponding *B2M* value. The primers for *B2M* amplification were sense 5'-AAGTGGAGCATTTCAGACTTG-3' and antisense 5'-TCCCTGACAATCCCAATATG-3' (GenBank accession number NT_010194).

All of the reactions were run in triplicate. The primers used for RT-PCR were designed to prevent DNA amplification, and the melting curve was incorporated to detect whether primer dimers

or other undesired products were amplified. In addition, all of the amplified products were subjected to gel electrophoresis, and if necessary, direct sequence analysis was performed to confirm the expected PCR products.

Detection of PAX3-FKHR and PAX7-FKHR Chimeric Transcripts

For the seven RMS cell lines and 17 fresh tumors, we also examined the expression of *PAX3-FKHR* and *PAX7-FKHR* chimeric transcripts as described previously (Galili et al., 1993; Davis et al., 1994).

Western Blotting and Immunoprecipitation Analyses

Rabbit polyclonal antibodies against human *MET* (C-12) and mouse monoclonal antibodies against phosphorylated tyrosine (p-Tyr) (PY99) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The secondary antibodies (donkey anti-rabbit IgG and sheep anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase) and enhanced chemiluminescence reagent were purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). Total cellular proteins were extracted by lysing 1×10^6 cells with a lysis buffer [50 mM HEPES-NaOH (pH7.0), 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 250 mM NaCl, 5 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 50 μ g/ml aprotinin] from 7 RMS cell lines (Takita et al., 1997). The proteins were separated by SDS-PAGE by loading the lysates containing 50 μ g of total protein on a 4–20% gradient gel, and then transferring onto a polyvinylidene difluoride transfer membrane (Millipore, Billerica, MA) (Takita et al., 1997). The membranes were incubated with the anti-*MET* antibody, followed by the HRP-conjugated secondary antibody. The resultant immunoprecipitates were detected with the ECL Western Blotting Analysis System. Equal protein loading was confirmed by staining the membrane with Coomassie brilliant blue. The Western blotting analysis for *MET* was performed three times, then the blots were scanned, and the level of *MET* in each sample was estimated using the NIH Image 1.61 software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, MD). The protein expression level of each cell line was calculated as mean \pm SD.

For immunoprecipitation (IP), lysates containing 500 μ g of total protein were pretreated with 1 μ g of normal rabbit IgG and 20 μ l of protein G-plus

TABLE 2. Expression of *MET*, *p16^{INK4A}*/*p14^{ARF}*, and *PAX3-FOXO1A* Transcript, and Mutations of *TP53* in RMS Cell Lines

| Cell lines | Histology | <i>MET</i> | | <i>p16</i> | <i>p14</i> | <i>PAX3-FOXO1A</i> | Mutation of <i>TP53</i> |
|------------|-----------|-------------------|----------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------------------|
| | | mRNA ^a | Protein ^a | mRNA | mRNA | | |
| SJRH-1 | E | 13.06 ± 0.50 | 11.78 ± 8.08 | 0.03 ± 0.00 | 0.74 ± 0.12 | – | Tyr220Cys |
| SJRH-4 | A | 122.99 ± 30.86 | 71.35 ± 37.72 | 0.73 ± 0.02 | 0.96 ± 0.22 | + | 13bp del ^b |
| SJRH-18 | A | 59.70 ± 13.07 | 60.12 ± 21.94 | 0.13 ± 0.08 | 0.38 ± 0.11 | + | Gly187Cys |
| SJRH-30 | A | 363.04 ± 54.41 | 166.35 ± 61.83 | 0.92 ± 0.01 | 1.19 ± 0.02 | + | Tyr205Cys |
| RD | E | 28.13 ± 7.14 | 22.45 ± 7.05 | 0.16 ± 0.03 | 0.90 ± 0.04 | – | Arg248Trp |
| RMS | E | 8.17 ± 0.74 | 14.66 ± 6.61 | 0.49 ± 0.07 | 0.97 ± 0.03 | – | Arg282Trp ^c |
| SCMC-RM2 | A | 155.08 ± 29.28 | 109.50 ± 62.99 | 0.55 ± 0.03 | 1.05 ± 0.07 | + | – |

E, embryonal type; A, alveolar type.

^aThe values for mRNA and protein indicate mean ± SD.

^bNucleotide 701–713 (GenBank accession number for *TP53* is NM_000546).

^cSingle nucleotide polymorphism (SNP). GenBank accession number for Arg282Trp is rs28934574.

agarose beads (Santa Cruz, CA) at 4°C for 30 min. After removal of the beads by centrifugation, lysates were incubated with the anti-MET antibody (2 µg) and 20 µl of protein G-plus agarose beads overnight at 4°C. The immunoprecipitates were washed three times with PBS/0.1%NP-40 and resuspended in lysis buffer, followed by Western blot analyses as described above with anti-p-Tyr (PY99). Then, the antibodies were stripped from the membrane in a stripping buffer containing 62.5 mmol/l Tris, 2% SDS, and 100 mmol/l β-mercaptoethanol. The membrane was reprobed with C-12 and the relative secondary antibodies to confirm the expression of MET.

Statistical Analyses

The Mann-Whitney *U* test was used to compare the expression level of each gene between subgroups of RMS. Fisher's exact test was used to evaluate the statistical significance of differences in proportions among groups. Kaplan–Meier survival plots were constructed, and log-rank tests were used to estimate survival. Exact 95% CI of proportions were calculated on the basis of binomial distribution. The Spearman rank correlation was calculated to evaluate the correlation between the mRNA expression and protein expression of MET. Two-sided *P* < 0.05 was required for significance. All analyses were carried out with StatView-J 4.5 software (Abacus Concepts, CA).

RESULTS

Mutations of *MET* and *CDKN2A* in RMS

For seven cell lines and 32 fresh tumors of RMS, no mutations (0.0%; 95% CI, 0.0–9.0%) were detected in exons 14–21 of *MET* by PCR-SSCP. For *CDKN2A*, one nonsense mutation (CGA > TGA) (2.6%; 95% CI, 0.5–13.2%), resulting in a

truncated protein at codon 80 of *p16^{INK4A}*, was observed in an ARMS cell line, SJRH-18. The same mutation was reported previously in melanoma (Orlow et al., 2001). This C > T transition also results in a missense mutation (Pro135Leu) in *p14^{ARF}*. A polymorphism (Ala148Thr) in *p16^{INK4A}* was detected in another ARMS cell line, SJRH-30. No mutations of *p16^{INK4A}* or *p14^{ARF}* were identified in the 32 fresh tumors.

Expression of *MET* and *p16^{INK4A}*/*p14^{ARF}* mRNA in RMS

Using RQ-PCR, the expression of *MET* was detected in all of the RMS samples and normal skeletal muscles. The *MET*/β-actin value in RMS ranged from 6.16 to 424.42, with a mean value of 102.60 ± 124.86, whereas the *MET*/β-actin value in normal muscles was 33.20 ± 3.77. Overexpression of *MET* (> mean value), was detected in 7 of 24 RMS samples, which included 3 alveolar cell lines (SJRH-4, SJRH-30, SCMC-RM2) (3/7), and 2 alveolar and 2 embryonal type tumors (4/17) (Table 2 and Fig. 1A).

The *p16^{INK4A}*/β-actin value in RMS ranged from 0 to 3.59, with a mean value of 0.74 ± 0.96. Reduced or absent expression of *p16^{INK4A}* (*p16^{INK4A}*/β-actin less than half the mean value) was observed in 11 of 24 samples, which included 3 cell lines (SJRH-1, SJRH-18, RD) and 8 fresh tumors (Table 2).

The *p14^{ARF}*/β-actin value in RMS ranged from 0 to 3.53, with a mean value of 0.85 ± 0.94. Reduced or absent expression of *p14^{ARF}* (*p14^{ARF}*/β-actin less than half the mean value) was shown in 10 of 24 samples, which included 1 cell line (SJRH-18) and 9 fresh tumors (Table 2).

Two fresh tumors (2/24) with overexpression of *MET* had also concomitant reduced or absent expression of *p16^{INK4A}* and/or *p14^{ARF}*; 1 was an ERMS and the other was an ARMS.

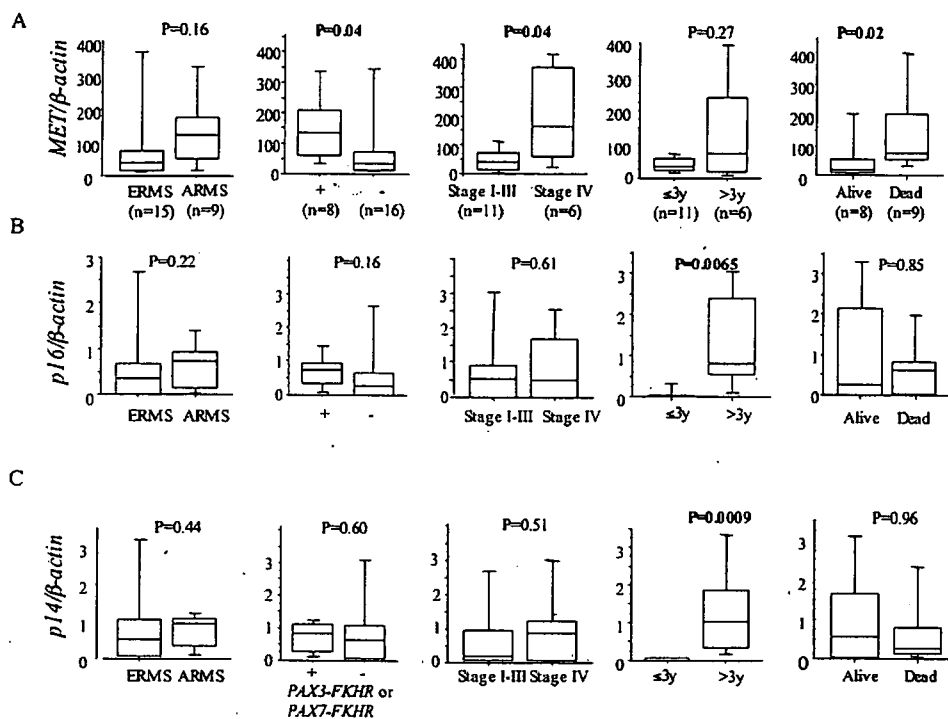


Figure 2. The relationship between clinicopathological parameters and mRNA expression of the genes *MET* (A), *p16^{INK4A}* (B), and *p14^{ARF}* (C). The expression levels of each gene were compared among groups classified by histology (including cell lines), *PAX3-FOXO1A* or *PAX7-FOXO1A* transcript expression (including cell lines), stage, age at diagnosis, as well as outcome using Mann-Whitney U test. It was shown in bold when $P < 0.05$.

number detected in normal skeletal muscle (1.14) or in normal PB (1.22).

The relative DNA copy number of *CDKN2A* (calculated as *CDKN2A/B2M*) was also evaluated in the 24 samples. The mean value of *CDKN2A/B2M* was 0.73 ± 0.43 with a range from 0.24 to 1.44. Three cell lines (SJRH-4, RD, RMS) (3/7) and two fresh tumors (2/17) showed less than half the mean value of the relative DNA copy number.

Expression of *PAX3-FOXO1A* and *PAX7-FOXO1A* Chimeric Transcripts in RMS

The *PAX3-FOXO1A* chimeric transcript was detected in 4 of 4 alveolar type cell lines (SJRH-4, SJRH-18, SJRH-30 and SCMC-RM2) (Table 2). There were five ARMSs among the 17 fresh tumors; 3 having *PAX3-FOXO1A* and 1 having *PAX7-FOXO1A* (4/5). Of the 4 alveolar type cell lines with expression of *PAX3-FOXO1A*, 3 showed overexpression of *MET* and of the 3 ARMSs having *PAX3-FOXO1A*, 2 showed overexpression of *MET*. The sample having *PAX7-FOXO1A* showed an expression level of *MET*/β-actin at 21.37 ± 1.04 .

Mutations of *TP53* in RMS

The mutations of *TP53* were detected in 5/7 cell lines and 3/17 fresh tumors. The mutations in five

cell lines included four missense mutations (Gly187Cys, Tyr205Cys, Tyr220Cys, and Arg248Trp) and a 13 bp deletion (nucleotides 701–713) in exon 5, which resulted in a truncated transcript (Table 2). In the five cell lines having mutations of *TP53*, two showed overexpression of *MET*. The three fresh tumors having mutations of *TP53* included an insertion of 6 bp (ACTACA) between nucleotides 960 and 961 in an ERMS (GenBank accession number: NM_000546), a missense mutation (Asp49His) in an ERMS, and a nonsense mutation (Arg → stop codon) at codon 342 in the ARMS with *PAX7-FOXO1A*. Overexpression of *MET* was only detected in one of the three samples having mutations of *TP53*.

Relationship Between the Expression Level of *MET* or *p16^{INK4A}*/*p14^{ARF}* and Clinicopathological Parameters in RMS

To address the relationship between the clinicopathological parameters and the expression levels of *MET* and *p16^{INK4A}*/*p14^{ARF}*, we compared the expression level of each gene between groups classified by patients' age, stage, histology, *PAX3-FOXO1A* or *PAX7-FOXO1A* transcript expression, as well as outcome (Fig. 2). By nonparametric