

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球性白血病の 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

## 小児がんの中央診断と保存検体を活用したトランスレーショナルリサーチ

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

研究要旨： 小児がんのトランスレーショナルリサーチ推進を支えるためのバイオリソース形成を目的として、小児固形腫瘍の検体保存、急性リンパ性白血病（ALL）のマーカー中央診断および検体保存、急性骨髄性白血病の検体保存を行った。デジタル4カラーフローサイトメトリーを用いた自動測定システムを用いて、同一プロトコールで治療された小児 ALL 120 症例の治療8日目の末梢血残存白血病細胞絶対数を測定した。この検査は、小児 ALL の新たな治療層別化法として期待される。

### A. 研究目的

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

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

小児がんは、成人のがんと比較した場合、発生頻度としては非常に低く、症例数も少ない希少疾患であり、上記目的を達成するためには、全国的規模の臨床共同研究の枠組みの中で中央診断および検

体保存を行い、保存された臨床検体を有効に基礎研究に活用することが不可欠である。また、このようなシステムを構築することにより、基礎研究で得られた知見を診断・治療面で臨床へフィードバックすることが容易になり、トランスレーショナルリサーチの推進にも寄与するものと期待される。しかし、本邦においては、小児がんの登録システムさえも十分に確立されていないのが現状である。

そこで本研究では、種々の小児固形腫瘍および白血病・リンパ腫に対する中央診断と検体保存のシステムを構築するとともに、診断や治療層別化に応用可能な研究的検査法を開発して臨床に還元することを目指す。

### B. 研究方法

#### 1. 小児がんの中央診断と検体保存：

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

整備を行う。実地に即した登録方法、データおよび余剰検体試料の保管、匿名化管理、等の方法について、関係の担当者が協議、決定し、実際に実施して、その状況について確認、再検討を行った。

## 2. 末梢血残存白血病細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

末梢血液を正確に 200  $\mu$ l 分取し、FITC、PE、PC5、PC7 の 4 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる全血法の蛍光染色を行った。溶血後、細胞を正確に 200  $\mu$ l のシース液に浮遊させ、正確に 200  $\mu$ l 分取した検定済の蛍光標識ビーズ(Flow-Count)と混和後、Digital flow cytometry (FC-500, Beckman Coulter 社)を用いて 1 レーザー4 カラー解析を行った。

### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 1. 小児がんの中央診断と検体保存：

昨年度に引き続き、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として、小児腫瘍の中央診断と検体保存を行った。固形腫瘍に関しては、Ewing 肉腫 6 例、横紋筋肉腫 23 例、小児腎腫瘍 27 例の検体保存を行った。血液腫瘍等に関しては、急性リンパ性白血病 (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、急性骨髄性白血病 (AML) 新患 123 例、乳児白血病 10 例の検体保存を行った。また、治療中の ALL 61 件の骨髄微小残存白血病 (MRD) の検出を行った。

また、本年度は、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。現在のシステムでは、中央診断用の検体は各治療研究グループによって発行される登録番号と診断上必要な最小限の情報のみが付与され、個人情報は別途各グループのデータセンターで管理されている。

診断終了後、提供者の同意が得られた検体については、新たな匿名化番号が付与されて研究用に保存される。これに対して、保存検体の配分の際には、新たな整理番号を付与して研究者に送付することとした。この整理番号と各検体の匿名化番号との照合表は、検体保存センター内の情報管理者が一端管理し、各研究者が必要とする臨床データをデータセンターから受け取って、各整理番号に付与した後に、破棄することにより、研究者へ配分する検体を 2 重に匿名化することとした。

### 2. 末梢血残存白血病細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

昨年度確立した方法を用いて、同一プロトコールで治療された小児 ALL 120 症例の治療 8 日目の末梢血残存白血病細胞絶対数を測定した。CD10(+)B 前駆細胞性 ALL の場合は、もともと末梢血には同様の表面抗原発現パターンを示す細胞が存在しないため、残存白血病の識別が容易であり、高感度でその検出を行うことが可能であった。一方、CD10(-)B 前駆細胞性 ALL や T-ALL に関しては、検出が困難な場合があった。特に、T-ALL は芽球の抗原発現様式が必ずしも均一ではなく、マーカーのみではすべての芽球の検出が難しい症例も存在した。

## 考察

### 1. 小児がんの中央診断と検体保存：

小児がんの病理・分子診断と検体保存、ならびにその分配の実施するシステムについては、ほぼ整備が完了した。今後は、各小児がん治療研究グループに登録されない症例 (非参加施設の患者や、治療参加非同意例) や、希少腫瘍の症例について、どのように全国登録し、中央診断、検体保存を行うかという点について検討が必要である。

### 2. 末梢血残存白血病細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

近年、小児 ALL の新たな治療層別化因子としてステロイド反応性が着目されており、現行の ALL の治療では、診断確定後 7 日間ステロイドを単独投与し、8 日目

(Day-8)の末梢血中の白血病細胞絶対数を測定して、残存数が $\geq 1000/\mu\text{l}$ の場合は危険度が1段階上がる仕組みになっている。今回の見当により、フローサイトメトリーを用いた測定方法が、Day-8末梢血中芽球想定の高客観性の高い方法として有用であることが示された。しかし、一部の症例(CD10陰性例やT-ALL症例等)で、残存白血病細胞数の算定が困難な場合が存在することが明らかとなり、これらの症例に対する検出方法についての検討が必要である。また、今後、今回のフローサイトメトリーを用いた測定結果と同一症例について各施設で目視によって算出されたDay-8末梢血残存白血病細胞数と比較し、両者の相関性について検討を行う。

## E. 結論

小児がんの中央診断と検体保存、配分システムの整備を行い、実際に小児固形腫瘍の検体保存、白血病のマーカー中央診断および検体保存を行った。今後さらに、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指す。

小児ALL 120例について、治療8日目の末梢血残存白血病細胞の絶対数を、デジタル4カラーフローサイトメトリーを用いて測定した。今後、従来方による測定結果との比較を行い、その有用性についてさらに検討を進める。

## 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.* (in press)

- 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)

- 9) 藤本純一郎、堀江 弘. 小児腫瘍のグループスタディーと病理. *病理と臨床* 2008; 26(9) : 969-974.

### 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) 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.

- 4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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球性白血病の molecular karyotyping. 第70回日本血液学会総会, 京都, 10月10日-12日, 2008.

13) 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.

14) 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.

15) 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.

16) 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

## 小児がんの遺伝子変異解析

研究分担者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨： 近年の分子遺伝学の進歩による小児がん発症と進展の分子メカニズムの解明は、新規治療薬剤の開発につながる事が判明してきた。我々はこれまで小児の急性骨髄性白血病（AML）のAML99プロトコールにおける遺伝子解析結果と予後との関係を検討し、*FLT3*、*KIT*、*MLL*、*RAS*、*NPM1* 遺伝子と予後との関係を明らかにしてきた。今年度は *WT1* 遺伝子の発現に加え変異の検討を行った。また T 細胞型急性リンパ性白血病（T-ALL）細胞株 14 株と T-ALL 52 例と 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%）において変異を認め、*NOTCH1* 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。またどちらかの異常がみられた症例は予後良好であった。

### A. 研究目的

小児急性骨髄性白血病（AML）は染色体所見と予後との相関の他に、遺伝子異常と予後との関連が報告されている。我々はこれまで日本小児白血病治療委員会で行われたAML99プロトコールにより治療された150症例の遺伝子異常（*FLT3*、*KIT*、*MLL*、*RAS*、*NPM1* 遺伝子、*WT1* 遺伝子の発現解析）と予後との相関を明らかにしてきた。近年、正常核型のAMLで *WT1* 遺伝子変異が強力な予後因子となることが成人領域で報告された。今年度はAMLでは *WT1* 遺伝子の変異解析を行ない、予後との関係を検討した。

急性リンパ性白血病（ALL）の予後は著しく改善されたが、T細胞型ALL（T-ALL）は予後不良な例が多く、予後因子を見出すことは重要である。今年度は、ALLでは小児T-ALLの発症と進展に関与する遺伝子を明らかにし、今後の治療成績の向上に貢献するため、小児T-ALLとT-NHLにおける *NOTCH1* と *FBXW7* 遺伝子の変異と予後の関係を検討した。

### B. 研究方法

*WT1* 遺伝子は Wilms 腫瘍の原因となる

癌抑制遺伝子と考えられている。*WT1* 遺伝子の変異の解析は、白血病細胞株 16 株（AML 9 株、AMoL 5 株、AMKL 2 株）およびAML99プロトコールのAML臨床検体138例についてRNAを抽出し、変異の報告のある *WT1* 遺伝子の exon7-9 について、直接塩基決定法にて変異の有無を検討し、予後との相関について検討した。

T-ALLの遺伝子解析については、*NOTCH1* 遺伝子ではHDドメイン（エクソン26と27）、TADドメイン（エクソン34）、およびPESTドメイン（エクソン34）をwave DNA fragment分析システムを用いてスクリーニングし、ABI Prism 3100 遺伝子解析装置で塩基配列を決定した。*FBXW7* 遺伝子では、エクソン2からエクソン12の領域の塩基配列を同様に解析した。これらの結果と小児T-ALLの臨床像の相関を解析し、予後因子になるかどうかを検討した。

### （倫理面への配慮）

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

### C. 研究結果

AML 臨床検体における *WT1* 変異の頻度は解析可能であった AML 臨床検体 138 例中変異を認めた症例は計 8 例 (exon 7 5 例、exon 8 1 例、exon 9 2 例) で、exon 7, exon 8, exon 9 のいずれかに alternative splicing による欠失を認めた症例は計 23 例 (exon 7 10 例、exon 8 1 例、exon 9 9 例、exon 7 と exon 9 2 例、exon 8 と exon 9 1 例) であった。

T-ALL の解析では、T-ALL 細胞株 14 株と JACLS の T-ALL 52 例と T-NHL17 例で変異の解析を行い、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%) において *NOTCH1* 遺伝子の変異を認め、*NOTCH1* 遺伝子の変異をもつ群は有意に予後良好であった。*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。またどちらかの異常がみられた症例は予後良好であった。

### D. 考察

近年成人の AML で、*WT1* 遺伝子の変異のある症例は有意に予後不良であると報告された。我々は AML99 プロトコールの 150 例において、*WT1* 遺伝子変異の解析を行った。*WT1* 遺伝子の変異は、臨床検体の cDNA のみの解析では、解析対象領域に alternative splicing による exon の欠失を認める症例が多く、正確な変異の頻度は検索できなかったが、解析しえた範囲では、*WT1* 遺伝子変異を有する症例では有さない症例と比べ、*KIT* 変異を有する割合が有意に高かった。また、*WT1* 遺伝子変異を認める症例では、寛解導入率、無病生存率、全生存率が低い傾向がみられた。今後小児 AML における *WT1* 遺伝子変異の臨床的意義を検討するためには、より多数例での DNA を用いた解析が必要である。cDNA の解析でみられた、alternative splicing の意義は不明であり、今後正常検体との比較が必要であると思われた。

T-ALL における *NOTCH1* 遺伝子の検討では、*NOTCH1* 遺伝子変異を有する症例

は有意に予後良好であったが、*FBXW7* 遺伝子変異を有する症例は予後良好な傾向がみられたが、有意差はみられなかった。症例が少なかつたためと思われ、今後多数例の解析が必要と思われた。*NOTCH1* と *FBXW7* 遺伝子のいずれかに変異のみられた症例は有意に予後良好であり、今後の治療の層別化に用いることが可能であることが示唆された。

### E. 結論

AML99 における *WT1* 遺伝子変異の検討により臨床像との相関を明らかにした。

また T-ALL と T-NHL における *NOTCH1* と *FBXW7* 遺伝子変異の臨床的意義を検討した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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)
2. 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)
3. 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
4. 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
5. 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
  6. 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
  7. Tauchi 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 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
16. Shimada A, Kato M, Tamura K, Hirato J, Kanegane H, Takechi Y, Park MJ, Sotomatsu M, Hatakeyama S, Hayashi Y. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with uncontrolled inflammatory cytokinemia and chemokinemia which were caused by systemic anaplastic large cell lymphoma: A case report and review of the literature *J Pediatr Hematol Oncol* 30 : 785-787, 2008
  17. 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
  18. 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
2. 学会発表
1. 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
  2. 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
  3. 滝田順子、陳玉彦、加藤元博、山本豪、南谷泰仁、真田昌、菊地陽、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
  4. 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
  5. 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
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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
11. 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
  12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 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
  16. 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
  17. 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球性白血病の molecular karyotyping。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
  18. 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
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. 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
  23. 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

- 屋
24. 滝田順子、加藤元博、陳玉彦、大平美紀、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
25. 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
26. 城青衣、高橋広夫、嶋田明、月本一朗、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
27. 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
28. 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
29. 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
30. 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
31. 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
32. 陳玉彦、滝田順子、崔永林、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、間野博行、小川誠司：ALK 遺伝子の活性化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
33. 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
34. 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
35. 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得 無し
  2. 実用新案登録 無し
  3. その他 無し

## 小児がんの網羅的ゲノム解析による治療標的分子の探索

研究分担者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院 特任准教授

研究要旨： 神経芽腫は代表的な予後不良の小児固形腫瘍であり、多彩な臨床症状を示すが原因遺伝子はまだ同定されていない。そこで、神経芽腫の標的遺伝子を同定する目的で超高密度 SNP アレイ/CNAG/AsCNAR を用いて新鮮腫瘍 215 例、細胞株 24 株につき網羅的ゲノム解析を行った。その結果、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 のミス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。以上より、ALK は神経芽腫の標的分子であることが判明し、治療の標的になりうることを示された。

### A. 研究目的

神経芽腫は小児悪性腫瘍の中では白血病、脳腫瘍に次いで頻度が高い小児期の代表的な固形腫瘍である。約90%が4歳以下で発症し、原発は副腎もしくは腹部交感神経節であることが多い。本症は年長児の極めて予後不良なタイプから乳児の自然消退するタイプまで多彩な臨床症状を呈することから、複数の遺伝子異常やゲノム異常が発症に関与すると考えられている。従って、神経芽腫細胞がもつ遺伝子の質的および量的異常を解析することは、神経芽腫の発症分子機構の解明に結びつくことが期待される。

一方、最近の分子生物学的解析技術の進歩により、従来の腫瘍細胞に生じている個々の異常を対象に研究を進めてゆく手法から、膨大な遺伝子情報を高速にかつ網羅的に解析する手法が開発され、様々ながんの研究に応用されている。そこで本研究では、神経芽腫につき、12～25万個の SNP 特異的オリゴヌクレオチドアレイ(Affymetrix®Gene Chip® 250k および 500k array)を用いて、平均 5.4～24kb の解像度で腫瘍ゲノムに生じたコピー数の変化および LOH の解析を行う。腫瘍細胞において共通してみられるゲノム変異の解析から疾患特有の標的遺伝子を同定し、次世代分子標的薬の創生のための分子基盤を構築する。

### B. 研究方法

1. Affymetrix 社 250K/500K GeneChip microarray を用いたゲノム異常の網羅的探索：

検体としては、神経芽腫臨床検体 215 例、細胞株 24 株を用いた。腫瘍試料から抽出したゲノム DNA を適切な制限酵素で消化し、断端に共通のアプターを付加した後、PCR により増幅する。PCR 産物の精製後に DNaseI 処理によりさらに断片化し、biotin ラベルをした後、GenChip 50K/250K アレイ上でハイブリダイゼーションを行う。我々が開発した CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いてデータを分析し、平均解像度 24kb～6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数の解析を行った。

2. 標的遺伝子の同定と遺伝子性状の解析：

解析した腫瘍におけるゲノムコピー数の変化のうちホモ欠失、LOH、UPD、gain および amplification の共通領域内に存在する遺伝子(群)につき、FISH 解析、real-time PCR 解析を行った。また Heteroduplex mobility assay 法、直接塩基配列決定法による変異解析により、腫瘍化との関連性のさらなる検証を行った。さらに培養細胞とヌードマウスを用いて、標的遺伝子の性状解析を試みた。

#### (倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、東京大学の倫理審査委員会にて審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(2003年3月)」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

## C. 研究結果

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

新鮮腫瘍 215 例中 50 例が *MYCN* 増幅群であり、残り 165 例が *MYCN* 非増幅群であった。*MYCN* 増幅群、非増幅群に共通する最も高頻度なゲノム変異は 17q の増幅であった。これは全検体中 80% に検出された。また *MYCN* 増幅群では 1p の LOH が 60%、UPD が 27% であったのに対し、非増幅群では 1p の LOH が 24%、UPD が 12% であった。従来報告と同様に *MYCN* 増幅と 1p の LOH には有意な相関が認められた ( $P < 0.001$ )。染色体 2p、1q および 7q の増幅もそれぞれ全体のうち 58%、52% および 62% と高頻度に検出されたが、*MYCN* 非増幅群に頻度が高い傾向がみられた。ゲノム全体のコピー数が 2.5 コピー以上のいわゆる hyperploidy は stage 1-3 の症例に有意に集積して認められ、一方、non-hyperploidy 群は stage 4 と有意な相関が認められた ( $P < 0.001$ )。

### 2. 神経芽腫における高度増幅領域 :

ゲノムコピー数が 5 コピー以上の領域は高度増幅領域と定義されるが、しばしば腫瘍細胞では特定の領域の高度増幅が観察され、そこに存在する遺伝子の過剰発現ががん化に重要な役割を果たすこと知られている。今回の解析では、計 28 箇所の腫瘍特異的な高度増幅が検出された。この中で最も頻度が高い領域は *MYCN* 遺伝子を含む 2p24 であった。次に集積する高度増幅領域はすぐ近傍の 2p23 であり、新鮮腫瘍 5 例、細胞株 1 株で検出された。この領域の共通増幅領域は約 850kb であり、*ALK* 遺伝子が唯一存在することが判明した。*ALK* は、インスリン受容体ファミリーに属する膜貫通型チロシンキナーゼであり、成人の未分化大細胞性リンパ腫でみられる 2;5 転座により生じる融合遺伝子として同定されたがん遺伝子である。5q35 上の *NPM1* と融合することにより、チロシンキナーゼの恒常的活性を来し、その下流である *RAS/ERK*、*JAK/STAT* または *PI3K/AKT* 経路を活性化して細胞増殖を促進する。稀な固形腫瘍である inflammatory myofibroblastic tumor でも複数の相手遺伝子と転座を起こしていることが報告されており、また最近では、肺非小細胞がんの約 6% で 2p23 逆位により *EML4-ALK* 融合遺伝子が生じることが見出された。神経芽腫では従来から *RAS/ERK*、*JAK/STAT* および *PI3K/AKT* の活性化が細胞株で高頻度に生じていることが報告されており、*ALK* 経路は神経芽腫細胞の腫瘍化・悪性化の機序に重要と考えられる。そこで、

*ALK* が神経芽腫の発症に関与しているか否かの検討を行うこととした。

### 3. 神経芽腫における *ALK* 遺伝子の変異解析 :

神経芽腫における *ALK* の変異の有無に関して、計 239 検体の神経芽腫につき Heteroduplex mobility assay 法、直接塩基配列決定法による変異解析を行った。その結果、新鮮腫瘍 13/215 例 (6.1%)、細胞株 8/24 株 (33%) でミスセンス変異が検出された。このミスセンス変異の 11/13 個 (85%) は、キナーゼドメインに存在することが判明し、特にコドン F1174 と R1275 は変異が集中するホットスポットであることが見出された。キナーゼドメインに 3 箇所の変異部位が同定されたが、これの変異はいずれもキナーゼ活性に重要な activation loop に隣接して存在するために、変異が入ることにより activation loop 部位の構造的変化が生じる可能性が示唆された。また新鮮腫瘍で検出された 12/13 例 (92%) は stage 3、4 の進行例であった。7/13 例 (54%) は *MYCN* 増幅例、8/13 例 (62%) が死亡例であった。新鮮腫瘍で変異が検出された 13 例中 10 例で自己正常細胞の変異解析も行ったところ、1 例 (NT126) で germ line 変異 (T1087I) が検出された。興味深いことに 1 例 (NT074) には F1174L と R1275Q の 2 箇所の変異が検出されたがいずれも somatic 変異であった。

### 4. 変異 *ALK* の自己リン酸化と酵素活性 :

変異 *ALK* に過剰な酵素活性が生じているか否かを検討する目的で、kinase domain 内に検出された F1174 変異と kinase domain 外に検出された K1062 変異の 2 種類の発現ベクターを作製して、NIH3T3 に導入し自己リン酸化の検討を行った。その結果、変異 *ALK* を導入した細胞ではいずれも *ALK* の自己リン酸化が確認された。これに対し、野生型 (正常) *ALK* を導入した細胞では自己リン酸化が検出されなかった。次に変異 *ALK* の酵素活性を測定したところ、野生型 *ALK* に比べて変異 *ALK* はいずれも有意な活性上昇が検出された。更に、変異 *ALK* の自己リン酸化による下流分子への影響を検討したところ、下流分子である *AKT*、*ERK*、*STAT3* はいずれもリン酸化されていることが見出された。

### 5. 変異 *ALK* の造腫瘍性 :

変異 *ALK* を強制発現させた NIH3T3 細胞を軟寒天培地で培養し、コロニーの生成能の検討を行ったところ、正常 *ALK* を導入した細胞と比べて F1174L 変異、K1062M 変異を導入した細胞では共に有意にコロニーの増生が観察された。この

ことから、2種の変異 *ALK* は共に *in vitro* での造腫瘍性を有することが判明した。

さらに変異 *ALK* と正常 *ALK* を強制発現させた NIH3T3細胞をそれぞれマウスの腹腔内に接種して腫瘍の形成が起こるかどうかを検討した。その結果、正常 *ALK* を発現する細胞を接種してもマウスに腫瘍は形成されなかったが、*ALK* 変異を導入した細胞および陽性コントロールのいずれにおいても、腫瘍の形成が認められた。従って、両変異は共に *EML-ALK* と同様に *in vivo* で腫瘍を増殖させる能力を有することが示された。

#### 6. 変異 *ALK* の発現抑制による細胞増殖の変化：

次に *ALK* 特異的 siRNA を用いたノックダウン実験を行い、*ALK* の発現を抑制することによる細胞増殖への影響も検討した。F1174L 変異を有する細胞株(SK-N-SH)と野生型 *ALK* を発現する細胞株(LAN-2)に *ALK* 特異的 2重鎖 siRNA を導入し、細胞の増殖を観察した。*ALK* 特異的 siRNA により変異 *ALK* の発現が抑制された SK-N-SH 細胞では、明らかな細胞増殖の抑制が認められたが、野生型 *ALK* を発現する LAN-2 では *ALK* の発現を抑制しても細胞増殖の抑制はごく軽度であった。また未処理の細胞や非特異的な siRNA を導入した細胞では、*ALK* の発現に変化はみられず、増殖抑制も認められなかった。このことから、変異 *ALK* キナーゼの発現は神経芽腫細胞の増殖を促進していることが判明した。

#### D. 考察

神経芽腫における molecular allelo-karyotype 解析の結果、神経芽腫に最も特徴的なゲノム変異は17qの gain、*MYCN* 領域の増幅および1pの欠失で従来の報告通りであった。これらの異常をもたない腫瘍では1q、2p および7番染色体の gain が比較的選択的に生じていたことから、進行神経芽腫はゲノム上複数の subtype が存在する可能性が示唆された。本研究で神経芽腫における2p23領域の共通増幅領域に唯一 *ALK* が存在することが明らかとなった。この遺伝子は特に進行神経芽腫の約10%で変異もしくは増幅を生じていることが判明し、これらの異常により酵素活性の過剰を生じることが示された。さらに機能解析により *ALK* 変異は造腫瘍性をもつことが明らかとなり、以上の結果よりこの遺伝子は神経芽腫の新たな標的分子であることが示された。Kinase domain 内の変異と外の変異は共に自己リン酸化と酵素活性の上昇を示したが、

Kinase domain 内の変異(F1174L)の方がより強い反応が認められたことから、変異部位によって臨床的な悪性度に差がみられる可能性が示唆された。Mosse らは神経芽腫の1~2%にみられる家族性神経芽腫の家系でも *ALK* の germ line 変異を検出し、*ALK* は散発性のみならず家族性神経芽腫の標的分子の一つであることを明らかにした。これらの成果は、*ALK* の過剰な酵素活性を抑制することにより、難治性神経芽腫の新規治療薬を開発することができる可能性を示しており、*MYCN* の発見と並んで、基礎研究の成果を直接臨床分野に応用できる発見として非常に重要な意義をもつと言える。成長の過程にある小児期に強力な化学療法や放射線療法を受けることが、その後の成長発達に極めて重大な影響を与えることは明白である。従って、*ALK* 阻害剤のような正常組織への影響を最小限にとどめたかつ抗腫瘍効果が高い分子標的薬の開発こそ、小児がんの今後の治療に飛躍的な進歩をもたらすことが期待される。

#### E. 結論

本研究では神経芽腫の molecular allelo-karyotype を明らかにし、*ALK* が新たな神経芽腫の標的遺伝子であることを示し、治療の標的になりうることを判明した。膨大な遺伝子情報を高速にかつ網羅的に解析することができる超高密度オリゴヌクレオチドアレイは、有用なゲノム解析ツールであり、この手法を用いて、腫瘍の molecular allelo-karyotype を明らかにしてゆくことは、標的遺伝子の同定に多大な貢献をなすものと考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, Sanada M, Hemminki K, Yamatomo 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.
- 3) Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamatomo G,

Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*. 111:776-784, 2008.

## 2. 学会発表

1) 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. 50<sup>th</sup> ASH Annual Meeting Abstracts. 112:855-,2008.

20. 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 NFkB Pathway. 50<sup>th</sup> ASH Annual Meeting Abstracts. 112:807-,2008.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

## ゲノム・遺伝子発現情報からみた小児がんの臨床的特性の解明

研究分担者 大平 美紀 千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室 室長

研究要旨： Wilms 腫瘍、肝芽腫、神経芽腫などの難治性小児がんの臨床的特性に強く関わる分子的特徴を明らかにし、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、これらの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。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。神経芽腫のゲノムコピー数異常解析からは新たに ALK 遺伝子の異常が同定され、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。

### A. 研究目的

近年の化学療法の進展により、小児がんの予後は飛躍的に向上したものの、一部の小児がんについては十分な治療成績とはいえ、依然として予後不良である。また、治療後の生活の質を重視した治療戦略の選択は、小児がんの臨床においては特に重要であり、その観点からも腫瘍リスク分類システムの改良が急務である。

そこで本研究では、悪性度などの臨床的特性の異なる小児がん由来組織の遺伝子発現やゲノム異常等の分子プロファイルを検索し、背景にある分子的特徴を明らかにすることにより、治療標的の同定と腫瘍層別化による効率的な治療システムの構築に応用することを目的とする。小児がんに特化した独自の DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイルと、アレイ CGH によるゲノム異常の情報とを適切に組み合わせることにより、治療後の QOL 改善と治癒率向上を目標とした予後判別法の確立や新規リスク分類の提示を目指す。

### B. 研究方法

遺伝子発現解析には、合計約 34,000 クローンからなる Wilms 腫瘍、肝芽腫、神経芽腫の 3 種の小児がん由来のオリゴキャッピング cDNA ライブラリーより抽出された約 13,000 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、使用した。解析対象の凍結腫瘍組織から total RNA を調製し、品質確認を行った後、10 $\mu$ g を用いて Cy3, Cy5 色素による 2 色蛍光標識法によりプローブを作製し、チップへのハイブリダイゼーションを行った。各遺伝子の発現データから、患者予後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、独立サンプルを用いた再現性の確認を行った。

ゲノムコピー数異常の解析には、500ng のゲノム DNA を対象とし、ヒトオリゴマイクロアレイ（アジレント社）あるいは BAC アレイ（UCSF 製）を用いてアレイ CGH 法を行った。

遺伝子変異検索には、ゲノム DNA あるいは total RNA からの逆転写反応により合成した cDNA を鋳型とし、遺伝子特異的プライマーを用いて増幅した産物をダイレクトシーケンシング法で塩基配列を確認した。

#### （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、検体提供者の人権の擁護、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

BAC アレイを用いたアレイ CGH 解析によ



り、60 症例の肝芽腫におけるゲノムコピー数異常パターンを明らかにした。染色体毎の変化数と染色体内の変化数とをそれぞれプロットしたところ、肝芽腫では非常にコピー数変化そのものが非常に乏しいタイプと、異常が高頻度に蓄積しているタイプの2つに大別された。重要なことに、全症例におけるコピー数変化事象数の中央値で2群に分けると、コピー数変化が高頻度に起こっているパターンの症例は有意に予後不良であり、肝芽腫のゲノム異常パターンが予後に強い相関を示すことが判明した( $p < 0.01$ )。また、他の腫瘍との比較から、肝芽腫は例えば染色体内変化が高頻度に起こっている成人肝がんに比べ、異常のほとんどが染色体の腕レベルで生じていることが示された。

先行して行った小児がん特化 DNA チップを用いた肝芽腫 80 症例の遺伝子発現データについても、解析を進めた。統計解析により抽出した発現レベルが予後と強く相関することが予想される上位ランクの 100 遺伝子について、特異的プライマーを作製し、最初の解析に用いなかった独立の肝芽腫検体 16 例を用いて、RT-PCR による再現性の検証を進めた。再現性が示された遺伝子の中でも特にアレイ CGH により明らかになった欠失、増加が見られる染色体領域にマップされる遺伝子を中心に、定量 PCR などの詳細な解析および評価を進めている。さらに、予後不良傾向のあるゲノム異常に富むタイプの肝芽腫について、29 例と症例数は少ないものの、遺伝子発現データが予後をさらに判別可能かどうかを *log-rank test* により検討した。その結果、遺伝子発現によりさらに予後は分類された( $p < 0.01$ )。以上のことから、これらの遺伝子の発現パターンとゲノムコピー数異常パターンを組み合わせることで、新しいリスク分類の構築に応用できると考えられる。

神経芽腫については、同班員の小川ら、林らとの SNP アレイによるゲノム異常解析の共同研究により、進行神経芽腫において ALK がん遺伝子の増幅と遺伝子変異が新たに同定された。ALK 遺伝子変異は腫瘍細胞の増殖を亢進することが明らか

になり、今後臨床における神経芽腫のリスク分類、治療戦略の決定において、新たな展開が期待される。

#### D. 考察

肝芽腫において、遺伝子発現とゲノム異常の情報は、ともに予後に強く相関することが示された。実用化にはさらなるデータの蓄積と独立試験が必須であるが、抽出された遺伝子とゲノム情報を組み合わせることで、よりきめ細かいリスク分類へ展開できると期待される。特に、発現レベルに予後と相関が見られる上位の遺伝子群については、今後、感度、特異度、精度の観点からの評価を進める予定である。

神経芽腫で新たに見つかった ALK 遺伝子異常の臨床的意義については、今後さらに解析数を加え、遺伝子変異部位等の特徴と臨床特性との詳細な比較検討が必要である。分担研究者間で密に連携し、リスク分類システムへの適切な導入を目指したい。

#### E. 結論

小児がん特化型 DNA チップによる遺伝子発現解析とアレイ CGH 法によるゲノムコピー数異常を組み合わせることにより、効率よく進行がんの新たな分子標的の同定と、精度の高い腫瘍の層別化システムへの展開が可能であることが示された。本研究班で蓄積された質の高い小児がんの病理分類情報やバイオマーカー・予後因子などの情報と、臨床情報の整備体制と密に連携しながら、網羅的解析により収集した分子プロファイル情報を最大限に生かした腫瘍リスク分類構築を行っていきたい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Sakai R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 28: 662-73, 2009.
- 2) 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.
- 3) 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 A. Novel oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455: 971-4, 2008.
- 4) 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
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- signature. American Association for Cancer Research 99th Annual Meeting (AACR) 2008, San Diego, USA. April 12-16, 2008.
- 2) Ohira M, Oba S, Tomioka N, Nakamura Y, Isogai E, Kamijo 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.
- 3) Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Kamijo 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.
- 4) Ohira M, Kojima T, Oba S, Niwa T, Tomioka N, Nakamura Y, Isogai E, Kamijo 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.
- 5) 太平美紀、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.

#### 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

#### 2. 学会発表

- 1) 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

## 難治性小児がんの悪性度診断

分担研究者 中川 温子 国立成育医療センター 臨床検査部 病理診断科 医長

研究要旨： 難治性小児がんにおける腫瘍生物学的特性を指標とした悪性度診断を確立するために、悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫などの小児がんにおける中央診断システムを確立し、診断法の標準化を試みた。さらに細胞増殖・分化に関わる分子の発現解析を行い、従来の組織学的診断をさらに発展させた悪性度診断確立および分子標的療法の開発に向けた基礎データを得た。

### A. 研究目的

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

この課題を達成するためには、各小児がん疾患あるいは各症例の生物学的特性を分子レベルで明らかにしていくことが必要である。本研究では、包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）を通じて、難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報を明らかにし、その知見に基づいた新規診断・治療法開発を行う。特に、急速な進展や再発を繰り返す亜型の分子特性を明らかにし、QOL 改善を目標とした予後予知法確立や新規治療モデルの提示を目指す。これを支える基盤整備として中央診断と検体保存システムを確立して診断法の標準化や、臨床・基礎研究の推進を図る。さらに、従来の組織学的診断を補填するべく、難治性小児がんにおける腫瘍生物学的特性を指標とした悪性度診断を確立する。

### B. 研究方法

治療を効率的に開始するために、中央病理診断の迅速化を目的とした、Rapid

Review（2週間以内に報告）と Group Review（複数の専門病理医による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、悪性リンパ腫、横紋筋肉腫、神経芽腫の病理診断を行った。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。Epstein-Barr virus 関連リンパ増殖性疾患のなかで、本邦では特に T 細胞性リンパ増殖性疾患が問題となるため、悪性リンパ腫の免疫染色パネルに peripheral T-cell lymphoma を追加した。

悪性リンパ腫の悪性度診断について、従来の組織学的分類に従わない、細胞周期制御の異常をもとにした新分類が提案された（Blood 2003;101:1220-35）。この分類によると小児悪性リンパ腫も Low-growth fraction lymphomas、High-growth fraction lymphomas、Highly aggressive lymphomas の3つに分けられる。Highly aggressive lymphomas はサイクリンキナーゼインヒビターの不活化を背景にしており、p16<sup>INK4a</sup>-cyclinD-CDK4-Rb、p14<sup>ARF</sup>-MDM2-p53-p21<sup>CIP1</sup>、p27<sup>KIP1</sup>-cyclin E-CDK2 といった G1 期制御機構の異常を背景にしている。悪性リンパ腫（Burkitt リンパ腫 7 株；Ramos, Daudi, EB-3, Raji, Balm18, Namalwa, Balm24）、Anaplastic large cell lymphoma 4 株；SR-786, DEL, Su-DHL1, Karpas299）、神経芽腫（7 株；SK-N-RA, SK-N-SH, LA-N-5, SK-N-BE(2), NB39nu, SMA-KAN, SMS-KCNR）の細胞株について、western blot

法にて、細胞周期関連分子（Rb, phospho-Rb, p16, p21, p27）の発現について検討した。さらに p16<sup>INK4a</sup>-cyclinD-CDK4-Rb の異常を確認した Anaplastic large cell lymphoma 細胞株（DEL, Su-DHL1, Karpas299）を用いて Transporter peptide を用いた p16<sup>INK4a</sup> 細胞内分子標的療法の基礎的検討を行った。まず、ALCL 細胞 2 株（DEL, Su-DHL1）を 96 穴プレートに 5000/well の濃度で蒔き、p16<sup>INK4a</sup> ペプチドを添加し、37°C で 3 日間培養し、WST アッセイにて生細胞数を計測し、増殖抑制効果を検討した。

#### （倫理面への配慮）

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

### C. 研究結果

#### 1. 悪性リンパ腫中央病理診断システム（JPLSG）

悪性リンパ腫として登録された症例 368 例について Rapid Review による中央病理診断を行った（2004 年より通算）。Group Review が終了し、コンセンサス診断ができた症例は、271 例であった。下記のごとく、免疫組織化学染色を全例に施行した。組織型は、Diffuse large B-cell lymphoma 47 例、Burkitt lymphoma 55 例、Mature B-cell lymphoma 4 例、B-ALL 5 例、Precursor B lymphoblastic lymphoma 16 例、Precursor T lymphoblastic lymphoma 44 例、nonT nonB lymphoblastic lymphoma 3 例、Anaplastic large cell lymphoma (systemic) 72 例、Cutaneous anaplastic large cell lymphoma 7 例、Hodgkin lymphoma 6 例、Peripheral T cell lymphoma 1 例、EBV related lymphoproliferative disorders 2 例、Myeloid sarcoma 1 例、Biphenotypic leukemia 1 例で、検体不良で組織診断できなかった

症例が 1 例あった。2008 年は WHO 分類第 4 版が発行され、いくつかの新項目が策定されたが、この中の B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma に分類された症例が 6 例あった。

#### 鑑別診断のための免疫染色項目 悪性リンパ腫

病型	必須マーカー	追加マーカー
Mature B BL DLBCL	CD20 CD79a CD3 TdT MIB1	CD10 BCL2 BCL6 Mum1 (IRF4) EBER1 (ISH)
LBL T-LBL B-LBL	CD20 CD79a CD3 CD43 TdT MPO	CD56 CD99 CD10 CD7
ALCL	CD30 ALK1 and/or ALKc CD2,3,5 CD43 EMA TIA-1 / Granzyme B	CD15 CD79a, CD20 CD45RO CD56 LMP-1 BCL-2 EBER1 (ISH)
PTCL	CD3 CD4 CD8 TIA-1 / Granzyme B EBER1 (ISH)	CD56 BCL-2 CD123 CD1a

#### 2. 神経芽腫中央病理診断システム（JNBSG）

2008 年は 29 例（2006 年より通算 67 例）について中央病理診断システムにより、病理診断（INPC 病理国際分類）を行った。

67 例の内訳は、外科療法を大量化学療法に遅延させて行う局所遅延療法においては、Favorable Histology 2 例、Unfavorable Histology 9 例、高リスク群に対する標準的化学療法では、Favorable Histology 4 例、Unfavorable Histology 44 例、検体不良で Neuroblastoma, NOS と