

200823024A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清河 信敬

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略 研究事業

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清河 信敬

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

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

清河信敬

----- 1

II. 分担研究報告

1. 難治性小児がんの網羅的糖鎖・ゲノム解析とその臨床応用

----- 14

清河信敬

2. 小児がんの中央診断と保存検体を活用したトランスレーショナルリサーチ

----- 19

藤本純一郎

3. 小児がんの遺伝子変異解析

----- 23

林泰秀

4. 小児がんの網羅的ゲノム解析による治療標的分子の探索

----- 29

小川誠司

5. ゲノム・遺伝子発現情報からみた小児がんの臨床的特性の解明

----- 33

大平美紀

6. 難治性小児がんの悪性度診断

----- 36

中川温子

7. 難治性小児がんの薬物代謝関連遺伝子多型解析とその臨床応用

----- 44

森鉄也

8. 難治性小児がんの臨床的特性の解析と新規診断・治療法開発

----- 46

大喜多肇

9. 小児造血器腫瘍の遺伝子診断と分子モニタリングに関する研究

-----50

横澤敏也

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----52

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 56

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

研究代表者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部長

研究要旨： 本研究は、難治性小児がんの治療予後向上を目指して、その臨床的特性に関する分子情報の体系的解析を行い、得られた知見を診断治療法開発に応用することを目的としており、昨年度に引き続き、小児がん臨床検体を用いた包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）を継続した。（1）高密度 SNP アレイを用いて、神経芽腫 215 例、T 細胞性リンパ芽球性白血病 (T-ALL) 63 例を始めとする小児難治性がんのゲノム構造解析を行った。神経芽腫に特徴的なゲノム変異を明らかにするとともに、一部の症例で 2p23 上の ALK に高度増幅やミスセンス変異を検出し、この変異 ALK が増腫瘍効果を有することを明らかにして、ALK が神経芽腫の標的分子であることを示した。（2）Wilms 腫瘍、肝芽腫、神経芽腫などの網羅的発現遺伝子解析を実施し、特に肝芽腫については、両者のプロファイルが共に肝芽腫の予後と強く相関すること、またその組み合わせで効率の良い腫瘍の層別化ができることを示した。（3）小児急性骨髄性白血病 (AML) の WT1 遺伝子変異、T-ALL の NOTCH1 および FBXW7 遺伝子変異を解析し、T-ALL ではいずれかの遺伝子の変異が見られた症例は予後良好であることを見いだした。また、AML 233 例のキメラ遺伝子スクリーニングを行うとともに、同遺伝子を利用した治療モニタリングを行い、AML1-ETO の発現レベルの推移に多様性があることを明らかにした。（4）小児 ALL 症例の体系的表面抗原解析を行い、T-ALL の表面抗原発現様式の多様性を示し、リスク分類や初期治療反応性との関係について明らかにした。（5）液体クロマトグラフィー質量分析による小児白血病細胞の網羅的発現糖鎖解析を行い ALL の各病型における糖鎖発現様式の特徴を明らかにした。（6）小児がん治療研究推進を支持するバイオリソース構築を目的として、中央診断・検体保存を行い、120 例の小児 ALL 患児に対して、新たな治療層別化因子として着目される治療 8 日目の末梢血残存白血病細胞の絶対数をフローサイトメトリーにより測定した。小児 ALL に対する薬物治療の効果、毒性の個体差と薬物代謝関連分子の遺伝子多型の関連を検証する研究の実施に向けた準備を行った。（7）Ewing 肉腫における EWS/ETS の標的遺伝子として DKK1 および 2 を同定、DKK1 が抗腫瘍性に作用することを明らかにした。（8）ALCL 細胞株に対して p16INK4a 機能性ペプチドを輸送体ペプチドと混合して投与することにより増殖抑制作用を認めることを示した。最終年度は、本年度見いだした分子標的についてさらに検討を進め、出口の明らかな研究成果を得ることを目指す。

研究分担者

藤本純一郎

・国立成育医療センター研究所副所長

林泰秀

・群馬県立小児医療センター院長

小川誠司

・東京大学医学部附属病院 特任准教授

大平美紀

・千葉県がんセンター 生化学研究部

ゲノムセンター室長

中川温子

・国立成育医療センター臨床検査部

病理検査室医長

森鉄也

・国立成育医療センター特殊診療部

小児腫瘍科医長

大喜多肇

・国立成育医療センター研究所

発生・分化研究部機能分化研究室長

横澤敏也

・独立行政法人国立病院機構名古屋医療

センター 臨床研究センター

血液・腫瘍研究部遺伝子診断研究室長

A. 研究目的

小児がんは小児期の死因の上位を占め、成育医療領域では非常に重要な疾患である。近年の集学的治療法の進歩によりその一部では適切な治療を行えば完全治癒が期待され得る状況になっており、発症時に正確に診断し、完全治癒を目指した適切な治療法を選択するとともに、各症例の治療反応性に応じて QOL を考慮した治療層別化を体系的に行っていくことが今後の課題となっている。この課題を達成するためには、各小児がん疾患あるいは各症例の生物学的特性を分子レベルで明らかにしていくことが必要である。これに関して、小児がんに対する小児がんに対して遺伝子異常の発見や網羅的発現遺伝子解析が進み、その成果の臨床への還元が試みられているが、十分な治療成績改善には結びついておらず、一部の小児がんは依然予後不良である。このような現状の克服には、上記解析に加え、全ゲノム的な遺伝子構造やエピゲノムの異

常、蛋白糖鎖発現等の生体分子情報を網羅的に解析し、小児がんの臨床的特性にかかわる異常を包括的に解明していくことが必須である。また、人種差を考慮すると我国独自の研究の推進が必要である。

そこで本研究では、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫、Wilms 腫瘍、神経芽腫、難治例や再発例を含む小児白血病等の臨床検体に対し、包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）を行って、難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報を網羅的に明らかにし、その知見に基づいた新規診断・治療法開発を行う。特に、急速な進展や再発を繰り返す亜型の分子特性を明らかにし、QOL 改善を目標とした予後予知法確立や新規治療モデルの提示を目指す。小児がんは、成人のがんと比較した場合、発生頻度としては非常に低く、症例数も少ない希少疾患であり、上記目的を達成するためには、全国的規模の臨床共同研究の枠組みの中で中央診断および検体保存を行い、保存された臨床検体を有効に基礎研究に活用することが不可欠である。また、このようなシステムを構築することにより、基礎研究で得られた知見を診断・治療面で臨床へフィードバックすることが容易になり、トランスレーショナルリサーチの推進にも寄与するものと期待される。しかし、本邦においては、小児がんの登録システムさえも十分に確立されていないのが現状である。そこで本研究では、種々の小児固形腫瘍および白血病・リンパ腫に対する中央診断と検体保存のシステムを構築するとともに、診断や治療層別化に応用可能な研究的検査法を開発して臨床に還元する研究も合わせて実施する。本研究の実施によって、小児がんの臨床特性に関連する分子情報が明らかになり、その成果が新たな分子標的の同定に結びついて、診断法の標準化や新規治療戦略を提案することが可能となり、難治性小児がんの治療成績向上に寄与でき、小児がんの予後や QOL が改善され、健全な次世代を育む環境整備が可能となる。以上により、厚生労働行政にも貢献可能である。

B. 研究方法

1. ゲノム異常の網羅的探索：

腫瘍試料から抽出したゲノム DNA について、GenChip 50K/250K アレイと CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いて、平均解像度 24kb~6kb でゲノム全域に渡る網羅的ゲノムコピー数解析を行った。結果につき、FISH、real-time PCR 解析、Heteroduplex mobility assay、直接塩基配列決定による変異解析により腫瘍化との関連性の検証を行い、培養細胞を用いた発現導入やノックダウン免疫不全マウスへの移植によって標的遺伝子の性状を解析した。

2. 小児がん特化 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析：

小児がん由来のオリゴキャッピング cDNA ライブラリーより抽出された約 11,000 種類の独立遺伝子を搭載した小児がん特化型 DNA チップを作製し、凍結腫瘍組織から調製した total RNA を用いて発現遺伝子を解析した。得られたデータから、患者予後と統計的に強く相関する遺伝子をコンピュータ解析により抽出した。

3. AML の遺伝子解析：

初診時および治療開始後の患児検体から RNA 抽出を行い、定量的 RT-PCR 法によって急性骨髄性白血病での代表的なキメラ遺伝子 8 種を測定した。また、reverse transcriptase (RT)-PCR/直接塩基配列決定による *FLT3*、*KIT*、等の遺伝子の変異解析と real-time PCR 法による *WT1* 遺伝子の発現解析の結果と予後との関係を検討した。

4. 小児 ALL のマーカー解析：

初診時検体に対して 4 カラー全血法の蛍光染色を行いフローサイトメトリーにより解析した。

5. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

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

6. 小児がんの検体保存中央診断：

小児がんの治療を効率的に実施するため、中央病理診断の迅速化を目的とし、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。保存検体の配分方法について検討を行った。

小児 ALL に対する薬物治療効果、毒性の個体差と薬物代謝関連分子の遺伝子多型の関連の前方視的研究の準備を行った。

8. 末梢血残存白血病細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

ALL 患児 120 例の治療開始後 8 日目末梢血液について蛍光標識ビーズ (Flow-Count) を用いたフローサイトメトリー解析により残存白血病細胞を算定した。

9. Ewing 肉腫発症モデル系の解析：

未熟な間葉系細胞を用いて tetracycline 誘導性に Ewing 肉腫特異的キメラ遺伝子を発現する細胞系を用いて、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。

(倫理面への配慮)

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

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

C. 研究結果

1. ゲノム異常の網羅的探索：

神経芽腫は新鮮腫瘍 215 例、細胞株 24 株につき網羅的ゲノム解析を行った結果、神経芽腫に最も特徴的なゲノム変異は 17q の gain、MYCN 領域の増幅および 1p の欠失であった。これらの異常をもたない腫瘍では 1q、2p および 7 番染色体の gain が比較的選択的に生じていたことから、進行神経芽腫はゲノム上複数の subtype が存在する可能性が示唆された。さらに新鮮腫瘍 5 例、細胞株 1 株で 2p23 上の ALK が高度増幅を来していることを見出し、新鮮腫瘍 6.1%、細胞株 33% に ALK のミセンス変異を検出した。変異 ALK を

NIH3T3 細胞に導入したところ、野生型に比べて強いコロニー形成が認められた。また変異 ALK 陽性細胞を接種したヌードマウスでは腫瘍形成が認められた。

T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) の臨床検体 63 例についても網羅的ゲノム構造解析を進め、新規標的因子の候補となる遺伝子 91 個を特定した。

2. 小児がん特化 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析：

肝芽腫について、新規治療法の開発および腫瘍層別化システムの構築に応用するため、小児腫瘍由来遺伝子を搭載した小児がん特化 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析とゲノムコピー数異常の解析を行った結果、両者のプロファイルが共に予後と強く相関すること、またその組み合わせで効率の良い腫瘍の層別化ができることを示した。

3. 白血病の遺伝子解析：

小児の急性骨髄性白血病 (AML) の遺伝子解析結果と予後との関係の検討を目的に、WT1 遺伝子の変異の検討を行い、138 例中 8 例に変異を認めた。T-ALL 細胞株 14 株、T-ALL 52 例、T-非ホジキンリンパ腫 (T-NHL) 17 例で NOTCH1 変異の解析を行い、T-ALL 細胞株 14 株中 10 株 (71.4%)、T-ALL 52 例中 16 例 (30.8%)、T-NHL 17 例中 6 例 (35.3%) に変異を認め、同遺伝子の変異をもつ群は有意に予後良好であることを明らかにした。FBXW7 遺伝子については T-ALL 55 例中 8 例 (14.6%)、T-NHL 14 例中 3 例 (21.4%) に変異がみられ、予後良好な傾向がみられた。

また、AML 233 例のキメラ遺伝子スクリーニングを行った結果、233 例中 103 例 (43.3%) 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。最も頻度の高い AML1-ETO を利用した治療モニタリングを行い、その発現レベルの推移に多様性があることを明らかにした。

4. 小児 ALL のマーカー解析：

東京小児がん研究グループ ALL 治療プロトコール登録症例を中心に小児-ALL 194 例の表面マーカー解析を行い、T-ALL の基準を満たす症例 20 例と、過去 4 年間の T-ALL および T-NHL 解析例を合わせた

106 例について、詳細な解析したところ、T-I (pro-T) = 9 例、T-II (pre-T) 37 例、T-III (Cortical-T) = 27 例、T-IV (Mature-T) = 23 例で、T-IV には 9 例の γ/δ 型が含まれていた。また、この他に CD56 陽性が 10 例存在し、上記と同様に分類すると、T-I = 2 例、T-II 6 例、T-III = 1 例、T-IV = 1 例であった。CD99、CD10、CD34、骨髄系抗原の発現には、亜群における特徴が認められ、B 細胞特異抗原とされる CD79a が T-ALL の 3 割以上で弱-中等度陽性になることが示され、このうち一部については、メッセージレベルでもその発現を確認した。

5. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

LC-MS を用いて、小児白血病細胞臨床検体から抽出した糖脂質糖鎖を網羅的に解析し、成熟 B-ALL に特徴的な Gb3Cer の発現を確認し、B-前駆細胞性 (B-precursor) ALL では、Lc3Cer の発現が特徴的であること、T-ALL、B-precursor ALL では、LacCer の含有率が高い傾向を認めた。

6. 小児がんの検体保存と中央：

小児がんのトランスレーショナルリサーチ推進を支えるためのバイオリソース形成を目的に、悪性リンパ腫 271 例、神経芽腫 29 例、横紋筋肉腫 38 例の病理中央診断、Ewing 肉腫 6 例、横紋筋肉腫 23 例、小児腎腫瘍 27 例の検体保存、ALL 新患 194 例、リンパ腫新患 63 例の中央マーカー診断と検体保存を行い、AML 新患 123 例、乳児白血病 10 例の検体保存を行った。また、匿名化保存検体を研究者に配分する手順について整備した。

ALL 患児の薬物代謝関連分子遺伝子多型と治療経過の関連性を検証する研究計画について、施設倫理審査委員会の承認を得て、現在治療研究グループに研究審査、及び多施設共同研究による検体提供の手配を依頼したが、現時点ではまだその回答が得られていない。

蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリーによる自動算定法により、ALL 患児 120 例の Day-8 末梢血中残存白血病細胞数算定を行った。

7. Ewing 肉腫発症モデル系の解析：

EWS/ETS キメラ遺伝子の新規標的遺伝子として DKK2 を同定した。Ewing 肉腫で

は DKK 2 が高発現で、DKK1 が低発現であり、DKK1 過剰発現が Ewing 肉腫の造腫瘍能を低下させた。

8. 機能性ペプチドによる細胞増殖制御：

ALCL 細胞 2 株 (DEL, Su-DHL1) に輸送体ペプチドと p16INK4a 機能性ペプチドの複合体を培養液中へ添加したところ、72 時間後の増殖抑制率は $8 \mu\text{M}$ でそれぞれ 76 %、75 %であった。同様の実験を健常者の末梢血単核球を用いて行ったが、ペプチド複合体導入は認められたが、細胞傷害効果はみられなかった。

考察

1. ゲノム異常の網羅的探索：

神経芽腫のゲノムコピー数異常解析から、新たに ALK 遺伝子が分子標的として同定され、今後分子標的治療を考慮した腫瘍のゲノム異常情報に基づく新しい腫瘍層別化システムの可能性が拓けた。T-ALL を始めとする小児がんについても、さらに検討を進めており、今後新たな分指標的同定が期待される。

2. 小児がん特化 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析：

肝芽腫について、ゲノム構造と発現遺伝子両者のプロファイルが共に肝芽腫の予後と強く相関すること、またその組み合わせで効率の良い腫瘍の層別化ができることを示し、今後治療における層別化因子として期待がもたれる。

3. 白血病の遺伝子解析：

AML における *WT1* 変異については、今後発現量や予後との関連について検討を進めて行く。T-ALL の *NOTCH1* および *FBXW7* 遺伝子変異と予後との関連性が示唆されており、今後さらにその予後予測因子としての有用性について検討を進める。

4. 小児 ALL のマーカー解析：

今回の検討の結果、小児 T-ALL の表面抗原発現に基づく亜群の特徴とその多様性が明らかとなった。今後、予後との関係について解析を進める。

5. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

糖鎖 LC-MS による発現糖鎖解析法は、微量の検体を用いて構造推定まで行うこ

とが可能であり、今後さらに症例数を増やして発現糖鎖を解析し、病態や予後との関係について検討を進める。

6. 小児がんの検体保存と中央：

悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫等の検体保存を含めた中央病理診断システムはほぼ確立しており、標準的診断法も免疫組織化学染色パネルを含めその統一が進んだ。今後は、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。

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おり、国内の小児 ALL の治療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、重要な意義を持つ。現在その実施に向けた努力をおこなっているが、ヒトゲノム研究実施に際して、倫理手続き等のハードルは以前高い状態にあり、今後その改善が望まれる。

ステロイド反応性は小児 ALL の新たな治療層別化因子として着目されている。今回、単一の中央診断施設でフローサイトメトリーを用いた Day-8 末梢血中白血病細胞絶対数測定を実施しており、今後その有用性について検討を進める。

7. Ewing 肉腫発症モデル系の解析：

EWS/ETS の標的因子 DKK1/2 が Ewing 肉腫の発症や腫瘍としての特性に関与している可能性が示された。Ewing 肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を示す DKK1 は分泌型の蛋白であり、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療や直接投与による治療薬としての可能性について、現在検討中である。

8. 機能性ペプチドによる細胞増殖制御：

p16INK4a 機能性ペプチドを輸送体ペプチドと複合体形成させて投与することによって、ALCL 細胞に対する抗増殖効果が期待できることが明らかとなった。今後、新規治療法としての有用性について、さらに検討を進める。

E. 結論

難治性小児がんの治療予後向上を目指して、その臨床的特性に関する分子情報の体系的解析を行い、ゲノム構造解析や発現遺伝子解析によって、神経芽腫における ALK、Ewing 肉腫における DKK1/2 等の標的因子を同定した他、種々の小児がんにおける予後と相関する因子およびその候補が多数同定された。さらに、これを応用した新規治療モデル開発の基礎研究も進展している。最終年度は、これまでの成果をさらに集約させ、出口の明確な研究成果を挙げることを目指す。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, 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*. 2008 Apr;28(7):2125-37. Epub 2008 Jan 22. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2008 Jun;28(11):3882.
- 2) Saito Y, Miyagawa Y, Onda K, Nakajima H, Sato B, Horiuchi Y, Okita H, Katagiri YU, Saito M, Shimizu T, Fujimoto J, Kiyokawa N. B-cell-activating factor inhibits CD20-mediated and B-cell receptor-mediated apoptosis in human B cells. *Immunology*. 2008 Dec 125;(12):570-590.
- 3) Shiozawa Y, Takenouchi H, Taguchi T, Saito M, Katagiri YU, Okita H, Shimizu T, Yamashiro Y, Fujimoto J, Kiyokawa N. Human Osteoblasts Support Hematopoietic Cell Development in vitro. *Acta Haematologica*. 2008;120(3):134-145.
- 4) Miyagawa Y, Okita H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J-I, Umezawa A, Kiyokawa N. EWS/ETS regulates the expression of the Dickkopf family in Ewing's family tumor cells. *PLoS ONE*. 2009 Mar; 4(2): e4634-e4645
- 5) Kitamura N, Katagiri YU, Itagaki M, Miyagawa Y, Onda K, Okita H, Mori A, Fujimoto J, Kiyokawa N. The expression of granulysin in systemic anaplastic large cell lymphoma in childhood. *Leuk Res*. (in press)

- 6) 清河信敬. 新たな治療の取り組み. 森 鉄也編:小児癌: MD アンダーソン癌センターに学ぶ癌診療, シュプリンガー・ジャパン, p135-144, 2008
- 7) 清河信敬. 「急性リンパ性白血病 1-2 . 膜表面マーカー. 菊地陽編:『小児白血病診療』, 中山書店, (印刷中)
- 8) Park MJ, Taki T, Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia and T cell non-Hodgkin lymphoma. *Brit J Haematol* (in press)
- 9) Jo A, Tsukimoto I, Ishii E, Asou N, Mitani S, Shimada A, Igarashi T, Hayashi Y, Ichikawa H. Age-associated difference in gene expression of pediatric acute myelomonocytic lineage leukemia (FAB M4 and M5 subtypes) and its correlation with prognosis. *Brit J Haematol* (in press)
- 10) Kitoh T, Taki T, Hayashi Y, Nakamura K, Irino T, Osaka M. Transient abnormal myelopoiesis in a Down syndrome newborn followed by acute myeloid leukemia: identification of the same chromosomal abnormality in both stages. *Cancer Genet Cytogenet*. 188 : 99-102, 2009
- 11) Shimada A, Hirato J, Kuroiwa M, Kikuchi A, Hanada R, Wakai K, Hayashi Y. Expression of KIT and PDGFR is associated with a good prognosis in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 50 : 213-7, 2008
- 12) Kawamura M, Kaku H, Taketani T, Taki T, Shimada A, Hayashi Y. 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
- 13) Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, Suda T. Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev*. 22 :986-991, 2008
- 14) Tsuchi H, Tomizawa D, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Koh K, Hirayama M, Miyamura N, Kinukawa N, Hayashi Y, Horibe K, Ishii E. Clinical features and outcome of MLL gene rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants with

additional chromosomal abnormalities other than 11q23 translocation. *Leuk Res.* 32 : 1523-1529, 2008

15) Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: A study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 50 : 264-269, 2008

16) Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. Identification of the novel AML1 fusion partner gene, LAF4, a fusion partner of MLL, in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. *Oncogene.* 27 : 2249-2256, 2008

17) Suzuki M, Kato M, Chen Y, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Takahashi A, Ikeda H, Kuwano H, Ogawa S, Hayashi Y. Whole genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single nucleotide polymorphism genotyping microarrays. *Cancer Science.* 99 : 564-570, 2008

18) Manabe A, Ohara A, Hasegawa D, Koh K, Saito T, Kiyokawa N, Kikuchi A, Takahashi H, Ikuta K, Hayashi Y, Hanada R, Tsuchida M. Significance of the complete clearance of peripheral blasts after 7 days of prednisolone treatment in children with acute lymphoblastic leukemia: the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Haematologica.* 93 : 1155-60, 2008

19) Sawada T, Nishiyama C, Kishi T, Sasazuki T, Komazawa-Sakon S, Xue X, Piao JH, Ogata H, Nakayama J, Taki T, Hayashi Y, Watanabe M, Yagita H, Okumura K, Nakano H. Fusion of OTT to BSAC results in aberrant up-regulation of transcriptional activity. *J Biol Chem.* 283: 26820-8, 2008

20) Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature.* 455:971-974, 2008

21) Hiwatari M, Ono R, Taki T, Hishiya A, Ishii E, Kitamura T, Hayashi Y, Nosaka T. Novel gain-of-function mutation in the extracellular domain of the PDGFRA gene in infant acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia.* 22 : 2279-2280, 2008

22) Taketani T, Taki T, Sako M, Ishii T, Yamaguchi S, Hayashi Y. MNX1-ETV6 fusion gene in an acute megakaryoblastic leukemia and expression of the MNX1 gene in leukemia and normal B cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 186 : 115-119, 2008

23) Shimada A, Kato M, Tamura K, Hirato J, Kanegane H, Takechi Y, Park MJ, Sotomatsu M, Hatakeyama S, Hayashi Y. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with uncontrolled inflammatory cytokinemia and chemokinema which were caused by systemic anaplastic large cell lymphoma: A case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 30 : 785-787, 2008

24) Matsushita H, Nakajima H, Nakamura Y, Tsukamoto H, Tanaka Y, Jin G, Yabe M, Asai S, Ono R, Nosaka T, Sugita K, Morimoto A, Hayashi Y, Hotta T, Ando K, Miyachi H. C/EBPalpha and C/EBP varepsilon induce the monocytic differentiation of myelomonocytic cells with the MLL-chimeric fusion gene. *Oncogene.* 27 : 6749-6760, 2008

25) Ohnishi H, Taki T, Yoshino H, Takita J, Ida K, Ishii M, Nishida K, Hayashi Y, Taniwaki M, Bessho F, Watanabe T. A complex t(1;22;11)(q44;q13;q23) translocation causing MLL-p300 fusion gene in therapy-related acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 81 : 475-480, 2008

26) Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:11921-26, 2008.

27) Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular allelotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood.* 111:776-784, 2008.

28) Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Sakai R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 28: 662-73, 2009.

29) Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. Loss of

imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 99: 1891-9, 2008.

30) Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Ohira M, Shinjo M, Kishida S, Kadomatsu K. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci*. 99: 2070-4, 2008

31) Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is down-regulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int. J. Cancer* 123: 2087-94, 2008.

32) Nakagawa H, Ohira M, Hayashi S, Abe S, Saito S, Nagahori N, Monde K, Shinohara Y, Fujitani N, Kondo H, Akiyama S, Nakagawara A, Nishimura S. Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cancer Lett* 270: 295-301, 2008.

33) Honda S, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Ohira M, Matsunaga T, Yamaoka H, Horie H, Ohnuma N, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. The methylation status of RASSF1 promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int J Cancer* 123: 1117-25, 2008.

34) Abe M, Watanabe N, McDonell N, Takato T, Ohira M, Nakagawara A, Ushijima T. Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology* 74: 50-60, 2008.

35) Sato T, Kaneda M, Ichikawa M, Suzuki D, Nakagawa A, Kobayashi R. Current approaches to management of central fungal infection in pediatric patients with hematologic disorders. *J Pediatr Hematol Oncol* 30(3):249-253, 2008

36) Hossain MS, Ozaki T, Wang H, Nakagawa A, Takenobu H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma. *Oncogene* 27(46):6075-6082, 2008

37) Yokoyama S, Kasahara M, Fukuda A, Sato S, Koda F, Nakagawa A. Epstein-Barr virus-associated erythema nodosum after living-donor liver transplant - a case report.

Liver Transplantation [in press]

38) Yajima M, Inadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that produces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infectious Dis* 198(5):673-682, 2008

39) 佐藤智信、山本浩史、安田一恵、中川温子、小林良二、小林邦彦 「腹腔内破裂をきたした腎細胞癌の女児例」 *小児がん* 45(1):51-55, 2008

40) 中川 温子, 大喜多 肇. 小児固形腫瘍の病理 (2) 神経芽腫群腫瘍・腎腫瘍・胚細胞性腫瘍. 病理と臨床 2008;26(9): 938-944.

41) Matsubara K, Tanaka T, Taki T, Nakagawa A, Nigami H, Tamura A, Fukaya T. ATIC-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma: a case report and review of the literature. *臨床血液* 49(5):325-330, 2008

42) Fujita N, Mori T, Mitsui T, Inada H, Horibe K, Tsurusawa M; Lymphoma Committee of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. The role of hematopoietic stem cell transplantation with relapsed or primary refractory childhood B-cell non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell leukemia: a retrospective analysis of enrolled cases in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51: 188-92.

43) Kikuchi A, Mori T, Fujimoto J, Kumagai M, Sunami S, Okimoto Y, Tsuchida M. Outcome of childhood B-cell non-Hodgkin lymphoma and B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with the Tokyo Children's Cancer Study Group NHL B9604 protocol. *Leuk Lymphoma*. 2008; 49: 757-62.

44) Shimasaki N, Mori T, Torii C, Sato R, Shimada H, Tanigawara Y, Kosaki K, Takahashi T. Influence of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicities during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008; 30: 347-52.

45) 森 鉄也: MD アンダーソン癌センターに学ぶ癌診療「小児がん」森 鉄也 監訳, シュプリンガー・ジャパン, 2008

46) 大喜多 肇, 秦 順一. 骨関節病変のエッセンス I - 腫瘍性病変 - Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の臨床病理. 病理と臨

床 2009;27(2):151-155

47) Narimatsu H, Iino M, Ichihashi T, Yokozawa T, Hayakawa M, Kiyoi H, Takeo T, Sawamoto A, Iida H, Tsuzuki M, Yanada M, Naoe T, Suzuki R, Sugiura I. Clinical significance of minimal residual disease in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Int J Hematol.* 2008 Aug; 88(2):154-8.

2. 学会発表

1) 金子智典, 大喜多肇, 中島英規, 宮川世志幸, 片桐洋子, 清河信敬, 藤本純一郎, 佐藤智典. 糖鎖プライマー法を用いた神経芽腫に発現する糖鎖の LC-MS/MS によるハイスループット解析. 日本化学会第 88 春季年会, 東京, 3 月 26 日-30 日, 2008.

2) Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. Induction of Ewing's family tumor-like characteristics in human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells by chimeric EWS/ETS proteins. The American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2008, San Diego, CA, Apr 12-16, 2008.

3) 大喜多肇, 松井淳, 中川温子, 松岡健太郎, 片桐洋子, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. パラフィン切片を用いた Chromogenic in situ hybridization による神経芽腫における MYCN 遺伝子増幅の判定. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢, 5 月 15 日-17 日, 2008.

4) 宮川世志幸, 大喜多肇, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. Ewing's ファミリー腫瘍特異的融合遺伝子 EWS/ETS による DKK ファミリー遺伝子群の発現制御. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢, 5 月 15 日-17 日, 2008.

5) 片桐洋子, 佐藤伴, 中島英規, 宮川世志幸, 堀内保臣, 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. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢, 5 月 15 日-17 日, 2008.

6) Kaneko T, Okita H, Nakajima H, Ogasawara N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Sato T, Fujimoto J, Kiyokawa N. Human Neuroblastoma Cells are Characterized by Glycolipids Expression. *Advances Neuroblastoma Research* 2008, Chiba, May 21-24, 2008.

7) Okita H, Nakagawa A, Matsui J, Matsuoka K, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Kiyokawa N. Determination of MYCN Gene Amplification in Archival Neuroblastic Tumors by Chromogenic in situ hybridization. *Advances Neuroblastoma*

Research 2008, Chiba, May 21-24, 2008.

8) 恩田恵子, 清河信敬, 藤本純一郎, 宮川世志幸, 大喜多肇, 齋藤正博, 牧本敦, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 標準粒子を用いた小児急性白血病の末梢血残存白血球細胞数絶対値直接算定法. 第 18 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 28-29 日, 2008.

9) 清河信敬, 加藤元博, 藤本純一郎, 宮川世志幸, 恩田恵子, 大喜多肇, 齋藤正博, 牧本敦, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏, 小川誠司. 高密度 SNP マイクロアレイを用いた本邦の小児急性リンパ芽性白血病の molecular karyotyping. 第 70 回日本血液学会総会, 京都, 10 月 10 日-12 日, 2008.

10) Miyagawa Y, Okita H, Sato B, Horiuchi Y, Nakajima H, Katagiri YU, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Kiyokawa N. Transcriptional regulation of Dickkopf2 by EWS/ETS in Ewing family tumor cells. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10 月 28 日-30 日, 2008.

11) 恩田恵子, 清河信敬, 藤本純一郎, 齋藤正博, 大喜多肇, 梶原道子, 福島敬, 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 (TCCSG) 急性リンパ性白血病

(ALL) マーカー中央診断における T-ALL のマーカー解析. 第 50 回日本小児血液学会, 千葉, 11 月 14-16 日, 2008.

12) 中島英規, 金子智典, 巽国子, 宮川世志幸, 恩田恵子, 片桐洋子, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. 小児急性リンパ性白血病の質量分析装置による発現糖脂質解析. 第 50 回日本小児血液学会, 千葉, 11 月 14-16 日, 2008.

13) 小嶋靖子, 太田節雄, 牧本敦, 小原明, 福島啓太郎, 福島敬, 犬飼岳史, 秋山政晴, 子川和宏, 矢部普正, 康勝好, 清河信敬, 真部淳, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 小児急性リンパ性白血病に対する寛解導入療法・早期強化療法の安全性に関する検討: TCCSG L04-16 研究. 第 50 回日本小児血液学会, 千葉, 11 月 14-16 日, 2008.

14) 出口隆生, 清河信敬, 太田秀明, 鶴澤正仁, 堀部敬三, 駒田美弘. 小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化のための外部精度管理. 第 50 回日本小児血液学会, 千葉, 11 月 14-16 日, 2008.

15) 恩田恵子, 片桐洋子, 藤本純一郎, 清河信敬. BAFF による B 細胞の CD20/BCR を介するアポトーシスの抑制. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12 月 1-3 日, 2008.

- 16) 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 NALM6 に発現する CD10 分子の neutralendopeptidase 活性と糖鎖構造. 第 81 回日本生化学会大会, 神戸, 12 月 9 日-11 日, 2008.
- 17) 宮川世志幸, 大喜多肇, 佐藤伴, 堀内保臣, 中島英規, 片桐洋子, 梅澤明弘, 秦順一, 藤本純一郎, 清河信敬. Ewing ファミリー腫瘍特異的融合遺伝子 EWS/ETS による Dickkopf2 の発現制御. 第 31 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 9 日-11 日, 2008.
- 18) 藤本純一郎. 「イントロダクション」. 分野別シンポジウム 4 小児がん経験者をめぐる問題と長期フォローアップシステムの整備. 第 111 回日本小児科学会学術集会. 東京, 4 月 25 日, 2008.
- 19) L-M. Yang, N. Sakamoto, and J. Fujimoto. Survival Variability among Asians with Childhood Central Nervous System Tumor in the United States. Society of Epidemiology Research. Chicago, June 24-27, 2008.
- 20) 藤本純一郎. 「がんの子どもを見守るしくみ」2008 年第 1 回市民向けがん情報講演会「がんの子どもを社会で支えよう」. 国立がんセンター国際交流会館. 年 7 月 12 日, 2008 年.
- 21) 藤本純一郎. 「望まれる長期フォローアップシステムとは」. シンポジウム「守る」～小児脳腫瘍と闘う患児を守る～小児脳腫瘍の会. 横浜. 11 月 3 日, 2008 年.
- 22) 羊利敏, 坂本なほ子, 邱冬梅, 藤本純一郎. 日本における小児がん死亡動態. 第 67 回日本公衆衛生学会. 博多, 11 月 5-7 日, 2008.
- 23) 堀江弘, 秦順一, 浜崎豊, 小林庸次, 田中祐吉, 横山繁昭, 北條洋, 森川征彦, 中山雅弘, 宮内潤, 恒吉正澄, 藤本純一郎, 石田剛, 中川温子. 小児固形腫瘍の生物学的特異性の解明と新たな病理組織分類アトラスの作成. 第 24 回日本小児がん学会・第 50 回日本小児血液学会. 幕張, 11 月 14-16 日, 2008.
- 24) Park MJ, Taki T, Oda M, Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y: FBW7 and NOTCH1 mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell non-Hodgkin's lymphoma; a Japan association of childhood leukemia study group. 第 48 回イギリス血液学会 2008.4.5-9 イギリス
- 25) 山田佳之, 林泰秀: 好酸球増多症候群/好酸球性白血病マウスモデルの検討. 第 111 回日本小児科学会学術集会 2008.4.25-27 東京
- 26) 滝田順子, 陳玉彦, 加藤元博, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, 菊地陽, 小川誠司, 林泰秀, 五十嵐隆: 横紋筋肉腫における網羅的ゲノム解析. 第 111 回日本小児科学会学術集会 2008.4.25-27 東京
- 27) 加藤元博, 滝田順子, 陳玉彦, 康勝好, 井田孔明, 菊地陽, 滝智彦, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆: マイクロアレイを用いた乳児白血病の網羅的ゲノム・エピゲノム解析. 第 111 回日本小児科学会学術集会 2008.4.25-27 東京
- 28) 陳玉彦, 加藤元博, 滝田順子, 中村文彦, 山本豪, 真田昌, 南谷泰仁, 小川誠司, 林泰秀, 五十嵐隆: 若年性急性骨髄単球性白血病における網羅的ゲノム・メチル化解析. 第 111 回日本小児科学会学術集会 2008.4.25-27 東京
- 29) 加藤元博, 滝田順子, 陳玉彦, 大平美紀, 山本豪, 真田昌, 南谷泰仁, 五十嵐隆, 菊地陽, 中川原章, 小川誠司, 林泰秀: 神経芽腫における網羅的ゲノム解析. 第 5 回北関東がんセミナー 2008.5.10 高崎
- 30) Kato M, Takita J, Ohira M, Chen YY, Sanada M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Ogawa S: Molecular allelo-karyotyping of neuroblastoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarrays. ANR 2008.5.21-24 千葉
- 31) Kato M, Iio M, Takita J, Chen YY, Nakamura F, Sanada M, Watanabe T, Igarashi T, Ogawa S, Hayashi Y: Genome-wide analysis of epigenetic abnormalities in neuroblastoma using oligonucleotide tiling array. ANR 2008.5.21-24 千葉
- 32) Takita J, Chen YY, Kato M, Yamamoto G, Sanada M, Nannya Y, Kikuchi A, Igarashi T, Ogawa S, Hayashi Y: High-resolution copy number analysis and identification of target genes in neuroblastoma using high-density SNP-genotyping microarrays. ANR 2008.5.21-24 千葉
- 33) Sano H, Shimada A, Hirato J, Kuroiwa M, Kikuchi A, Hanada R, Wakai K, Park MJ, Sotomatsu M, Hayashi Y: Expression of KIT and PDGFR is associated with a good clinical outcome in neuroblastoma. ANR 2008.5.21-24 千葉
- 34) 田内久道, 富澤大輔, 江口真理子, 石前峰斉, 康勝好, 平山雅浩, 宮村能子, 絹川直子, 林泰秀, 堀部敬三, 石井榮一: 11q23 転座以外の付加的染色体異常を認めた MLL 再構成乳児急性リンパ性白血病の臨床的特徴及び予後. 第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
- 35) 小原明, 真部淳, 牧本敦, 康勝好, 小川千登世, 磯山恵一, 杉田憲一, 杉田完爾, 野口靖, 太田節雄, 前田美穂, 矢部普正, 金子隆, 熊谷昌明, 梶原道

- 子、高橋浩之、菊地陽、嶋田博之、外松学、福島敬、齋藤正博、林泰秀、花田良二、土田昌宏：小児 ALL に対する化学療法早期の有効性と安全性の検討：TCCSG ALL L04-16 研究。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
- 36) 佐野弘純、朴明子、山田佳之、外松学、田村一志、金澤崇、林泰秀：CD10 の発現と MLL 再構成が通常のパターンと異なった乳児急性リンパ性白血病の 2 症例。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
- 37) 朴明子、佐野弘純、山田佳之、外松学、菊地陽、花田良二、林泰秀：小児 AML with multilineage dysplasia の 2 例。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
- 38) 滝田順子、加藤元博、陳玉彦、大木健太郎、山本豪、真田昌、南谷泰仁、滝智彦、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司：超高密度 SNP アレイを用いた MLL 再構成陽性小児白血病における molecular allelo-karyotyping。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
- 39) 大木健太郎、滝田順子、加藤元博、陳玉彦、山本豪、真田昌、南谷泰仁、菊地陽、林泰秀、五十嵐隆、小川誠司：小児急性骨髄球性白血病における Molecular allelo-karyotyping。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
- 40) 大木健太郎、滝田順子、加藤元博、陳玉彦、真田昌、菊地陽、小川誠司、五十嵐隆、林泰秀：小児急性骨髄性白血病における網羅的ゲノム解析。第 67 回日本癌学会 2008.10.28-30 名古屋
- 41) 陳玉彦、滝田順子、加藤元博、太平美紀、真田昌、菊地陽、五十嵐隆、中川原明、林泰秀、小川誠司：神経芽腫における網羅的ゲノム解析および標的遺伝子の同定。第 67 回日本癌学会 2008. 10.28-30 名古屋
- 42) 滝田順子、加藤元博、陳玉彦、山本豪、真田昌、南谷泰仁、大木健太郎、菊地陽、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司：横紋筋肉腫における網羅的ゲノム解析。第 67 回日本癌学会 2008.10.28-30 名古屋
- 43) 加藤元博、中崎久美、竹内健吾、真田昌、千葉滋、石川雄一、滝田順子、林泰秀、森茂郎、小林幸夫、黒川峰夫、小川誠司：悪性リンパ腫における網羅的ゲノム解析。第 67 回日本癌学会 2008. 10.28-30 名古屋
- 44) 朴明子、滝智彦、堀部敬三、林泰秀：小児 T 細胞型急性リンパ性白血病における PTEN 遺伝子の解析。第 67 回日本癌学会 2008.10.28-30 名古屋
- 45) 城青衣、高橋広夫、月本一郎、堀部敬三、多和昭雄、五十嵐隆、林泰秀、市川仁：DNA マイクロアレイによる小児急性骨髄性白血病の診断。第 67 回日本癌学会 2008.10.28-30 名古屋
- 46) 滝田順子、加藤元博、陳玉彦、太平美紀、真田昌、菊地陽、本村あい、康勝好、井田孔明、五十嵐隆、中川原章、林泰秀、小川誠司：高密度 SNP アレイを用いた神経芽腫における網羅的ゲノム解析。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 47) 林泰秀：小児 T 細胞型急性リンパ性白血病の最新の仮題-分子病態を中心に-。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 48) 城青衣、高橋広夫、嶋田明、月本一郎、堀部敬三、多和昭雄、石井榮一、五十嵐隆、林泰秀、市川仁：DNA マイクロアレイによる小児急性骨髄性白血病の診断。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 49) 木下明俊、宮地勇人、滝智彦、高橋浩之、林泰秀、多和昭雄：JPLSG AML05 臨床試験における新 WHO 分類を用いた横断的中央診断。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 50) 大木健太郎、滝田順子、加藤元博、陳玉彦、真部淳、菊地陽、五十嵐隆、小川誠司、林泰秀：超高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた小児急性骨髄性白血病における網羅的ゲノム解析。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 51) 佐野弘純、久保田知里、朴明子、山田佳之、外松学、林泰秀：急性骨髄性白血病における WT1 遺伝子変異の解析。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 52) 加藤元博、滝田順子、陳玉彦、真田昌、大木健太郎、本村あい、康勝好、井田孔明、菊地陽、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司：高密度 SNP アレイを用いた横紋筋肉腫における Molecular allelo-karyotyping。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 53) 加藤元博、滝田順子、陳玉彦、真田昌、康勝好、井田孔明、本村あい、菊地陽、滝智彦、五十嵐隆、小川誠司、林泰秀。MLL 遺伝子再構成陽性白血病における網羅的ゲノム解析。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 54) 陳玉彦、滝田順子、崔永林、加藤元博、太平美紀、真田昌、菊地陽、五十嵐隆、中川原章、林泰秀、問野博行、

- 小川誠司：ALK 遺伝子の活性型変異は神経芽腫の発症に關与する。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 55) 朴明子、佐野弘純、山田佳之、外松学、林泰秀：小児 AML with multilineage dysplasia の女児例。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 56) 佐野弘純、若井公子、朴明子、山田佳之、外松学、林泰秀：神経芽腫における receptor tyrosine kinase の発現、変異と臨床像。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 57) 朴明子、滝智彦、佐野弘純、山田佳之、外松学、林泰秀：小児 T 細胞型白血病における PTEN 遺伝子の解析。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
- 58) Masashi S, Yung SL, Suzuki T, Kato M, Sakata MY, Kumano K, Kawamata N, Takita J, Mori H, Kurokawa M, Chiba S, Omine M, Koeffler HP, Ogawa S. Genome-Wide Analysis of MDS/MPD Disclosed Frequent Homozygous C-Cbl mutations Tightly Associated with 11q-UPD. 50th ASH Annual Meeting Abstracts. 112:855-,2008.
- 59) Kato M, Nakazaki K, Sato Y, Takeuchi K, Sanada M, Asakura Y, Muto S, Chen Y, Takita J, Hayashi Y, Igarashi T, Watanabe T, Tobinai K, Ishikawa Y, Mori S, Kurokawa M, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Genome-Wide Analysis of B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Disclosed Frequent Involvement of Genes in NFκB Pathway. 50th ASH Annual Meeting Abstracts. 112:807-,2008.
- 60) Ogawa S, Matsubara A, Kashiwase K, Onizuka M, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Kawase T, Satake M, Takita J, Morishima Y, Chiba S, Saji H, Inoko H, Kodera Y, Sasazuki T. Genome-Wide Association Studies of Genetic Incompatibility That Is Relevant to the Development of GvHD in Unrelated Bone Marrow Transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts. 112:715-,2008.
- 61) 鈴木信、加藤元博、南谷泰仁、山本豪、高橋篤、池田均、桑野博行、小川誠司、林泰秀。高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた肝芽腫におけるゲノム異常の網羅的解析。Dokkyo Journal of Medical Sciences. 35:144,2008.
- 62) 陳玉彦、滝田順子、加藤元博、大平美紀、真田昌、菊地陽、五十嵐隆、中川原章、林泰秀、小川誠司。Molecular allelo-karyotyping and identification of target genes of neuroblastoma using SNP-genotyping microarray. 日本癌学会総会記事。67 回:64,2008.
- 63) Ohira M, Nimura Y, Oba S, Tomioka N, Misra A, Fridlyand J, Nakamura Y, Isogai E, Koda T, Todo S, JPLT, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, Ishii S, Nakagawara A.: Risk classification of hepatoblastoma by genomic signature. American Association for Cancer Research 99th Annual Meeting (AACR) 2008, San Diego, USA. April 12-16, 2008.
- 64) Ohira M, Oba S, Tomioka N, Nakamura Y, Isogai E, Kamiyo T, Koda T, Kaneko Y, Feuerstein BG, Pinkel D, Albertson DG, Ishii S, Nakagawara A.: Combined genomic and molecular signatures of neuroblastoma: Implication of their clinical application. Advances in Neuroblastoma Research 2008 (ANR2008), 幕張 5 月 21 日-24 日, 2008 .
- 65) Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Kamiyo T, Isogai E, Koda T, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A.: Combined genomic and molecular signatures of neuroblastoma: Implication of their clinical application. Advances in Neuroblastoma Research 2008 (ANR2008), 幕張 5 月 21 日-24 日, 2008 .
- 66) Ohira M, Kojima T, Oba S, Niwa T, Tomioka N, Nakamura Y, Isogai E, Kamiyo T, Koda T, Todo S, Kaneko Y, Ishii S, Nakagawara A.: Integrated analysis of genome copy number aberrations and its application for risk stratification for neuroblastoma. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10 月 28 日-30 日, 2008.
- 67) 大平美紀、小島俊男、大羽成征、丹羽崇文、富岡伸元、中村洋子、磯貝恵理子、上條岳彦、好田忠行、石井信、中川原章。ゲノムコピー数異常を用いた進行神経芽腫の新規予後層別化。第 50 回日本小児血液学会総会・第 24 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 幕張, 11 月 14 日-16 日, 2008 .
- 68) A Nakagawa. Advanced Neuroblastoma Research 2008 「MYCN amplified Neuroblastoma with Favorable Histology」 Chiba, Japan 5 月 22 日 2008.
- 69) 中川温子, 大喜多肇, 松岡健太郎。第 28 回小児病理研究会 「小児ホジキンリンパ腫の臨床病理学的検討ー EBV との関連についてー」 松本 9 月 6 日 2008.
- 70) 黒田達夫、松岡健太郎、本名敏郎、森川信行、田中秀明、高安肇、藤野明浩、種村比呂子、武藤充、中川温子、熊谷昌明、森鉄也、野坂俊介、正木英一。「進行神経芽腫における微小転移の臨床的意義」 第 24 回日本小児がん学会 千葉 11 月 14 日 2008.
- 71) 山本真実、末永雄介、中川温子、上條岳彦、中川原章。「神経芽腫予後因子としての p53 ファミリー発現量」 第 24 回日本小児がん学会 千葉 11 月 14 日 2008.
- 72) 坂田尚己、上田悟史、八木誠、木村

雅友、青木光希子、中川温子、竹村司。
「悪性末梢神経鞘腫における PDGFR の発現とイマチニブおよび JNK 阻害剤の効果」第 24 回日本小児がん学会 千葉 11 月 14 日 2008.

73) 森川信行、黒田達夫、本名敏郎、塩田曜子、熊谷昌明、中川温子、松岡健太郎、正木英一、田中秀明、高安肇、藤野明浩、種村比呂子、武藤充。「当院における胸膜肺芽 type II&III の治療経験：多剤併用療法と拡大根治手術の有用性」第 24 回日本小児がん学会 千葉 11 月 14 日 2008.

74) 野中裕子、木澤洋恵、二宮佑美、吉村稔、山下敦、塩田曜子、森鉄也、中川温子。「小児ランゲルハンス組織球症における骨髄評価」第 55 回日本臨床検査医学会学術集会 名古屋 11 月 29 日 2008.

75) Williams D, Mori T, Reiter T, Le Deley MC, Brugieres L, on behalf of EICNHL. Central nervous system disease (CNS) in anaplastic large cell lymphoma (ALCL) in children, EICNHL experience. 10th International Conference on Malignant Lymphoma, June 4-8, 2008, Lugano, Switzerland.

76) 船木聡美、清谷知賀子、森鉄也、熊谷昌明：小児がん病棟に常勤する臨床心理士の役割。小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page387, 2008

77) 細谷要介、塩田曜子、清谷知賀子、宇野光昭、満生紀子、亀井宏一、熊谷昌明、森鉄也：小児リンパ系腫瘍に合併する腫瘍崩壊症候群の解析 国立成育医療センターにおける経験。小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page377, 2008

78) 満生紀子、宇野光昭、細谷要介、塩田曜子、清谷知賀子、森鉄也、熊谷昌明：国立成育医療センターで経験した眼窩腫瘍 5 例の検討。小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page373, 2008

79) 武藤充、黒田達夫、本名敏郎、森川信行、田中秀明、高安肇、藤野明浩、種村比呂子、熊谷昌明、森鉄也、正木英一、中川温子：Image Defined Risk Factor 陽性の中間リスク群と考えられる神経芽細胞腫症例の治療経験。小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page340, 2008

80) 宇野光昭、清谷知賀子、塩田曜子、細谷要介、満生紀子、宮寄治、熊谷昌明、森鉄也：小児リンパ系腫瘍に対する治療経過中の中枢神経画像検査と所見 国立成育医療センターの経験。小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page335, 2008

81) 清谷知賀子、塩田曜子、満生紀子、宇野光昭、細谷要介、阪井裕一、久保田雅也、堀川玲子、師田信人、森鉄也、熊谷昌明：頭蓋内胚細胞腫瘍 13 例の検討。小児がん 45 巻プログラム・総会号

Page292, 2008

82) 森鉄也、熊谷昌明、清谷知賀子、塩田曜子、藤本純一郎：国立成育医療センターにおける小児がん・重篤な血液疾患患者フォローアップの現状。小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page253, 2008

83) 矢部普正、菊地陽、小池和俊、松本正栄、柳町昌克、角田治美、海老原康博、森鉄也、牧本敦、秋山政晴、小川千登世、梶原道子、滝田順子、小原明、嶋田博之、東京小児がん研究グループ(TCCSG)SCT 委員会：造血細胞移植の具体的方法についての施設間差違の検討。小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page208, 2008

84) 小川千登世、小原明、真部淳、菊地陽、康勝好、富澤大輔、藤村純也、井上裕靖、角南勝介、84 石井栄三郎、塩原正明、森鉄也、高橋裕之、林泰秀、花田良二、土田昌宏：B precursor-ALL に対する中枢神経白血病予防治療の変遷と成績 TCCSG ALL L89-12,92-13,95-14,99-15 研究。小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page190, 2008

85) 飛内賢正、小林幸夫、牧本敦、横澤敏也、瀧本哲也、堀部敬三、桂幸一、大野竜三。再発・難治性 T 細胞性急性リンパ性白血病/リンパ芽球性リンパ腫に対する nelarabine の第 I 相試験。第 70 回日本血液学会総会、京都、10 月 10 日～10 月 12 日、2008。

86) 鈴木康裕、横澤敏也、萩原彰人、青木恵津子、加藤千明、大橋春彦、永井宏和、濱口元洋、堀田知光。高齢者急性骨髄性白血病における救援化学療法としての Gemtuzumab Ozogamicin(GO)の検討。第 70 回日本血液学会総会、京都、10 月 10 日～10 月 12 日、2008。

87) 宮澤憲治、高木亮、萩原彰人、横澤敏也、永井宏和、坂野和英。メソトレキセート大量療法により急性腎不全を呈し、血液透析・血液吸着を必要とした急性リンパ性白血病の一例。第 18 回日本医療薬学会年会、札幌、9 月 20 日～9 月 21 日、2008。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

難治性小児がんの網羅的糖鎖・ゲノム解析とその臨床応用

研究代表者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部長

研究要旨： 小児急性リンパ芽球性白血病（ALL）の臨床検体を用いて、マイクロアレイによる T-ALL の網羅的ゲノム構造解析を進め、新規標的因子の候補となる遺伝子を特定した。フローサイトメトリーによる小児 T-ALL の体系的表面抗原解析を行い、抗原発現に基づく亜群の存在とその特徴について明らかにした。小児 ALL 細胞の液体クロマトグラフィー質量分析による網羅的発現糖鎖解析により、各病型における特徴的な糖鎖発現様式について明らかにした。今後さらに解析を進め、各分子解析結果の意義や生物学的特性との関係について明らかにし、診断や治療における標的因子探索への応用を目指す。

A. 研究目的

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

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

そこで本研究では、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫、Wilms 腫瘍、神経芽腫、難治例や再発例を含む小児白血病等の臨床検体に

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

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

B. 研究方法

1. 小児がんのゲノム構造解析：

白血病細胞から抽出したゲノム DNA を適切な制限酵素で消化し、断端に共通のアダプターを付加した後、PCR により増幅した。PCR 産物の精製後に DNaseI 処理によりさらに断片化し、biotin ラベルをした後、GenChip 50K/250K アレイ上でハイブリダイゼーションを行った。小川らが開発した CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いてデータを分析し、平均解像度 24kb ~ 6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数の解析を行った。

2. 小児 ALL のマーカー解析：

骨髄液あるいは末梢血液について、

FITC、PE、PC5、PC7 の 4 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる全血法の蛍光染色を行った。溶血後、Digital flow cytometry を用いて 1 レーザー 4 カラー解析を行った。lineage 決定・病型診断に必要な項目に加え、様々な機能分子に対する抗体についても解析を行った。

3. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

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

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

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 小児がんのゲノム構造解析：

T-細胞性(T)-ALL および T-細胞性(T)-リンパ芽球性リンパ腫(NHL)の臨床検体 63

例の網羅的なゲノムコピー数の解析により、昨年度同定した微小異常 (欠失あるいは増幅) の集積点の候補領域 45 カ所についてさらに解析を進めた。このうち 3 カ所は TCR あるいは Ig の可変領域であり、これ以外は 24 カ所の増幅領域、16 カ所の欠失領域、2 カ所の増幅-欠失の混合領域が含まれていた。各領域にコードされる遺伝子について Web 上のデータベースで検索した結果、91 個の遺伝子を見いだした。その機能別の内訳は、転写因子 18、刺激伝達 8、細胞周期 3、アポトーシス 2、酵素 2、その他 58 であった。

染色体・領域	異常	発現	遺伝子名
Ch1 p36.31	欠失	転写	Calcmodulin-binding/transcriptionactivator
Ch1 p36.12-p36.11	欠失	転写	Leucine zipper protein 1
Ch1 p36.12-p36.11	欠失	転写	Zinc finger protein 436
Ch1 p36.12-p36.11	欠失	転写	E2F transcription factor 2
Ch1 p36.12-p36.11	欠失	転写	Inhibitor of DNA binding 3
Ch1 p36.12-p36.11	欠失	転写	Transcription elongation factor A (SET) 3
Ch10 q11.22	増幅	転写	Zinc finger protein 488
Ch11 q24.3	増幅	転写	ETS1
Ch12 p13.31	増幅	転写	Forkhead box J2
Ch5 p15.33	増幅	転写	Zinc finger DHHC-type containing 11
Ch8 q24.3	増幅	転写	Zinc finger protein 201
Ch8 q24.3	増幅	転写	Zinc finger protein 34
Ch8 q24.3	増幅	転写	Zinc finger protein517
Ch8 q24.3	増幅	転写	Zinc finger protein 250
Ch8 q24.3	増幅	転写	Zinc finger protein 7
Ch8 q24.3	増幅	転写	Zinc finger protein 16
Ch12 p12.3	欠失	転写	LMO3 LIM domain only-3
Ch13 q14.3	増幅	転写	Coiled-coil domain containing 70
Ch1 p36.31	欠失	転写	Apoptosis THAP-domain containing apoptosis associated
Ch11 q24.3	増幅	転写	Apoptosis p53-regulated apoptosis-inducing protein 1
Ch9 p21.3	欠失	細胞周期	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A isoform 4
Ch9 p21.3	欠失	細胞周期	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B isoform 1
Ch12 p13.2-13.1	欠失	細胞周期	CDK inhibitor CDKN1A/p21

表 1 T-ALL のゲノム集積点にコードされる遺伝子表 1 に、このうち転写因子、細胞周期、アポトーシスに関連する遺伝子を示す。

細胞周期関連では、3 種の CDK 抑制因子が見いだされたが、いずれも他の ALL 亜群との関連がすでに報告されているものであった。一方、転写因子については、その機能について未同定のものが大部分であった。

2. 小児 ALL のマーカー解析：

2008 年には、東京小児がん研究グループ (TCCSG) の ALL 治療プロトコール登録症例を中心として小児-ALL 194 例の表面マーカー解析を行い、このうち、細胞質内 CD3 陽性かつその他の T-細胞抗原が 1 つ以上陽性の T-ALL の基準を満たす症例が 20 例あった。これに過去 4 年間の T-ALL および T-NHL 解析例を合わせた 106 例について、詳細な解析を行った。European Group for Immunological Classification of Acute Leukemia (EGIL) の分類に従って分類したところ、T-I (pro-T) = 9 例、T-II (pre-T) 37 例、T-III (Cortical-T) = 27 例、T-IV (Mature-T) = 23 例であった。このうち、T-IV には 9 例の γ/δ 型が含まれて

いた。また、この他に CD56 陽性が 10 例存在し、上記と同様に分類すると、T-I = 2 例、T-II 6 例、T-III = 1 例、T-IV = 1 例であった。

個々の特徴的なマーカーに着目したところ、TdT を発現しない症例も存在し、特に NHL 型の T-I、T-IV 型では半数以上が陰性であった。CD99 は全般的に発現していたが、特に T-II、T-III で大部分の症例に陽性であった。CD10 も各亜群で発現を認めたが、特に T-III で陽性率が高かった。一方、CD34 は、T-I や T-II の未熟な亜群で陽性率が高かったが、より分化した T-IV 型でも発現している症例が存在した。骨髄系抗原の aberrant な発現は最も未熟な T-I 型で多く、その 3/4 以上に何らかの骨髄系抗原の発現を認めたが、T-IV ではその発現を認めなかった。

CD79a は B 細胞系に特異的な抗原とされているが、実際には T-ALL でも全体の 3 割以上で弱～中等度陽性になる症例が認められ、このうち一部については、メッセージレベルでもその発現を確認したことから、抗体の非特異的反応ではなく、実際に同分子が発現しているものと考えられた。

今回検討した症例は、初発時からの観察期間が短いため、長期予後との関係については検討が行えなかったため、初期治療情報が得られた 31 例について、初期治療におけるリスク分類およびプレドニン反応性とマーカーとの関係について解析したところ、T-IV 型 (8 例) では、初期リスク分類で高度危険群が多く、また全例がプレドニン抵抗性であったが、T-I 型 (3 例) では相対的に危険度が低い症例が多く、またプレドニン反応性も良かった。

3. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

LC-MS を用いた小児白血病細胞の発現糖脂質糖鎖の網羅的解析をさらに進めた。用いて実際に、成熟 B-ALL 3 例、T-ALL 2 例、乳児白血病 2 例、Precursor B-ALL 2 例の発現糖鎖解析結果に対して、各白血病の病型ごと糖鎖発現様式の特徴について検討したところ、成熟 B-ALL に特徴的であることが報告されている Gb3Cer の発現を本法によっても確認することが可能

であった。また、B-前駆細胞性 (B-precursor) ALL では、Lc3Cer の発現が特徴的であることが判明し、特により未分化な段の腫瘍と考えられる乳児型の pro-B ALL で、その含有率がより高い傾向を認めた。また、T-ALL、B-precursor ALL では、LacCer の含有率が高い傾向を認めた。

D. 考察

1. 小児がんのゲノム構造解析：

T-ALL のゲノム構造解析を行い、異常の集積点にコードされる遺伝子群を特定した。今後、その意義や生物学的特性との関係について明らかにして行く。また、Wilms 腫瘍 50 例についても同様の解析を行っている。

2. 小児 ALL のマーカー解析：

今回の検討の結果、T-ALL の表面抗原発現の多様性が明らかとなった。最近、骨髄系抗原陽性の pro-T ALL が予後不良であることが報告されており、今後本邦の標準的治療における、T ALL の表面抗原の発現様式と予後との関係について、さらに検討を進める。

3. 小児 ALL の網羅的発現糖鎖解析：

今回の検討の結果、小児白血病の各病型における糖鎖発現特徴が明らかになった。今後さらに症例数を増やし、病態や予後との関係について、解析を進める。

E. 結論

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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, 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.* 2008 Apr;28(7):2125-37. Epub 2008 Jan 22. Erratum in: *Mol Cell Biol.* 2008 Jun;28(11):3882.

2) Saito Y, Miyagawa Y, Onda K, Nakajima H, Sato B, Horiuchi Y, Okita H, Katagiri YU, Saito M, Shimizu T, Fujimoto J, Kiyokawa N. B-cell-activating factor inhibits CD20-mediated and B-cell receptor-mediated apoptosis in human B cells. *Immunology.* 2008 Dec 125;(12):570-590.

3) Shiozawa Y, Takenouchi H, Taguchi T, Saito M, Katagiri YU, Okita H, Shimizu T, Yamashiro Y, Fujimoto J, Kiyokawa N. Human Osteoblasts Support Hematopoietic Cell Development in vitro. *Acta Haematologica.* 2008;120(3):134-145.

4) Miyagawa Y, Okita H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J-I, Umezawa A, Kiyokawa N. EWS/ETS regulates the expression of the Dickkopf family in Ewing's family tumor cells. *PLoS ONE.* 2009 Mar; 4(2): e4634-e4645

5) Kitamura N, Katagiri YU, Itagaki M, Miyagawa Y, Onda K, Okita H, Mori A, Fujimoto J, Kiyokawa N. The expression of granulysin in systemic anaplastic large cell lymphoma in childhood. *Leuk Res.* (in press)

6) 清河信敬. 新たな治療の取り組み. 森 鉄也編:小児癌: MD アンダーソン癌センターに学ぶ癌診療, シュプリインガー・ジャパン, p135-144, 2008

7) 清河信敬. 「急性リンパ性白血病 1-2. 膜表面マーカー. 菊地陽編:『小児白血病診療』, 中山書店, (印刷中)

2. 学会発表

1) 金子智典, 大喜多肇, 中島英規, 宮川世志幸, 片桐洋子, 清河信敬, 藤本純一郎, 佐藤智典. 糖鎖プライマー法を用いた神経芽腫に発現する糖鎖の LC-MS/MS によるハイスループット解析. 日本化学会第 88 春季年会, 東京, 3 月 26 日-30 日, 2008 .

2) Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. Induction of Ewing's family tumor-like characteristics in human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells by chimeric EWS/ETS proteins . The American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting

2008, San Diego, CA, Apr 12-16, 2008 .

3) 大喜多肇, 松井淳, 中川温子, 松岡健太郎, 片桐洋子, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. パラフィン切片を用いた Chromogenic in situ hybridization による神経芽腫における MYCN 遺伝子増幅の判定. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢, 5 月 15 日-17 日, 2008 .

4) 宮川世志幸, 大喜多肇, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬.

Ewing's ファミリー腫瘍特異的融合遺伝子 EWS/ETS による DKK ファミリー遺伝子群の発現制御. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢, 5 月 15 日-17 日, 2008 .

5) 片桐洋子, 佐藤伴, 中島英規, 宮川世志幸, 堀内保臣, 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. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢, 5 月 15 日-17 日, 2008 .

6) Kaneko T, Okita H, Nakajima H, Ogasawara N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Sato T, Fujimoto J, Kiyokawa N. Human Neuroblastoma Cells are Characterized by Glycolipids Expression . *Advances Neuroblastoma Research 2008*, Chiba, May 21-24, 2008 .

7) Okita H, Nakagawa A, Matsui J, Matsuoka K, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Kiyokawa N. Determination of MYCN Gene Amplification in Archival Neuroblastic Tumors by Chromogenic in situ hybridization . *Advances Neuroblastoma Research 2008*, Chiba, May 21-24, 2008 .

8) 恩田恵子, 清河信敬, 藤本純一郎, 宮川世志幸, 大喜多肇, 齋藤正博, 牧本敦, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 標準粒子を用いた小児急性白血病の末梢血残存白血病細胞数絶対値直接算定法. 第 18 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 28-29 日, 2008 .

9) 清河信敬, 加藤元博, 藤本純一郎, 宮川世志幸, 恩田恵子, 大喜多肇, 齋藤正博, 牧本敦, 真部淳, 康勝好, 小