

診断された例が 3 例、壊死組織で診断できなかった例が 2 例あった。組織型別では、Neuroblastoma 46 例 (undifferentiated, high MKI 2, poorly differentiated, low MKI 22, poorly differentiated intermediate MKI 4, poorly differentiated, high MKI 12, poorly differentiated, NOS 2, Neuroblastoma, NOS 3)、Ganglioneuroblastoma, intermixed 1 例、Ganglioneuroblastoma, nodular 5 例、Ganglioneuroma 1 例であった。

Neuroblastoma, undifferentiated subtype については、HE 染色のみでは鑑別診断が困難であるため、tyrosine hydroxylase, PGP9.5, synaptophysin, CD99, desmin, CD3, CD20, CD79a, TdT などの免疫組織化学染色を加えた。重要な予後因子である MYCN 遺伝子増幅については、パラフィン切片上でも一部の固定条件などが不良な切片を除いては、MYCN, 2p の良好なシグナルが得られ、MYCN 増幅 (4 copies 以上) についての判定を行うことができた。

3. 横紋筋肉腫中央病理診断システム (JRSG)

2008 年登録症例 38 例および登録外 2 例について中央病理診断システムにより、病理診断を行った。HE 染色に加え、免疫組織化学染色 (desmin, MyoD1, myogenin) を全例に施行した。組織型別では、Embryonal rhabdomyosarcoma 14 例、alveolar rhabdomyosarcoma 13 例、Mixed alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma 1 例、Mixed embryonal rhabdomyosarcoma NOS (not otherwise specified) and spindle cell embryonal rhabdomyosarcoma 2 例、rhabdomyosarcoma, NOS 2 例、Non-rhabdomyosarcoma 8 例であった。

FKHR 遺伝子増幅については、パラフィン切片上でも一部の固定条件などが不良な切片を除いては、良好なシグナルが得られ、FKHR 遺伝子転座についての判定を行うことができた。

4. 細胞周期関連分子の発現と p16^{INK4a} 細

胞内分子標的療法の基礎的検討について

Burkitt リンパ腫 7 株においては、全て p16^{INK4a} 発現がなく、Rb/phospho-Rb は過剰発現の傾向がみられた。P21, p27 発現については細胞株の間でばらつきがあり、一定の傾向を示さなかった。ALCL 4 株においては、1 株 (Su-DHL1) を除いて p16^{INK4a} 発現がなく、Rb/phospho-Rb, p27 は全株で発現していた。神経芽腫 7 株においては、1 株 (SMS-KCNR) を除いて p16^{INK4a} 発現がなく、p27 は全株で発現が認められた。

ALCL 細胞 2 株 (DEL, Su-DHL1) に輸送体ペプチドと p16^{INK4a} 機能性ペプチドを混合して複合体を形成させ、培養液中へ添加後、37°C で 3 日間培養し、WST アッセイにて生細胞数を計測した。ペプチド導入後 72 時間の時点での増殖抑制率は 8 μM 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。

D. 考察

悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫の中央病理診断システムは確立し、標準的診断法も免疫組織化学染色パネルを含め統一できた。それぞれの小児がんにおいて、典型的な病理組織像や免疫形質を示さない症例についてさらに詳細な生物学的特性の検討を加えることにより、新規病型や予後予測因子の抽出が今後は可能と思われる。

横紋筋肉腫の中央病理診断では、Non-rhabdomyosarcoma とされた症例が 20% あり、rhabdomyosarcoma の診断の難しさと病理診断均てん化の必要性が明らかとなった。

パラフィン切片を用いた FISH 法による MYCN 遺伝子増幅や FKHR 遺伝子転座の判定は概ね容易であり、凍結組織が得られない症例でもこれらの遺伝子の検索が可能であった。

Burkitt リンパ腫、anaplastic large cell lymphoma、神経芽腫については、細胞株における予備実験から、これらの腫

瘍に共通して p16^{INK4a} 発現がみられないことが判明した。従来遺伝子導入が困難とされているリンパ腫・白血病などの血液系悪性腫瘍に対する分子標的療法として、たんぱく分子捕捉ドメインと細胞内浸透性ドメインよりなる輸送体を用いた新しいペプチド・タンパクの細胞内導入システムが開発されたており、今回このシステムを用いた p16^{INK4a} ペプチド導入実験を行った。ALCL 細胞株において、輸送体ペプチドと p16^{INK4a} 機能性ペプチドの複合体を添加後 72 時間で、有意な増殖抑制効果が認められた。現在、マウス ALCL xenograft への p16^{INK4a} 機能性ペプチド導入による in vivo での増殖抑制効果を検討中である。さらにそれぞれの症例での発現解析や動物モデルを用いた腫瘍発生や腫瘍進展の検討により、細胞周期関連分子の小児がんの病態における意義の究明や分子標的療法の可能性を追求していく予定である。

E. 結論

難治性小児がん（悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫）の中央病理診断システムおよび標準的診断法の確立はほぼ達成できた。今後さらに分子レベルでの生物学的特性について解析を進め、悪性度診断に有用な特性を明らかにし、分子標的療法など治療開発に向けた検討を試みる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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]

4) Ando K, Takenobu H, Nakagawa A, Ohira M, Kamijo T, 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(9):2087-2094, 2008

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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・胚細胞腫瘍」 *病理と臨床* 26(9):938-944, 2008

2. 学会発表

1) Nakagawa A. Advanced Neuroblastoma Research 2008 「MYCN amplified Neuroblastoma with Favorable Histology」 Chiba, Japan 5月22日 2008.

2) 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- EBVとの関連について-」 松本 9月6日 2008.

3) 恩田恵子、清川信敬、藤本純一郎、斉藤正博、大喜多肇、梶原道子、福島敬、犬飼岳史、牧本敦、真部淳、康勝好、中川温子、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(TTCSG)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日 2008.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

6) 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.

7) 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.

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

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

研究分担者 森 鉄也 国立成育医療センター 第一専門診療部 血液腫瘍科 医長

研究要旨： 小児急性リンパ性白血病（ALL）に対する前方視的多施設共同治療研究である東京小児がん研究グループ（TCCSG） ALL L07-16-02 登録例を対象として、ALL に対する薬物治療の効果、毒性の個体差と薬物代謝関連分子の遺伝子多型の関連を検証する研究計画を立案した。小児 ALL において治療反応性との関連が報告されている *TS*、および *GST* 遺伝子多型のスクリーニング解析系を準備し、各種細胞株を用いて予備解析を行った。本報告書作成時点まで TCCSG 研究審査委員会による審査結果は未着で臨床研究の開始には至っていない。

A. 研究目的

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

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

差と薬物代謝関連遺伝子多型の関連を解明する。

B. 研究方法

1) 対象

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

2) 試料

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

3) 解析対象遺伝子

小児 ALL に対する薬物治療では、一般に、プレドニゾン（PSL）、ビンクリスチン（VCR）、シクロホスファミド（CY）、アントラサイクリン系薬剤（ANTs）、メトトレキサート（MTX）、メルカプトプリン（6MP）などの薬剤が使用されることから、以下の遺伝子群が解析対象候補である（各遺伝子に関する詳細は 2007 年度報告書に記載）。

glutathione S-transferase (GST), *solute carrier (SLC)*, *dihydrofolate reductase (DHFR)*, *thymidylate synthase (TS)*

methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), thiopurine S-methyltransferase (TPMT), ABC transporters, CYP, aldehyde oxidase, xanthine oxidase (XO), hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), CR, AKR, NR3C1, FPGS, GGH, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFRD1), methionine synthase (MS), serine hydroxymethyltransferase (SHMT), transcobalamin2 (Tc2), cystathionase, cystathionine-β-synthase, cyclin D1 (CCND1), inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase), VDR, NQO1.

4) 解析方法

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

(倫理面への配慮)

TCCSG ALL07-16-02 研究への参加者の中から、自由意思により本研究に参加する者のみを研究対象とする。本研究の対象である患者は未成年者であるため、担当医は代諾者からインフォームドコンセントを取得する。また、患者が研究参加の決定等の意志を表すことができる場合は、法的な資格のある代諾者からの同意の他、さらに未成年者である患者の意志を確認する。TCCSG ALL07-16-02 研究登録患者には TCCSG データセンターから登録番号が付与され、登録患者の個人情報患者診療施設から外部に知られることはない。対象患者から採取された検体、臨床情報を示すフローシートには登録番号のみが添付される。したがって、本研究の担当者・関係者が対象患者の個人情

報を知り得る機会はない。検体提供患者の診療施設において、TCCSG ALL07-16-02 研究、および本研究の倫理審査が行われ、承認されていることを必須とする。本研究に提供される検体は末梢血 5ml のみである。本研究の遺伝子解析の結果は、現時点で対象患者の治療を変更するための明確な根拠にはなり得ず、対象患者の治療に介入するものではない。したがって本研究が対象患者の治療に危険を及ぼすことはない。

C. 研究結果

1) TCCSG ALL L07-16-02 付随研究手続き

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

2) TS、および GST 遺伝子多型のスクリーニング解析の整備

小児 ALL において治療反応性との関連が報告されている TS、および GST 遺伝子多型のスクリーニングによる検出を目的とした予備実験を行った。TS 遺伝子におけるプロモーター領域の繰り返し配列の回数 (2/3 回) による多形の検出、GST 遺伝子における GST-T1 および MI 遺伝子の欠失による多型の検出を、異なる免疫表現型の ALL、および急性骨髄性白血病、神経芽腫細胞において試みた。

【方法】B 前駆細胞性 ALL、成熟 B 細胞

性 ALL、T-細胞性 ALL、急性骨髄性白血病、神経芽腫を含む、種々の細胞株から、PureLink Genomic DNA 抽出キット (Invitrogen 社) を用いてゲノム DNA を抽出した。各 100ng の DNA をテンプレートとして、以下に示すプライマーを用いて、TS および GST 遺伝子、および内部対照としての β -globin 遺伝子の PCR による増幅を行った。

hTS-1(F): 5' fgtggctcctcgcttcccc-3'
 hTS-2(R): 5' f ccaagcttgctccgagccggccacagggcatggcggg-3'
 GST M1-G5(F): 5' f gaactccctgaaaagctaaagc-3'
 GST M1-G6(R): 5' f gtgggctcaaatatacgggtgg-3'
 GST T1-T1(F): 5' f ttcttactgtcctcacatctc-3'
 GST T1-T2(R): 5' f tcaccgatcatggccagca-3'
 β -globin GH20(F): 5' - gaagagccaaggacaggtac-3'
 β -globin PC04(R): 5' - caacttcatccacgttacc-3'

PCR の条件は、94 度 1 分、60 度 1 分、72 度 2 分のサイクルを 30 回繰り返した。PCR 産物各 2.5 μ l をとり、1.5%アガロースゲル上で泳動したのち、UV で可視化して、増幅された遺伝子断片の確認を行った。

【結果 TS 遺伝子】Thymidylate synthase (TS; N5,N10-methylenetetra hydolate: dump C-methyltransferase; EC 2.1.1.45) は deoxyuridylate を thymidinlate に変換する酵素であり、がん細胞中の TS 蛋白の発現量が高いほど、特定の抗腫瘍剤が効き難いことが明らかとなっている。また、TS 蛋白の遺伝子発現に関して、プロモーター領域の cap サイトの下流に存在する繰り返し配列に多形が存在し、この配列が 2

回の場合 (Short type, 本邦における多形率 19%) と 3 回の場合 (long type, 同 81%) があり、後者の方が TS 蛋白の遺伝子発現が高いことが報告されている。今回、種々の小児がんの細胞株における上記 TS 遺伝子の多形について PCR により解析を行った結果、この PCR 解析が同遺伝子の多形検出に非常に有用であることが明らかとなった。また、B 前駆細胞性 ALL は、全例いずれか片方の多形のホモ形質であることが明らかとなり、NALM-17 および KM-3 が short type、NALM-6 と HPB-NUL が long type であった。成熟 B 細胞型 (バーキット型) ALL では、検討した 5 株中、NAMALWA のみ hetero 形質であり、他の 4 株 (BALM-18, -24, EB-3, P32/ISH) 株から増幅された遺伝子断片は単一であったが、後者はいずれも Short type と long type の中間の泳動度を示した。従来報告されているもの以外の多形が存在する可能性について検討する必要があると考えられ、またこれらの株がどのような薬剤感受性の傾向を示すのか興味もたれる。一方、神経芽腫細胞 7 株の検討では、hetero 4 株および Short type1 株、long type2 株、と多様であった。

【結果 GST 遺伝子】種々の腫瘍細胞株を用いて、GST-T1 および-M1 遺伝子の PCR 検出を行い、同遺伝子の欠失のスクリーニング法として、この PCR 法が適していることを確認した。腫瘍細胞株における GST の発現については、骨髄単球系白血病の細胞株で GST 遺伝子の欠失率が非常に高く、4 株中 3 株が双方のアイソフォームを欠失しており、残る 1 株も GST-M1 のみの発現であった。これに対して、他の白血病および神経芽腫株では、双方を発現している率が高く、双方の欠失を認めたのは、B 前駆細胞性 ALL、成熟 B 細胞性 ALL 双方でそれぞれ 1 株であった。この GST 欠失の傾向が、骨髄単球系白血

病が株化する過程で、何らかのバイアスがかかるためなのか、あるいは骨髄単球系白血病細胞がもともと有する特性なのか、興味もたれる。また、腫瘍細胞における GST の欠失が、単純に体細胞の多型を反映した結果なのか、あるいは腫瘍細胞になる過程での付加的な遺伝子変異に伴って欠失が起こる可能性はないのか、といった点についても、今後検討を行いたい。

D. 考察

薬物代謝関連分子の遺伝子多型の頻度は人種により異なることが知られている。また、ALL に対する化学療法は多剤併用で行われることから、それぞれの治療レジメンに特異的な効果、毒性を生じ得ると考えられ、薬物代謝関連分子の遺伝子多型との関連も治療レジメンにより異なる可能性が推測される。現在、国内の小児 ALL の約 1/3 に適用されている TCCSG ALL 治療研究において薬物代謝関連分子の遺伝子多型と治療効果、毒性の関連の検証を行うことは、今後の ALL 治療開発において重要な意義を持つと考えられる。

大部分の小児がん臨床研究は、疾患の頻度、診療施設の受け入れの問題から多施設共同研究として行われている。これまで、国内の多施設共同小児がん臨床研究において、前方視的な胚細胞系列の遺伝子解析研究は行われていない。本研究は、小児がん領域における胚細胞系列遺伝子解析研究の基盤整備にも貢献するものと考えられる。

E. 結論

小児 ALL に対する前方視的多施設共同治療研究である TCCSG ALL L07-16-02 を利用して、ALL に対する薬物治療における効果、毒性の個体差と薬物代謝関連分子の遺伝子多型の関連を検証する研究計画を立案し準備を進めている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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

2. 学会発表

1) 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.

2) 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細胞組織球症の骨髄評価. 臨床病理 56 巻補冊 Page182, 2008

3) 森鉄也, 熊谷昌明, 中川温子, 黒田達夫, 森川信行, 大喜多肇, 清河信敬, 清谷知賀子, 塩田曜子, 正木英一, 藤本純一郎 : 守る会助成課題 国立成育医療センターにおける公開小児がん系統講義の試み. 小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page426, 2008

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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

11) 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. 小児がん 45 巻プログラム・総会号 Page226, 2008

12) 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

13) 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, 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球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

14) 恩田恵子, 清河信敬, 藤本純一郎, 宮川世志幸, 大喜多肇, 森鉄也, 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.

Cytometry Research, 18 巻 Suppl. Page69, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

難治性小児がんの臨床的特性の解析と新規診断・治療法開発

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

研究要旨： 難治性小児がんの一つである Ewing 肉腫において 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。DKK ファミリーは Wnt シグナルを制御する分子であるが、Ewing 肉腫では DKK2 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。これらの結果より、DKK1/DKK2 が Ewing 肉腫の腫瘍発生に関わることが示唆された。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

特に Ewing 肉腫や他の小児腫瘍のトランスクリプトーム解析により、キメラ遺

伝子の標的遺伝子の候補と考えられた DKK1、DKK2 遺伝子の解析を進めた。DKK1 あるいは DKK2 の上流の転写調節領域をルシフェラーゼの上流に結合させたレポーターベクターと EWS/FLI1 あるいは EWS/ERG の発現ベクターを 293 細胞に同時に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行い、EWS/ETS が DKK1/2 の転写を調節するかどうか検討した。さらに DKK2 の上流の領域の欠失変異体により、転写調節に重要な領域を決定した。

クロマチン免疫沈降法により EWS/ETS と DKK2 転写調節領域が結合しているかどうか検討した。まず 293 細胞に flag タグを付加した EWS/FLI1 を導入・発現させた。細胞をホルムアルデヒドで固定したのち細胞を溶解、核をからの抽出物を、超音波で破碎、抗 flag 抗体で flag-EWS-FLI1 が結合したクロマチンを免疫沈降した。DKK2 の ETS 結合領域に特異的な PCR を行った。同様に Ewing 肉腫細胞である SK-ES1 細胞と抗 FLI1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った。

骨髄間葉系前駆細胞 3 種類と Ewing 肉腫細胞 3 種類で、RT-PCR 法にて DKK1/2 の発現を解析した。また、UET-13 骨髄間葉系前駆細胞に EWS/FLI1 を発現させ、あるいは、SK-ES1 細胞に DKK1 または DKK2 発現ベクターを導入し、DKK1 と DKK2 の発現量を定量 PCR で解析した。

DKK1/2 の腫瘍発生における機能を解析するために DKK1、DKK2 導入 SK-ES1 細胞

をヌードマウスの背部皮下へ移植し、腫瘍形成の有無、腫瘍径を測定した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

昨年度までに、Ewing 肉腫、神経芽腫、その他の小児腫瘍細胞のトランスクリプトーム解析より同定された Ewing 肉腫特異的高発現分子 DKK2、低発現分子 DKK1 の解析を行った。DKK は Dickkopf family に属する分泌型の分子で、Wnt シグナルを抑制することが報告されている。DKK family には DKK1 - DKK4 の 4 種類の分子が確認されているが、まず、Ewing 肉腫で高発現である DKK2 について解析を行った。

DKK2 転写調節領域を用いたルシフェラーゼアッセイの結果、EWS/FLI1、EWS/ERG、EWS/E1AF のすべてが、DKK2 の転写調節領域を活性化すること、欠変異体を用いた検討により、2 箇所の ETS 認識配列が転写活性化に重要であることを明らかにした。さらに、クロマチン免疫沈降法を行った結果、EWS/FLI1 を発現させた 293 細胞では、EWS/FLI1 が DKK2 の転写調節領域に結合すること、EWS/FLI1 を有する Ewing 肉腫細胞である SK-ES1 でも、EWS/FLI1 が DKK2 の転写調節領域に直接結合していることが明らかとなった。以上より DKK2 が EWS/ETS によって転写を調節される標的遺伝子であると考えられた。

一方、Ewing 肉腫で低発現である DKK 1 についてもルシフェラーゼアッセイを行ったが、明らかな EWS/ETS による DKK1 プロモーター活性の増強は見られなかった。

更に、骨髄間葉系前駆細胞と Ewing 肉腫細胞で DKK1/2 の発現を解析したところ骨髄間葉系前駆細胞では DKK1 高発現、DKK2 低発現、一方、Ewing 肉腫細胞では DKK1 低発現、DKK2 高発現であり、全く反対のパターンを示した。また、骨髄間葉系前駆細胞に EWS/FLI1 を発現させると DKK2 が発現上昇するのみならず DKK1 が発現低下した。また、SK-ES1 細胞に DKK1 または DKK2 を導入したところ、DKK1 発現株

では DKK2 の発現が低下し、DKK2 発現株では、DKK1 の発現が低下した。以上のように DKK1 と 2 は相互排他的な発現パターンを示した。

DKK1 と DKK2 の Ewing 肉腫発生における役割を解析するために DKK1 あるいは DKK2 を過剰発現する SK-ES1 細胞を作製した。DKK1 を過剰発現する SK-ES1 細胞をヌードマウスへ移植したところコントロールと比較して腫瘍形成が顕著に抑制された。一方、DKK2 過剰発現 SK-ES1 細胞では有意な変化を認めなかった。

D. 考察

EWS/ETS キメラ遺伝子は、Ewing 肉腫において、転写因子として機能することにより腫瘍発生において重要な役割を演じていると信じられている。今までに Id2、Nkx2.2、TGF-beta receptor などの標的遺伝子が発見されているが、われわれは DKK2 を新たな標的遺伝子として付け加えた。EWS/ETS により多数の標的遺伝子の発現が上昇あるいは低下し、その結果、間葉系の細胞が腫瘍化すると想定され、DKK2 も腫瘍発生に関わっていると考えられる。一方、DKK1 は EWS/ETS によって発現が低下することが示されたが、DKK2 と異なって、直接的な転写調節は受けていないようである。その機序は今後の検討課題であるが、EWS/ETS による DKK2 の過剰発現が DKK1 の発現抑制を介して、間葉系細胞の腫瘍化に機能を果たしている可能性が示唆された。

これらの結果から DKK1、DKK2 が治療標的分子となりうると考えられ、今後更に治療応用の可能性を検討したい。

E. 結論

Ewing 肉腫特異的キメラ遺伝子 EWS/ETS が発現を調節する分子として DKK1、DKK2 を同定し、DKK2 が EWS/ETS の直接の標的分子であることを明らかにした。また、DKK1 過剰発現が Ewing 肉腫の造腫瘍能を低下させることから DKK2 が DKK1 の発現抑制を介して、Ewing 肉腫の腫瘍発生に関わることが示唆された。

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) 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.
- 7) 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

2. 学会発表

- 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. 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Nakagawa A, Matsuoka K, Okita H. MYCN-Amplified Neuroblastoma with Favorable Histology. *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 Y, 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) 春田 雅之, 笠井 文生, 大喜多 肇, 福澤 正洋, 金子 安比古. WTX の欠失は日本人ウィルムス腫瘍において頻繁に生じる. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10月28日-30日, 2008.
- 12) 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 .

13) 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 .

14) 越永 従道, 北野 良博, 大植 孝治, 齋藤 正博, 大喜多 肇, 金子 安比古, 田中 祐吉, 陳 基明, 中舘 尚也, 野崎 美和子, 秦 順一, 樋之津 史郎, 堀江 弘, 麦島 秀雄, 福澤 正洋. 日本ウィルムス腫瘍スタディグループ中央病理診断の確定した両側性腎腫瘍の検討. 第 24 回日本小児がん学会, 千葉, 11 月 14-16 , 2008

15) 春田 雅之, 渡辺 直樹, 大喜多 肇, 秦 順一, 堀江 弘, 福澤 正洋, 金子 安比古. 日本人 Wilms 腫瘍において WTX 欠失は WT1 異常と合併するが CTNNB1 変異とは合併しない. 第 24 回日本小児がん学会, 千葉, 11 月 14-16 , 2008 .

16) 大島 淳二郎, 春田 雅之, 渡辺 直樹, 金子 安比古, 樋之津 史郎, 越永 従道, 秦 順一, 堀江 弘, 田中 祐吉, 大喜多 肇, 陳 基明, 中舘 尚也, 齋藤 正博, 北野 良博, 野崎 美和子, 大植 孝治, 福澤 正洋. がん抑制遺伝子 RASSF1A のメチル化はウィルムス腫瘍の新しい予後因子である. 第 24 回日本小児がん学会, 千葉, 11 月 14-16 , 2008 .

17) 中島 英規, 巽 国子, 太田 百絵, 豊田 雅士, 宮川 世志幸, 大喜多 肇, 片桐 洋子, 梅澤 明弘, 清河 信敬, 藤本 純一郎. 新たに確立した質量分析装置を用いた糖脂質相対定量法による間葉系前駆細胞の試験管内分化に伴う糖脂質の発現変化の解析. 第 81 回日本生化学会大会, 神戸, 12 月 9 日-11 日, 2008 .

18) 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 .

19) 廣山 眞巳, 坂 本るり子, 小澤 ふじ子, 宮川 世志幸, 金井 彰彦, 窪田 宣夫, 清河 信敬, 大喜多 肇, 梅澤 明弘, 宮崎 達也, 宮内 聡, 田中 覚. ナノカルチャープレートを使用した初代前駆

脂肪細胞の三次元培養. アディポサイエンス研究会シンポジウム, 大阪, 12 月 22 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

研究分担者 横澤 敏也 独立行政法人国立病院機構 名古屋医療センター
臨床研究センター 血液・腫瘍研究部 病因・診断研究室 室長

研究要旨：小児急性骨髄性白血病の診断時の検体を用いたキメラ遺伝子のスクリーニングを行った結果、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。急性骨髄性白血病の代表的な染色体異常である t(8;21)によって生じる AML1-ETO のキメラ遺伝子は233例中63例（26.2%）にみとめられ、欧米に比較して頻度が高かった。このキメラ遺伝子を利用した治療後の微小残存病変の解析では、治療初期の AML1-ETO のキメラ遺伝子の発現レベルの推移には多様性がみられ、治療反応性の指標としての有用性を検討中である。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

診断時の骨髄液あるいは末梢血の有核細胞からRNA抽出を行い、定量的RT-PCR法によって急性骨髄性白血病での代表的な8種類のキメラ遺伝子（AML1-ETO、CBF β -MYH11、MLL-AF6、MLL-

AF9、MLL-ELL、TLS/FUS-ERG、PML-RAR α 、NUP98-HOXA9）の測定を行った。治療後のMRD解析では、全て骨髄液からRNAを抽出し、該当症例で陽性のキメラ遺伝子の発現を定量した。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

診断時に施行したキメラ遺伝子スクリーニングにおいては、現在までに解析した233例中103例（44%）にいずれかのキメラ遺伝子が検出された。その内訳は、AML1-ETO 63例、CBF β -MYH11 14例、MLL-AF6 1例、MLL-AF9 19例、MLL-ELL 3例、TLS/FUS-ERG 1例、PML-RAR α 2例であった。NUP98-HOXA9は1例も検出されなかった。

治療後のキメラ遺伝子の経時的なモニタリングを行うMRD解析には、診断時のスクリーニングでキメラ遺伝子が陽性の症例から33例が登録され、116検体の解析を行った。33例中24例がAML1-ETO陽性の症例であり、現時点で10例以上の経時的な検討が可能であった。AML1-ETOの診断時のRNA1 μ gあたりの発現量は中央値で5.5 x 10⁵コピー（範囲；5.9 x 10⁴～1.4 x 10⁶コピー、n=24）であった

が、寛解導入療法 1 コース後では、中央値 2.6×10^3 コピー（範囲； $1.2 \times 10^2 \sim 9.1 \times 10^5$ コピー、 $n=20$ ）、寛解導入療法第 2 コース後では、中央値 1.5×10^3 コピー（範囲； $0 \sim 1.3 \times 10^5$ コピー、 $n=20$ ）、強化療法 1 コース後では、中央値 6.0×10^2 コピー（範囲； $0 \sim 1.0 \times 10^4$ コピー、 $n=18$ ）であった。寛解導入療法第 1 コース後の MRD は治療前に比しておよそから 200 分の 1 に減少しているが、症例間での差が大きくみられた。寛解導入療法第 2 コース以降の MRD は緩徐な低下を示す傾向がみられた。また治療終了時点で MRD が検出感度以下であった症例は 11 例中 4 例のみであった。

D. 考察

現在までに小児 AML と新規に診断された 233 例のキメラ遺伝子スクリーニングを行い、63 例において $t(8;21)(q22;q22)$ の染色体異常の結果として形成される AML1-ETO のキメラ遺伝子が検出された。その頻度は約 26% であり、欧米の報告と比べて高い傾向にあると考えられるが、これは成人においても同様の傾向にある。キメラ遺伝子での診断結果と染色体分析結果との比較を行う必要があり、今後の検討課題である。

また AML1-ETO のキメラ遺伝子を対象にした MRD の解析では、寛解導入療法終了時の MRD の残存の程度には症例間でのばらつきがみられるため、個々の症例における治療反応性を判定する指標として用いることが可能であるか、現在も解析を継続中である。成人での AML1-ETO の MRD に関する後方視的な検討でも、やはり、個々に MRD の推移には違いがみられていたが、予後との関連については、本研究のように均一な治療法での検討が必要と考えている。小児 AML では高い完全寛解率を得られるため AML1-ETO 以外のキメラ遺伝子も含めて MRD の検討により、寛解例での治療反応性を更に分類することができれば、予後判定への応用が期待される。

E. 結論

小児 AML 233 例の診断時のキメラ遺伝子スクリーニングにより、AML1-ETO を代表とする主要なキメラ遺伝子が 44% の症例で陽性であった。今後は染色体分析との比較を行い、その頻度をより明確にする。またこのキメラ遺伝子を利用した MRD の解析により、AML1-ETO 陽性例で

は経時的な AML1-ETO の減少様式に多様性がみられる。今後も解析を続け、予後との関連について検討する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) 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。
2) 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。
3) 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
清河信敬	新たな治療の取り組み.	森 鉄也	小児癌：MDアンダーソン癌センターに学ぶ癌診療	シュブラインガー・ジャパン	東京	2008	135-144
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	小児白血病診療	中山書店	東京	印刷中	
大平美紀、 中川原章	第4章 DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用への実際 2.個別化医療 5)神経芽細胞腫	油谷浩幸	遺伝子医学 MOOK 10号 DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用の実際	メディカルドゥ	大阪	2008	321-7
中川温子	造血器・小児病理		研修医のための病理マニュアル	診断と治療社	東京	2008	130-137

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyagawa Y, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. 他 8 名	Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells.	Mol Cell Biol.	28(7)	2125-2137	2008
Saito Y, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. 他 8 名	B-cell-activating factor inhibits CD20-mediated and B-cell receptor-mediated apoptosis in human B cells.	Immunology.	125(12)	570-590	2008
Shiozawa Y, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. 他 5 名	Human Osteoblasts Support Hematopoietic Cell Development in vitro.	Acta Haematologica.	120(3)	134-145	2008
Miyagawa Y, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. 他 3 名	EWS/ETS regulates the expression of the Dickkopf family in Ewing's family tumor cells.	PLoS ONE.	4(2)	e4634-e4645	2009
Kitamura N, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. 他 4 名	The expression of granulysin in systemic anaplastic large cell lymphoma in childhood.	Leukemia Research.	(in press)		
Park MJ, Hayashi Y. 他 6 名	FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia and T cell non-Hodgkin lymphoma.	Brit J Haematol	(in press)		
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)		

Kawamura M, Kaku H, Taketani T, Taki T, Shimada A, <u>Hayashi Y.</u>	Mutations of GATA1, FLT3, MLL-partial tandem duplication, NRAS, and RUNX1 genes are not found in a 7-year-old Down syndrome patient with acute myeloid leukemia (FAB-M2) having a good prognosis.	Cancer Genet Cytogenet	180	74-78	2008
Matsuoka S, <u>Hayashi Y.</u> 他 22 名	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
Tauchi H, <u>Hayashi Y.</u> 他 9 名	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
Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, <u>Hayashi Y.</u>	Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: A study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group.	Pediatr Blood Cancer	50	264-269	2008
Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, <u>Hayashi Y.</u> 他 4 名	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
Suzuki M, Ikeda H, Kuwano H, <u>Ogawa S.</u> <u>Hayashi Y.</u> 他 7 名	Whole genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single nucleotide polymorphism genotyping microarrays	Cancer Science	99	564-570	2008
Manabe A, Ohara A, <u>Kiyokawa N.</u> Kikuchi A, Takahashi H, Ikuta K, <u>Hayashi Y.</u> 他 5 名	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	1155-1160.	2008
Sawada T, <u>Hayashi Y.</u> 他 13 名	Fusion of OTT to BSAC results in aberrant up-regulation of transcriptional activity.	J Biol Chem	283	26820-26828	2008
Chen Y, <u>Ohira M.</u> <u>Hayashi Y.</u> Mano H, <u>Ogawa S.</u> 他 9 名	Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma.	Nature	455	971-974	2008
Hiwatari M, Ono R, Taki T, Hishiya A, Ishii E, Kitamura T, <u>Hayashi Y.</u> 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
Taketani T, Taki T, Sako M, Ishii T, Yamaguchi S, <u>Hayashi Y.</u>	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

Shimada A, Kato M, Tamura K, Hirato J, Kanegane H, Takechi Y, Park MJ, Sotomatsu M, Hatakeyama S, <u>Hayashi Y.</u>	Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with uncontrolled inflammatory cytokinemia and chemokinememia 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
Matsushita H, <u>Hayashi Y</u> , Hotta T, Ando K, Miyachi H. 他 1 名	C/EBPalpha and C/EBPvarepsilon induce the monocytic differentiation of myelomonocytic cells with the MLL-chimeric fusion gene.	Oncogene	27	6749-6760	2008
Ohnishi H, <u>Hayashi Y</u> , Taniwaki M, Bessho F, Watanabe T. 他 6 名	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
Kawamata N, <u>Ogawa S</u> , 他 13 名	Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray.	PNAS	105	11921	2008
Kawamata N, <u>Ogawa S</u> , 他 15 名	Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray.	Blood	111	776	2008
Miyake I, <u>Ohira M</u> , Nakagawara A, Sakai R.	Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma.	Oncogene	28(5)	662-73	2009
Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, <u>Ohira M</u> , 他 6 名	Loss of imprinting of <i>IGF2</i> correlates with hypermethylation of the <i>H19</i> differentially methylated region in hepatoblastoma.	Br J Cancer	99(11)	1891-9	2008
Ikematsu S, <u>Ohira M</u> , 他 5 名	Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma.	Cancer Sci	99(10)	2070-4	2008
Ando K, <u>Ohira M</u> , Ozaki T, <u>Nakagawa A</u> , Akazawa K, Suenaga Y, 他 5 名	Expression of <i>TSLC1</i> , a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is down-regulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation.	Int J Cancer	123(9)	2087-94	2008
Nakagawa H, <u>Ohira M</u> , Nakagawara A, Nishimura S, 他 9 名	Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system.	Cancer Lett	270(2)	295-301	2008
Honda S, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, <u>Ohira M</u> , 他 8 名	The methylation status of RASSF1 promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients.	Int J Cancer	123(5)	1117-25	2008
Abe M, Watanabe N, McDonnell N, Takato T, <u>Ohira M</u> , Nakagawara A,	Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor	Oncology	74(1-2)	50-60	2008

Ushijima T.	prognosis.				
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 Heatol Oncol	30(3)	249-253	2008
Hossain MS, Nakagawa A, Ohira M, 他 5 名	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
Ando K, Takenobu H, Nakagawa A, Ohira M, Kamijo T, 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(9)	2087-2094	2008
Yajima M, Inadome K, Nakagawa A, 他 8 名	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
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
Matsubara K, Nakagawa A, 他 5 名	ATIC-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma: a case report and review of the literature.	臨床血液	48(5)	325-330	2008
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・胚細胞腫瘍	病理と臨床	26(9)	938-944	2008
Narimatsu H, Iino M, Ichihashi T, Yokozawa T, 他 10 名	Clinical significance of minimal residual disease in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan.	Int J Hematol.	88(2)	154-8	2008
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	27(2):	151-155	2009

Inducible Expression of Chimeric EWS/ETS Proteins Confers Ewing's Family Tumor-Like Phenotypes to Human Mesenchymal Progenitor Cells^{∇†}

Yoshitaka Miyagawa,¹ Hajime Okita,^{1*} Hideki Nakajima,¹ Yasuomi Horiuchi,¹ Ban Sato,¹
Tomoko Taguchi,¹ Masashi Toyoda,³ Yohko U. Katagiri,¹ Junichiro Fujimoto,²
Jun-ichi Hata,¹ Akihiro Umezawa,³ and Nobutaka Kiyokawa¹

Department of Developmental Biology, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1, Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan¹; National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1, Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan²; and Department of Reproductive Biology, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1, Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan³

Received 27 April 2007/Returned for modification 13 July 2007/Accepted 7 January 2008

Ewing's family tumor (EFT) is a rare pediatric tumor of unclear origin that occurs in bone and soft tissue. Specific chromosomal translocations found in EFT cause EWS to fuse to a subset of ets transcription factor genes (ETS), generating chimeric EWS/ETS proteins. These proteins are believed to play a crucial role in the onset and progression of EFT. However, the mechanisms responsible for the EWS/ETS-mediated onset remain unclear. Here we report the establishment of a tetracycline-controlled EWS/ETS-inducible system in human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells (MPCs). Ectopic expression of both EWS/FLI1 and EWS/ERG proteins resulted in a dramatic change of morphology, i.e., from a mesenchymal spindle shape to a small round-to-polygonal cell, one of the characteristics of EFT. EWS/ETS also induced immunophenotypic changes in MPCs, including the disappearance of the mesenchyme-positive markers CD10 and CD13 and the up-regulation of the EFT-positive markers CD54, CD99, CD117, and CD271. Furthermore, a prominent shift from the gene expression profile of MPCs to that of EFT was observed in the presence of EWS/ETS. Together with the observation that EWS/ETS enhances the ability of cells to invade Matrigel, these results suggest that EWS/ETS proteins contribute to alterations of cellular features and confer an EFT-like phenotype to human MPCs.

Ewing's family tumor (EFT) is a rare childhood cancer arising mainly in bone and soft tissue. Since EFT has a poor prognosis, it is important to elucidate the underlying pathogenic mechanisms for establishing a more effective therapeutic strategy. EFT is characterized by the presence of chimeric genes composed of EWS and ets transcription factor genes (ETS) formed by specific chromosomal translocations, i.e., EWS/FLI1, t(11;22)(q24;q12); EWS/ERG, t(21;22)(q12;q12); EWS/ETV1, t(7;22)(p22;q12); EWS/E1AF, t(17;22)(q12;q12); and EWS/FEV, t(2;22)(q33;q12) (26). The products of these chimeric genes behave as aberrant transcriptional regulators and are believed to play a crucial role in the onset and progression of EFT (3, 36). Indeed, recent studies have revealed that the induction of EWS/FLI1 proteins can trigger transformation in certain cell types, including NIH 3T3 cells (36), C2C12 myoblasts (12), and murine primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells (MPCs) (6, 45, 52). However, studies have also indicated that overexpression of EWS/FLI1 provokes apoptosis and growth arrest in mouse normal

embryonic fibroblasts and primary human fibroblasts (10, 31), hence hampering understanding of the precise role of EWS/ETS proteins in the development of EFT. The function of EWS/ETS proteins would be greatly influenced by cell type, and thus the cells that can originate EFTs might be more susceptible to the tumorigenic effects of EWS/ETS.

Although the cell origin of EFT is still unknown, the expression of neuronal markers in spite of the occurrence in bone and soft tissues has kept open the debate as to a potential mesenchymal or neuroectodermal origin. As described above, ectopic expression of EWS/FLI1 results in dramatic changes in morphology and the formation of EFT-like tumors in murine primary bone marrow-derived MPCs but not in murine embryonic stem cells (6, 45, 52), supporting the notion that MPCs are a plausible cell origin of EFT (45). However, others argue that MPCs cannot be considered progenitors of EFT without further evidence of similarity between human EFT and MPC-EWS/FLI1-induced tumors in mice (29, 46).

The development of experimental systems using murine species is useful for elucidating the mechanisms behind the pathogenesis of EFT. However, several differences between human and murine systems cannot be ignored; these differences include the expression patterns of surface antigens in MPCs, for instance (7, 44, 51, 53). Moreover, human cells are difficult to transform *in vitro*, and the transformed cells of mice seem to produce a more aggressive tumor than those of hu-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Developmental Biology, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1, Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan. Phone: 81-3-3416-0181. Fax: 81-3-3417-2496. E-mail: okita@nch.go.jp.

† Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 22 January 2008.

TABLE 1. Cell lines used in this study and fusion transcript types

Cell line	Diagnosis	Fusion transcript type	Reference
EES-1	EFT	EWS/FLI1 type I	20
SCCH196	EFT	EWS/FLI1 type I	21
RD-ES	EFT	EWS/FLI1 type II	5
SK-ES1	EFT	EWS/FLI1 type II	5
NCR-EW2	EFT	EWS/FLI1 type II	19
NCR-EW3	EFT	EWS/E1AF	19
W-ES	EFT	EWS/ERG	13
NB69	NB		15
NB9	NB		15
GOTO	NB		47
NRS-1	RMS	PAX3/FKHR	40

mans (1). The findings suggest the existence of undefined cell-autonomous mechanisms that render human cells resistant to malignant transformation. Therefore, the use of human cell models is ideal for clarifying how EFT develops. Models of the onset of EFT have been generated using primary fibroblasts (31) and rhabdomyosarcoma cells (23). However, these cell types are not appropriate for studying the origins of EFT, and a model that precisely recapitulates EWS/ETS-mediated EFT formation is required.

UET-13 cells are obtained by prolonging the life span of human bone marrow stromal cells by use of the retroviral transgenes hTERT and E7 (38, 50), retain the ability to differentiate into not only mesodermal derivatives but also neuronal progenitor-like cells, and are considered a good model for studying the cellular events in human MPCs. Therefore, we have examined the biological effect of EWS/ETS in human MPCs by use of UET-13 cells by exploiting tetracycline-inducible systems for expressing EWS/ETS (EWS/FLI1 and EWS/ERG). Here we report that overexpression of EWS/ETS mediates an EFT-like phenotype, including morphology, immunophenotype, and gene expression profile, with enhancement of the Matrigel invasion ability of UET-13 cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures and establishment of UET-13TR-EWS/ETS cell lines. UET-13 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% Tet system approved fetal bovine serum (T-FBS) (Takara) at 37°C under a humidified 5% CO₂ atmosphere. EFT cell lines (EES-1 [20], SCCH196 [21], RD-ES and SK-ES1 [5], NCR-EW2 and NCR-EW3 [19], and W-ES [13]) and neuroblastoma (NB) cell lines (NB69 and NB9 [15] and GOTO [47]) were cultured in RPMI 1640 with 10% FBS. A rhabdomyosarcoma cell line, NRS-1 (40), was cultured in Eagle's minimal essential medium with 10% FBS. The cell lines used in this study are listed in Table 1.

UET-13 cells were seeded at a density of 5×10^4 cells per well in 24-well tissue culture plates 1 day prior to transfection. For introducing the tetracycline-inducible system, UET-13 cells were transfected with pcDNA6-TR (Invitrogen) by use of Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 72 h, the medium was replaced with fresh medium containing 200 µg/ml of blasticidin S (Invitrogen). Individual resistant clones were selected for a month and designated UET-13TR cells. UET-13TR cells were further transfected with pcDNA4-EWS/ETSs constructed as described below, and individual resistant clones were selected in DMEM containing 10% T-FBS and 200 to 300 µg/ml of Zeocin (Invitrogen). The Zeocin-resistant clones were expanded and tested for the induction of EWS/ETS expression upon the addition of tetracycline by use of reverse transcription-PCR (RT-PCR) as described below.

Plasmid construction. A gateway cassette (bases 1 to 1705) was amplified from pBLOCK-iT3-DEST (Invitrogen) by PCR, and the PCR product was inserted into the EcoRV site of pcDNA4-TO (Invitrogen) (termed pcDNA4-DEST). Since the type II EWS/FLI1 is a stronger transactivator than the type I product

(32), we used the type II variant in the present study. EWS/ERG was isolated from W-ES, an EFT cell line, joining EWS exon 7 and ERG exon 9. Full-length EWS/FLI1 type II and EWS/ERG cDNAs were amplified from cDNAs prepared from NCR-EW2 and W-ES cells, respectively, by PCR as described below and cloned into the XmnI-EcoRV sites of pENTR11 (Invitrogen). The resulting pENTR11-EWS/ETSs were recombined with pcDNA4-DEST by use of LR recombination reaction as instructed by the manufacturer (Invitrogen) to construct the tetracycline-inducible EWS/ETS expression vector pcDNA4-EWS/ETSs.

Western blot analysis. UET-13 transfectants were cultivated with or without 3 µg/ml of tetracycline for 72 h. Western blot analysis was performed as previously described (37). Briefly, the cell lysates were prepared and separated on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. The membranes were blocked with 5% skimmed milk in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% Tween 20 (Sigma) and incubated with primary antibodies. As the primary antibodies, anti-Flt-1, anti-Erg-1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology), and anti-actin (Sigma) were used. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G (IgG) antibodies (DakoCytomation) were used as secondary antibodies. Blots were detected by chemiluminescence using an ECL Plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Science Corp.) and exposed to X-ray film (Kodak) for 5 to 30 min.

MTT assay and detection of apoptosis. Growth curves of UET-13 transfectants were determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as described previously (18). The apoptosis was detected using an annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis detection kit (Biovision) according to the manufacturer's instructions and analyzed by flow cytometry (Cytomics FC500; Beckman Coulter).

Immunofluorescence analysis. After 1 week of culture in the absence or presence of tetracycline, UET-13 cells and the transfectants were harvested with 0.25% trypsin plus EDTA (IBL). The cells (2×10^5) were incubated with mouse monoclonal antibodies for 20 min. In the case of fluorescence-labeled antibodies, the cells were washed with PBS and then analyzed. In the case of primary unconjugated mouse antibodies, the cells were washed and then incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 20 min. Cell fluorescence was detected using a Cytomics FC500 instrument as described previously (27).

Antibodies against the following human antigens were used: CD10, CD13, CD14, CD29, CD34, CD40, CD44, CD45, CD49e, CD54, CD56, CD61, CD90, CD105, CD117, and CD166 from Beckman Coulter; CD73 from BD Biosciences-Pharmingen; CD55 from Abcam; CD59 from Cedarlane Laboratories; and CD133 and CD271 from Miltenyi Biotec GmbH.

Immunocytochemistry. Cells were grown on collagen type I-coated cover glasses (Iwaki). After 72 h with or without tetracycline, cells were fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde and permeabilized in PBS containing 0.2% Triton X-100 (Sigma) for 30 min. Subsequently, they were washed with PBS and blocked in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% bovine serum albumin (Sigma) for 30 min before being incubated with a monoclonal anti-CD99 antibody, i.e., 12E7 (1:100) (DakoCytomation) or O13 (1:200) (Thermo), and polyclonal anti-Flt-1 antibody (1:100) (Santa Cruz) for 1 h. Bound antibodies were visualized with appropriate secondary antibodies, i.e., Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (heavy plus light chains) highly cross-adsorbed and Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (heavy plus light chains) highly cross-adsorbed (Invitrogen) for 1 h at 1:300. Nuclei were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) or propidium iodide (PI) (Sigma). For the visualization of whole cells, cells were treated with Celltracker Blue (Invitrogen) for 30 min and then fixed. Fluorescence was observed and analyzed using a confocal laser scanning microscope and image software (either FV500 from Olympus or LSM510 from Carl Zeiss). Precise measurements of cell size, nuclear size, and the nucleus-to-cytoplasm (N/C) ratio were performed using Image J (16).

RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from cells by use of an RNeasy kit (Qiagen) and reverse transcribed using a first-strand cDNA synthesis kit (GE Healthcare Bio-Science Corp). RT-PCR was performed with a HotstarTaq master mix kit (Qiagen). As an internal control, human GAPDH cDNA was also amplified. The sequences of gene-specific primers for RT-PCR were as follows: for EWS/FLI1 (forward), 5'-ATGGCGTCCACGGATTACAGTACCT-3'; for EWS/FLI1 (reverse), 5'-GGGTCTTCTTTGACACTCAATCG-3'; for EWS/ERG (forward), 5'-ATGGCGTCCACGGATTACAGTACCT-3'; for EWS/ERG (reverse), 5'-TTAGTAGTAAGTGCCAGATGAGAA-3'; for GAPDH (forward), 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'; and for GAPDH (reverse), 5'-TCTAGACGGCAGGTCCAC-3'. PCR products were electrophoresed with a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide.