

図8 鶏胚へのPax6(+5a)導入による異所性錐体細胞の形成<sup>7)</sup>  
 2日胚に導入, 19日胚の所見. A: 網膜が過剰に発育した襞を形成. この襞内では, 周辺部(c)に本来は少ないオプシンをもつ錐体細胞が形成されている. B: 免疫染色, C: RT-PCR.

進しており, Pax6は網膜の成長を担っていると考えられた<sup>7)</sup>.

つぎに, エクソン5aを含むPax6(+5a)を導入すると網膜から硝子体腔へ茎状構造が立ちあがった.これはすべて網膜であり, 神経細胞と神経線維で構成されていた.茎状に伸びた組織では網膜が管状になっており, しかも視細胞から神経節細胞に至る層構造がほぼ形成されていた(図7-B).また, 網膜が硝子体腔へ折りたたまれる所見もみられた(図7-C).網膜が水平方向へ過剰に発育し, 抵抗の少ない硝子体腔へ伸展したと考えられる.

したがって, 網膜を成長させる働きはPax6(-5a)よりPax6(+5a)のほうがはるかに強いことが明らかになった.さらに, 錐体視細胞が少なく杆体細胞がおもに存在する網膜周辺部にPax6(+5a)を導入すると, 異所性に錐体細胞の形成が観察された(図8)<sup>7)</sup>.このPax6(+5a)による網膜の発育と錐体細胞の分化が硝子体腔へ突出せず網膜内の1カ所に集中すれば, 黄斑になるのかもしれない.

Pax6を入れた領域の眼球は拡大し, 角膜と水晶体が対側へ偏位した.この作用はPax6(-5a)よりPax6(+5a)のほうが強かった(図6-A, 図7-A)<sup>7)</sup>.眼球は発生初期には頭の横にあり, 鼻側と耳側が同じ大きさであるが, 発生が進むと眼球の位置が頭の横から顔の前へ向くとともに耳側が大きくなる.網膜の成長が進むと眼球が成長し, 一方, 網膜の形成不全では小眼球になることから, 眼球の大きさには網膜の成長が関わっている.眼球の耳側が鼻側に比べて大きいのはPax6(+5a)が耳側後極で強く発現して網膜の発育を進めるためであると考えられる. Pax6にこのエクソン5aが現れたのは脊椎動物になってからであるが, 魚類で網膜の構造は急速に複雑化し, 黄斑が生まれたのは, このエクソン5aの追加が関与したことも示唆される.

Pax6などの眼形成遺伝子を用いた網膜の再生  
 Pax6/eyelessを異所導入すると昆虫ではほぼ完

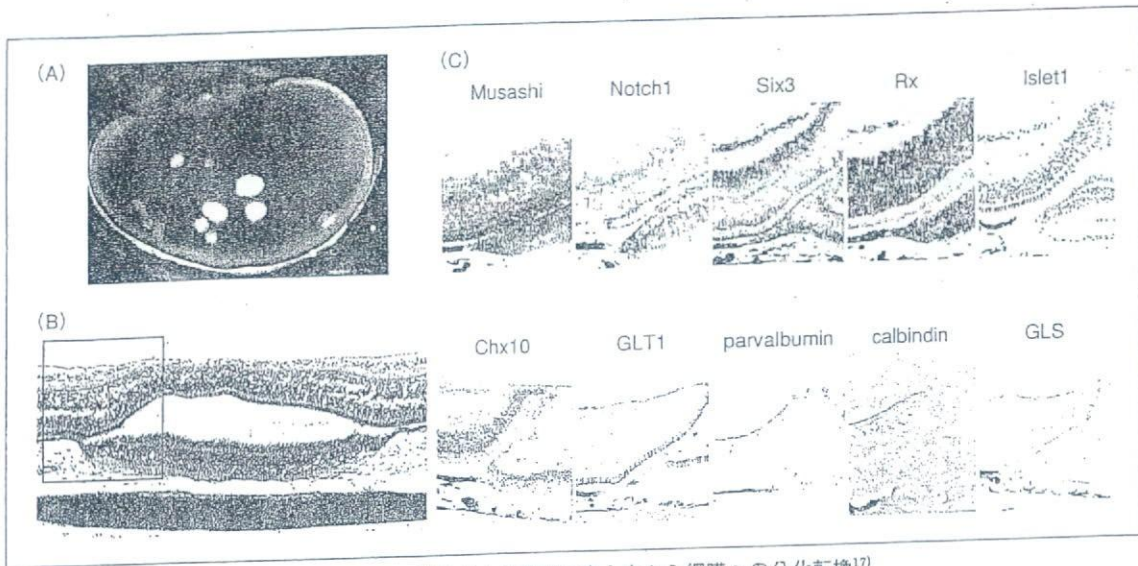


図9 Pax6の導入による網膜色素上皮から網膜への分化転換<sup>17)</sup>  
 3日胚に導入, 14日胚の所見. 遺伝子が導入された色素上皮は斑状に(A), 網膜へ分化転換している(B). この異所網膜は *in situ* hybridization や免疫染色で網膜固有の遺伝子・蛋白発現がみられ(C), ほぼ完全な層構造をもつが, 層の方向は眼杯が折りたたまる向きに応じて本来の網膜と背合わせになっている.

全な複眼が形成される<sup>2)</sup>. Pax6/eyeless 下流の eyes absent, sine oculis/Six, dachshund, Rx, teashirt の導入では小さい複眼が形成されるが<sup>9-12)</sup>, 哺乳類では, Pax を導入してもアフリカツメガエルの幼生で不完全な構造の異所眼が形成されるにすぎない<sup>13)</sup>. また, Six6, Rx を発生期の脳や網膜色素上皮に導入すると, 不完全ながら網膜組織が形成されるが<sup>14-16)</sup>, Pax6 を導入するとかなり完全な層構造をもつ網膜を形成することができる(図9)<sup>17)</sup>. この網膜形成における Pax6(-5a)と Pax6(+5a)の働きの違いは現在検討中であるが, 過去の研究からみて Pax6(+5a)のほうがより高度な網膜を形成できる可能性がある<sup>7)</sup>.

近年, 網膜色素変性症モデル動物や患者で, 障害された黄斑部網膜下に胎児網膜を移植して視力が改善したことが報告された<sup>18,19)</sup>. 未熟な胎児網膜がレシピエント網膜内で分化し, シナプスを形成すると思われる. 網膜色素変性症では視細胞以外の網膜構造はある程度温存されており, 胎児網膜由来の視細胞のシナプスが繋がったと推測される. 自己の虹彩や色素上皮に網膜の形態形成遺伝子を導入あるいは発現誘導して網膜を再生できれば, やや不完全な構造であっても, このような網膜移植に利用できることが期待される.

### おわりに

網膜の重症疾患で悩まされている患者や医師にとって, 網膜を再生させて失われた視覚を復元させる医療は大きな夢である. しかし, 構造が複雑な網膜をシナプスごと再構築することが難しく, 中枢への神経投射を的確に復元しないかぎり有用な視力が得られない. できても, せいぜい光覚や手動弁の視力あるいは視野をすこし広げる程度と考えられていた. しかし, 近年の再生医学研究によって視覚の復元への道はすこしずつ着実に進歩している. 黄斑を形成する遺伝子システムを解明して再生医療に利用すれば, 高度な視覚構造が復元できると期待される.

### 文献

- 1) Ton, C. T. T. et al. : *Cell*, 67 : 1059-1074, 1991.
- 2) Callaerts, P. et al. : *Annual. Rev. Neurosci.*, 20 : 483-532, 1997.
- 3) Nishina, S. et al. : *Br. J. Ophthalmol.*, 83 : 723-727, 1999.
- 4) Azuma, N. et al. : *Nat. Genet.*, 13 : 141-142, 1996.
- 5) Azuma, N. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, 65 : 656-663, 1999.
- 6) Azuma, N. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, 72 : 1565-1570, 2003.
- 7) Azuma, N. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, 14 : 735-745, 2005.
- 8) Schedl, A. et al. : *Cell*, 86 : 71-82, 1996.

## 臨床医に必要な CCS の知識

国立成育医療センター 第一専門診療部

横谷 進

### はじめに

小児の悪性疾患は、「小児がん」と総称され、その中には、白血病、悪性リンパ腫、脳腫瘍、小児固形腫瘍などが含まれている。小児がんに対する治療法の進歩により、長期生存率はこの数 10 年間に急速し改善した。それに伴い、救命のみならず与えられた長い一生の健康状態や QOL の改善にも強い関心が寄せられるようになってきた。そのような流れの中で、小児がん自体やそれに対する強力な治療が長期にわたる機能障害をしばしば引き起すことから、晩期合併症への適切な対応が求められるようになった<sup>1), 2)</sup>。晩期合併症の中では、内分泌機能障害が最も高い頻度で起こることが分かっている。内分泌合併症は、基本的に生涯にわたることから、成人内分泌科医の理解と積極的な関与が必須である。多くの成人内分泌科医が積極的に関わるためのイントロダクションとして、本稿が役立つことを強く期待したい。

### 1. CCS における内分泌合併症の重要性

小児がんからの長期生存者は、CCS (Childhood Cancer Survivors) と呼ばれ、日本では「小児がん経験者」と呼ばれている。小児がんの長期生存率は、北米における 5 年生存率で見ると、1965 年の 20% から 1995 年の 66% へと急速に上昇しており、さらに最近では、約 80% の長期生存が見込まれている。日本でもそれに近い生存率に上昇してきていると推測される。北米では、若年成人の 350-600 人に 1 人がすでに CCS であると言われており、今後も、しばらくは増加傾向が続くと考えられている<sup>3)</sup>。

小児がんに対しては、極めて強力な治療が行われてきた。1970 年-1986 年に北米で行われた治療内容を見ると、手術療法 81.2%、化学療法 80.5%、放射線療法 67.9% となっており、85.7% の CCS には、これらの 2 つ以上の併用療法により治療されていた<sup>1)</sup>。腫瘍自体やこれらの強力な治療の結果、さまざまな晩期合併症が引き起される。内分泌障害、末梢・中枢神経障害、心筋障害、腎障害、運動障害、肝炎、二次がんなど種々の合併症が知られている。晩期合併症の中では、内分泌障害の割合が最も高く、CCS のうちの約 40% が内分泌合併症を有すると報告されている(表 1)<sup>3)</sup>。また、主な内分泌

合併症は表 2 に挙げた通りである。

上述の若年者に占める CCS の割合と、その中で内分泌合併症を有する割合から単純に計算すると、若年者の約 900-1,500 人に 1 人が内分泌合併症を有する CCS であることになる。これは、他の内分泌疾患の頻度と比べると極めて高く、成人内分泌科医がすでに多数の経験をしていてもおかしくない対象であると推測される。日本中でおそらくは数万人の内分泌障害合併 CCS がいるが、その多くが適切に診療されていない可能性が高い。成人内分泌科医の間で CCS に関する専門的な知識が共有され、また、このような点について社会に広く注意が喚起されなければならない。

Tab. 1 Late Effects after Childhood Cancer Therapy<sup>3)</sup>

Functional group	n	%
Endocrine	120	41
Organ toxicity	74	26
Mobility	50	17
Neuropsychological	44	15
Infertility	40	14
Sensory	38	13
Cosmetic	28	10

Tab. 2 起こりうる内分泌障害

1. GHD と成長障害
2. 性腺機能異常
3. その他の下垂体機能不全
4. 甲状腺機能低下症
5. 骨粗鬆症
6. 肥満・メタボリックシンドローム

## 2. 成長障害と成長ホルモン分泌不全低身長症

白血病や脳腫瘍を中心として、CCSでは成長障害を生ずることが多い。北米の研究では、小児期の脳腫瘍患者のうちで成人に達した者の平均身長は、同性の同胞に比べて、男子で10cm、女子で7cm低かった(それぞれ、 $p < 0.01$ )と報告されている<sup>4)</sup>。その原因には、(1)成長ホルモン分泌不全(GHD)、(2)中枢性または原発性甲状腺機能低下症、(3)中枢性思春期早発症による骨成熟促進、といった内分泌疾患以外に、(4)原疾患と集中的治療に伴う低栄養・異化亢進、(5)骨(とくに脊髄)の放射線障害などが考えられ、実際にはこれらが組み合わさって成人身長を低くするように作用していることが多い。

成長ホルモン(GH)は、視床下部・下垂体へのさまざまな侵襲に対して最も分泌不全を起こしやすい前葉ホルモンである。わずか7Gyの頭部照射でも、小児ではGHDが起こりうると言われており、18Gyを超えれば珍しくなく起こる。40Gyを超えれば、数年以内にほぼ100%にGHDが合併する。このような放射線感受性の高さから、脳腫瘍に対する頭部照射だけでなく、骨髄幹細胞移植のための全身照射などでもGHDは高い頻度で起こると考えるべきである。放射線照射量が多ければ多いほど短期間に高率で、少ない照射では10年にも及ぶ経過で徐々に、GHDが完成する。

小児期のGHDは、成長速度の低下で見つけることができる。原疾患や治療によりその可能性があるかと判断されるCCSでは、成長曲線を描きながらフォローし、標準成長曲線に比べて成長速度(成長曲線の傾き)が低下してきた場合には、GHDを疑うべきである。脳内の器質的原因や頭部放射線照射の既往のあるCCSでは、GHDの診断には1種類のGH分泌刺激試験で十分であると考えられている(厚生労働省研究班による診断の手引き)<sup>5)</sup>。もし、GH分泌低下が認められない場合にも、GHDは年の単位で完成するので、しばらく後に再検査を行うと分泌低下を示すことも珍しくない。

小児期の脳腫瘍や頭部放射線照射に伴うGHDは、(少なくとも数年を経過した後には)重症GHDであることが多い。したがって、これらのGHDを伴うCCSは、大部分が成人重症GHDに移行する。成長のための小児期の治療から正常な代謝のための成人期の治療へ、なるべく短い期間の休薬で移行できることが目標である。小児期から成人期へのGHDのトランジションについては、日本小児内分泌学会からガイドラインが公表されている<sup>6)</sup>。CCSにおける成人GHDが増加していくにあたり、多くのCCS患者が生涯にわたって成人内分泌科医によりフォローされ、GHDが適切に管理されることが望まれる。

## 3. ゴナドトロピン-性腺系の機能異常

ゴナドトロピン(Gn)-性腺系の活動は、視床下部からのGn放出ホルモン(GnRH)によって調節されて

いる。思春期以前には、GnRHの脈動的分泌は振幅と頻度が生理的に低く抑えられているが、思春期には、GnRHが増加してGn-性腺系の活動が活発になる。頭部照射では、18Gyを超えると女子においてGnRH分泌の抑制がはずれて、早い年齢でGn-性腺系が賦活化され、思春期早発症を来すことが珍しくない。30Gyを超えると男子でもその可能性がある。40Gyを超えると、逆にGnRH分泌が障害されて、しばしば中枢性性腺機能不全を起こす。また、40Gy以上では、視床下部による抑制が解除されてプロラクチン分泌が増加し、高プロラクチン血症を来すことがあり、これも性腺機能を抑制する原因になる。

一方、性腺自体は、放射線や化学療法によって直接に障害されることがある。アルキル化剤、とくに3サイクル以上のMOPP療法、600mg/m<sup>2</sup>以上のbusulfan、7.5g/m<sup>2</sup>以上のcyclophosphamideがとくに高い危険因子として知られている。放射線療法では、わずか1Gyでも精子形成障害が起こり、4Gyを超えると永続的な無精子症となることが多い。Leydig細胞障害(すなわちテストステロン分泌障害)は、20Gy以上が危険因子である。テストステロン分泌障害では、思春期の遅発や停止として現われるので、危険因子がある場合には二次性徴に注意してフォローする必要がある。卵巣の放射線感受性は、思春期開始前と後では異なっていて、思春期以降ではより感受性が高い。具体的には、思春期前では10-15Gyを超えると危険因子となるが、思春期開始後では5-10Gy以上でも卵巣機能不全が起こりうる。アルキル化剤に対する感受性も同様で、思春期開始後の方が障害されやすい。

男女いずれの場合も、性腺機能不全では、中枢性にしても原発性にしても、ホルモン補充療法が適切に行われることが必要である。それは、性機能やQOLの向上のためだけでなく、骨密度の増加・維持のために不可欠と考えられるからである。小児期には、二次性徴の完成までを目指す段階的な治療が行われるが、思春期完成後は、成人と同様の補充療法が行われる。他の原因による性腺機能不全と同様に、CCSの場合にも長期にわたる補充療法が成人期を通じて行われるよう、成人内分泌科医の診療が不可欠である。挙児を目標とした治療も、中枢性の場合には成功する率が高くなっており、また、原発性でも補助生殖医療により可能性が増しつつある。

## 4. その他の内分泌合併症

下垂体機能では、40Gy(とくに50Gy)を超えた頭部照射で、GHに加えてTSH、ACTH、時には、ADHの分泌不全を合併することが少なくない。

甲状腺自体も放射線の影響を受けやすい。10Gyを超えると、甲状腺機能低下症、時に亢進症を発症する。25Gyを超えると甲状腺結節を起こしやすい。甲状腺癌は20-29Gyで最も起こりやすいと報告されている。

骨粗鬆症は、アルキル化剤(とくに、メソトレキセート)とコルチコステロイド(とくに、プレドニゾンとデキサメサゾン)が危険因子となって起こりやすい。とくに、これらの併用療法、GVHD などのコルチコステロイドの長期投与、GHD・性腺機能低下・甲状腺機能亢進症などの内分泌合併症、喫煙・アルコール・運動不足・カルシウム摂取不足などの生活習慣が高い危険因子となる。

### 5. CCS への最近の取り組み

北米では、1993 年に大規模な CCS 研究が始まっており、本稿にも紹介したように、多くの有用な情報が公表されてきた。Children's Oncology Group (COG) によるホームページ <http://www.childrensoncologygroup.org/> には、医療従事者と CCS (本人・家族) に向けて、リスクに基づいたフォローアップと適切な介入の重要性が強調されており、具体的な行動のためのガイドラインが示されている。その概要は、最近の総説によって容易に知ることができる<sup>7)</sup>。

日本では、日本小児白血病・リンパ腫治療研究グループ(JPLSG)の長期フォローアップ委員会(石田也寸志委員長)と、厚生労働省の研究班(石田班)によって、身体的・心理的晩期合併症や QOL の後方視的な調査が行われ、CCS のための健康手帳、フォローアップガイド、共通治療サマリーの制作などが進行している。内分泌合併症については、日本小児内分泌学会の中に、CCS の内分泌合併症に関する委員会(委員長: 横谷進)が 2006 年 9 月に発足し、長期フォローアップ委員会・研究班と歩調を合わせて活動し、現在は、内分泌合併症の早期診断と介入のためのガイドラインを作成中である。さらに、2007 年には、コンセンサス作成、小児がんフォローアップ拠点病院モデル事業・小児がん登録の基盤整備を 3 本柱とする、新たな研究班(主任研究者: 藤本純一郎)が発

足した。このように、国内ではようやく本格的な取り組みが始まったところである。

### 6. 成人内分泌科医の役割

本稿で強調してきたことは、CCS の頻度がかかなり高くなっていること、その中には、内分泌合併症が極めて多いこと、危険因子に基づいたフォローアップにより、早期診断・介入が可能なことである。表 3 に、CCS における内分泌合併症の危険因子を単純化してまとめた。すなわち、頭部照射による線量ごとの下垂体機能障害、甲状腺・性腺への直接の放射線障害、アルキル化剤・コルチコステロイドなどの一部の化学療法による性腺機能不全・骨粗鬆症が最も重要な危険因子である。

国内における CCS の内分泌合併症への取り組みは、小児科に通院している年齢においては、小児腫瘍科医と小児内分泌科医の連携により確実なものになりつつある。そこで診断された内分泌合併症は、成人に持ち越されることがほとんどであることから、小児内分泌科医から成人内分泌科医への移行(トランジション)が盛んに行われるようになるはずである。成人内分泌科医は、内分泌合併症を中心として、CCS の健康管理に生涯にわたり関わることが求められている。

さらに、小児がんの治療担当医が、脳外科医や整形外科医やその他である場合には、現状では、小児期の連携が不十分なことが多く、小児期にすでに発症した内分泌合併症が適切に診療されずに成人に至っている場合もある。また、放射線療法後に徐々に完成する内分泌合併症などでは、成人で発症することもある。このような場合には、成人内分泌科医が、初めて内分泌疾患を診断する可能性がある。CCS の知識が広く普及し、多くの成人内分泌科医が CCS の内分泌合併症を日常的に積極的に診断するようになることを期待する。

Tab. 3 晩期内分泌合併症とその危険因子(主に文献<sup>7)</sup>を参考に作成)

内分泌合併症	放射線療法			化学療法
	頭部	全身	局所	
GH 分泌不全	+ >18Gy			
甲状腺機能低下	+ >40Gy	+	+ >10Gy	
甲状腺結節/癌	+	+	+ >25Gy/20-29Gy	
ACTH 分泌不全	+ >40Gy			
思春期早発症	+ >18Gy (F)			
性腺機能不全・不妊	+ >40Gy	+	+ >10Gy (F) >1Gy (M) >20Gy (Leydig)	+ アルキル化剤
骨粗鬆症				+ MTX、ステロイド、BMT
肥満	+ >18Gy			+ ステロイド
高プロラクチン血症	+ >40Gy			

## ま と め

- ① CCS とは、小児がん経験者 Childhood Cancer Survivors のことである。
- ② 欧米のデータによると、若い成人の 900-1,500 人に 1 人は内分泌合併症を伴った CCS である。
- ③ 種々の内分泌合併症は、それぞれの危険因子により予測できる。
- ④ 小児内分泌科医からの紹介と、病歴の共有と専門的知識による新規診断とを 2 つの入口として、成人内分泌科医が CCS に積極的に関与することが期待される。

## 文 献

- 1) 石田也寸志、北米 Childhood Cancer Survivors Study による小児がん経験者の長期的な問題点—第 1 編、日本小児科学会雑誌、2006; 110: 1513-22
- 2) 石田也寸志、北米 Childhood Cancer Survivors Study による小児がん経験者の長期的な問題点—第 2 編、日本小児科学会雑誌、2006; 110: 1523-33
- 3) Stevens MC, Mahler H, Parkes S. The health status of adult survivors of cancer in childhood. *Eur J Cancer*. 1998; 34: 694-8
- 4) Gurney JG, Ness KK, Stovall M, Wolden S, Punyko JA, Neglia JP, Mertens AC, Packer RJ, Robison LL, Sklar CA. Final height and body mass index among adult survivors of childhood brain cancer: childhood cancer survivor study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 4731-9
- 5) 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「間脳下垂体機能障害に関する調査研究」. 成長ホルモン分泌不全性低身長症の診断の手引き (平成 17 年改訂)
- 6) 横谷進, 依藤亨, 田中敏章, 西美和, 長谷川行洋, 藤枝憲二, 日本小児内分泌学会成長ホルモン委員会、成長ホルモン分泌不全性低身長症の小児期の成長ホルモン治療から成人期の成長ホルモン治療への移行ガイドライン、日本小児科学会雑誌、2006; 110(10): 1475-79
- 7) Nandagopal R, Laverdière C, Mulrooney D, Hudson MM, Meacham L. Endocrine late effects of childhood cancer therapy: a report from the Children's Oncology Group. *Horm Res*. 2008; 69: 65-74

## 小児がん経験者（CCS）における性腺機能障害

国立成育医療センター第一専門診療部  
横谷 進

はじめに

小児の悪性疾患には、白血病、悪性リンパ腫、脳腫瘍、小児固形腫瘍などが含まれ、「小児がん」と総称されている。小児がんに対する治療法の進歩はめざましく、この40年ほどの間に生命予後は急速に改善して、80%近い小児がん患者が長期生存できるようになった。しかし、小児がん自体やそれに対する強力な治療が、長期にわたる機能障害をしばしば引き起こすことから、こうした晩期合併症（late effects）への適切な対応が求められるようになった[1, 2]。小児がんからの長期生存者は、CCS（Childhood Cancer Survivors）と呼ばれ、日本では「小児がん経験者」と呼ばれている。CCSの晩期合併症のなかでは、内分泌機能障害がもっとも高い頻度で起こることがわかっている。そのなかでもっとも多いのは、成長ホルモン分泌不全、甲状腺機能障害（中枢性と原発性をともに含めて）、ついで性腺機能障害の順であるといわれている。北米では、若年成人の350~600人に1人がCCSであると報告されており、一般にいわれるようにこの40%が内分泌合併症をもつとすると、若年者の約900~1,500人に1人が内分泌合併症を有するCCSであることになる。

内分泌合併症は、基本的に生涯にわたることから、小児内分泌科医だけでなく、成人診療科医によってもCCSの内分泌合併症に関する知識が共有されることが必須である[3]。CCSの知識は決して新しい性質のものではないが、臨床的には、新たに注目されてきた重要な対象である。ここでは、性腺機能異常に焦点をあてて、紹介したい。

## 1. CCSのフォローアップの原則

CCSでは、原疾患とそれに対する治療内容がわかれば、どのような晩期合併症がどの時期にどれくらいの頻度で起こるかが、予測できるようになってきている。CCSのフォローアップにあたっては、起こりうる合併症とその頻度を念頭に置いて、タイムリーに検診を行い、合併症を早期診断して対処することが求められる。そうした方針に基づいて、ターゲットを絞ったフォローアップを

行うことが期待される。北米のChildren's Oncology Group (COG) が公開しているガイドラインは、そのための資料としてきわめて有用である[4]。本稿も、そうした「リスクに基づいたフォローアップ」を推進する臨床的な立場から記述する。

## 2. 中枢性性腺機能異常

中枢性性腺機能異常、すなわち、ゴナドトロピン(Gn)分泌の異常は、化学療法単独ではほとんど起こらない。脳腫瘍自体、あるいは、それに対する手術侵襲が視床下部に及んだ場合に起こるが、それより頻度が高いのは、頭蓋放射線照射による場合である。Gn分泌は、成長ホルモン(GH)分泌について放射線感受性が高い。一般に、放射線による視床下部下垂体障害は、照射線量に依存した頻度で起こり、また、線量が多いほど早く発症し、線量が少ないと10年にも及ぶ期間を経過した後に発症することがある。

思春期前の正常小児では、GnRHの脈動的分泌は振幅と頻度が低く抑えられている。18Gyを超える頭部照射を受けると、女子においてGnRH分泌の抑制が解除されて、早い年齢でGn-性腺系が賦活化され、しばしば思春期早発症を来す。機序は明らかでないが、GABAニューロンの放射線障害がより起こりやすいためではないかと推測されている。30Gyを超えると男子でもその可能性がある[5]。思春期早発症は、低年齢で性発達が起こること自体の心理的・社会的な問題以外に、早期の骨成熟により最終的に成人低身長を来すことも臨床的な問題であり、適切な時期の治療導入（通常はGnRHアゴニストによる治療）が考慮されなければならない。

頭部照射線量が40Gyを超えると、GnRH分泌が障害されて、しばしば中枢性性腺機能低下症を起こす。発症までに時間がかかるために、思春期早発症の経過中に、しだいに中枢性性腺機能低下症が完成してゆくことも珍しくない。また、40Gy以上では、高プロラクチン血症を併発して、これも性腺機能を抑制する可能性もある[5]。

性腺機能低下症の症状は、原発性・中枢性によらず、性発達の到達段階に依存している。思春期前の発症であれば思春期の遅発（待っていても二次性徴が現れない）

として現れるが、思春期が始まっていれば思春期の進行の停止、月経周期まで確立していれば早発閉経 (premature menopause) または早発卵巣機能不全 (premature ovarian failure, 以下, POF) として現れる。当然のことながら、こうした現れ方をよく知ったうえでフォローアップしてゆく必要がある。

### 3. 精巣の障害

小児では精巣の腫瘍はきわめて珍しく、他の悪性腫瘍に対する化学療法や放射線療法によって障害されることが問題になる。

化学療法剤のなかで重要なのはアルキル化剤で、一般的にはその DNA 合成阻害作用によって細胞分裂が活発な細胞 (精細管の胚細胞など) を障害すると考えられる。予想されるように、アルキル化剤治療では Leydig 細胞障害 (すなわちテストステロン分泌障害) は、軽度 (ただ LH が上昇する症例は珍しくない) で一過性であることが多く、二次性徴は正常の過程で進行する [6]。一方、精子形成障害は、薬剤によっても重度かつ永続的に起こりうる。Cyclophosphamide では、 $7.5\text{g}/\text{m}^2$  未満の投与量で精子形成は保たれるが、 $25\text{g}/\text{m}^2$  を超えると精子形成障害の危険が非常に高くなる。思春期前の小児では、配偶子形成が不活発であるために精子形成障害が起こる率は低いといわれるが、必ずしも守られるわけではない。Ifosfamide では cyclophosphamide と似た影響が予想されるが、その  $1.1\text{mg}/\text{m}^2$  が cyclophosphamide の  $3.8\text{mg}/\text{m}^2$  に相当するという報告がある。Cisplatin では、 $600\text{mg}/\text{m}^2$  を超えると乏精子症・無精子症が起こるが、可逆的であるといわれる [6]。COG によるガイドラインでは、3 サイクル以上の MOPP 療法、 $600\text{mg}/\text{m}^2$  以上の busulfan、 $7.5\text{g}/\text{m}^2$  以上の cyclophosphamide がとくに高い危険因子として挙げられている [4]。

放射線による障害では、思春期前では  $20\text{Gy}$ 、思春期後では  $30\text{Gy}$  を超える線量が Leydig 細胞障害の危険因子であるといわれる。一方、精子形成障害は、きわめて低い線量で起こることが知られており、 $1\text{Gy}$  以下でも精子形成障害が起こり (閾値は知られていない)、 $3\text{Gy}$  を超えると永続的な無精子症となることが多く、 $6\text{Gy}$  を超えるとほぼ無精子症は回復しない [4]。

成人では、がん治療前の精子凍結保存が、学会や委員会からの見解や報告に基づいて広く行われつつある。小児についても、思春期が進んだ年齢では考慮されてきて

いるが、思春期前の男子については、技術的のみならず倫理的な問題が解決されなければならない [7]。

### 4. 卵巣の障害

アルキル化剤の卵巣に対する作用では、精巣の場合と異なり、配偶子形成と性ホルモン産生の感受性の差は大きくない。思春期前の卵巣は、アルキル化剤の細胞毒性に抵抗性を示すことがよく知られている。それは、より多くの原始卵胞を保有しているためと説明されている [6]。18歳を超えた北米の CCS 3,390例のフォローアップでは、215例 (6.3%) に POF が認められ、単回帰分析では、cyclophosphamide (OR 3.4)、busulfan (OR 9.9)、procarbazine (OR 3.4) など7種のアルキル化剤すべてが有意であった。重回帰分析で有意であった危険因子は、procarbazine (年齢を問わず) と cyclophosphamide (13~20歳) であった [8]。高い障害発生率で一般によく知られているのは、procarbazine と mechlorethamine である。Cyclophosphamide は単独では、他のアルキル化剤に比べて毒性が低く、思春期前では  $25\text{mg}/\text{m}^2$  にも耐えられると報告されているが、busulfan との併用や放射線療法との併用では、卵巣機能不全の危険が大きくなる。

放射線照射の卵巣への影響では、両側卵巣が照射野に入ることが、卵巣機能不全を引き起こす主要な因子であることが知られている。したがって、照射野の慎重な決定が重要であり、該当する場合には卵巣固定術も考慮に値する。薬剤感受性と同様に、放射線感受性も思春期前後で異なっており、思春期以降では、より感受性が高い。COG のガイドラインでも、思春期開始前には  $10\text{Gy}$  を超えると危険因子となるが、思春期開始後では  $5\text{Gy}$  以上で卵巣機能不全が起こりうるとされている [4]。腫瘍治療後に月経の認められた719例の CCS のフォローアップ研究では、手術療法単独に比べて化学療法・放射線療法併用では、POF の危険率が2.58倍高かった。また、初回妊娠率は、手術単独に比べて腹部骨盤部放射線では23%低下しており、この低下は、思春期後に診断された群に限られていた [9]。

CCS では、妊娠経過はほとんど通常と異ならない。しかし、4,029回の妊娠についての報告では、流産が17%でやや多く、放射線照射例でその危険率が高かった (有意差なし)。出生体重は、 $2,500\text{g}$  未満である相対危険率が1.84と高かった ( $P=0.03$ ) [10]。子宮への放射線照射が子宮の線維症や発育不全を引き起こす可能性も指摘



されている(思春期前では20Gy, 思春期後では40~50Gyを超えることが危険因子となる)。現在のところ, 出生する子どもの奇形, 染色体異常, がんの発症に関して, それらが増加するとは考えられていない。

#### おわりに

男女いずれの場合も, 性腺機能不全では, 中枢性にしても原発性にしても, ホルモン補充療法が思春期から成人期を通じて適切に行われることが望まれる。挙児を目標とした治療も, 中枢性の場合には成功する率が高くなっており, また, 原発性でも補助生殖医療により可能性が増しつつある。

他の原因による性腺機能不全と同様に, CCSの場合にも適時かつ適切に診断され, 長期にわたる補充療法と必要な生殖医療が成人期を通じて行われるような体制作りが強く望まれる。

#### 文 献

- 石田也寸志 (2006) 北米 Childhood Cancer Survivors Study による小児がん経験者の長期的な問題点 - 第1編. 日本小児科学会雑誌110, 1513-1522.
- 石田也寸志 (2006) 北米 Childhood Cancer Survivors Study による小児がん経験者の長期的な問題点 - 第2編. 日本小児科学会雑誌110, 1523-1533.
- 横谷 進 (2008) 臨床医に必要な CCS の知識. 日本内分泌学会雑誌84 Suppl, 7-10.
- Children's Oncology Group (2006) Long-term follow-up guidelines for survivors of childhood, adolescent, and young adult cancers. Ver2.0. <http://www.survivorshipguidelines.org/pdf/LTFUGuidelines.pdf>
- Nandagopal R, Laverdiere C, Mulrooney D, Hudson MM, Meacham L (2008) Endocrine late effects of childhood cancer therapy: a report from the Children's Oncology Group. *Horm Res* 69, 65-74.
- Cohen LE (2005) Endocrine late effects of cancer treatment. *Endocrinol Metab Clin N Am* 34, 769-789.
- The Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2005) Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil Steril* 83, 1622-1628.
- Chemaitilly W, Mertens AC, Mithy P, Whitton J, Stovall M, Yasui Y, Robison LL, Sklar CA (2006) Acute ovarian failure in the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1723-1728.
- Chiarelli AM, Marret LD, Darlington G (1999) Early menopause and infertility in females after treatment for childhood cancer diagnosed in 1964-1988 in Ontario, Canada. *Am J Epidemiol* 150, 245-254.
- Green DM, Whitton JA, Stovall M, Mertens AC, Donaldson SS, Ruymann FB, Pendergrass W, Robison LL (2002) Pregnancy outcome of female survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Am J Obstet Gynecol* 187, 1070-1080.

## 小児がん治療と内分泌合併症

横 谷 進\*

### はじめに

「小児がん」は、白血病や悪性リンパ腫などの血液悪性疾患、脳腫瘍、神経芽腫や横紋筋肉腫などの固形腫瘍を合わせた総称である。小児がんの生命予後は、この40～50年の間に格段に改善し、その80%近くが長期生存できるようになった。これまでは、生命を救うことに最大の関心が払われ、その結果として現在のような高い生存率が達成されてきた。しかし、小児がんそのものに加えて、強力な治療が行われることにより、さまざまな合併症が起こることがわかっている。小児がんを克服した小児がん経験者 (childhood cancer survivor: CCS) の一生にとって、そうした合併症は極めて大きな問題として認識されている。北米では、1990年代から大規模な調査が行われ多くの大切な知見が蓄積している<sup>1,2)</sup>。

本稿では、CCSにみられる晩期合併症 (late effect) のなかで、内分泌合併症に焦点をあて、危険因子に基づく適切なフォローアップと早期診断について述べる。

### I. 晩期合併症としての内分泌合併症の重要性

北米では、若年成人の350～600人に1人がCCSであると言われている<sup>1)</sup>。長期生存率がさらに向上してきていることから、今後もしばらくその割合は増加が続くものと推測される。1970～1986年に北米で行われた小児がんに対する治療の内容は、手術療法81.2%、化学療法80.5%、放射線療法67.9%となっており、これらのうち2つ以上の併用療法は85.7%に行われていた。近年

は、放射線療法の頻度は低くなってきているが、こうした強力な治療により、内分泌障害、末梢・中枢神経障害、心筋障害、腎障害、運動障害、肝炎、二次がんなど種々の合併症が起こる。これらの晩期合併症のなかでは、内分泌合併症の割合が最も高く、CCSのうちの約40%が内分泌合併症を有すると報告されている<sup>3)</sup>。上述のCCSの頻度を考え合わせると、若い成人の約900～1,500人に1人が内分泌合併症を有するCCSであると推測される。種々の内分泌疾患の頻度を考えると、CCSを基盤とするそれが極めて大きな割合を占めることがわかる。CCSにおける内分泌合併症としては、1) 成長ホルモン (以下、GH) 分泌不全性低身長症と成長障害、2) 性腺機能異常、3) その他の下垂体機能不全、4) 甲状腺機能低下症、5) 骨粗鬆症、6) 肥満・メタボリックシンドローム、などが挙げられる。

CCSにとって合併症が実際にどれほどの負担 (burden) になっているかを調査した最近の論文によると、中等度以上の負担の大きさを示したイベントの件数は、整形外科学異常、心理社会的・認知能力上の問題に引き続いて、内分泌学的問題が日常生活のなかでも実際に大きな負担になっていることが知られている<sup>4)</sup>。

### II. 内分泌合併症を起こす危険因子

CCSにおけるさまざまな合併症は、それを引き起こす危険因子がある場合のみ、標準リスクより高い確率で起こる。例えば、18 Gy以上の頭部放射線照射が行われていれば、GH分泌不全性低身長症を合併することが十分に予想されるが、通常の化学療法では、その危険は増加しない。すなわち、原病による侵襲と、それ以上に重要である

\* 国立成育医療センター第一専門診療部  
〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1)

表 主な晩期内分泌合併症とその危険因子

内分泌合併症	放射線療法			化学療法
	頭部	全身	局所	
GH 分泌不全	+ >18 Gy			
甲状腺機能低下	+ >40 Gy	+	+ >10 Gy	
甲状腺結節/癌	+	+	+ >25 Gy/20-29 Gy	
ACTH 分泌不全	+ >40 Gy		↓	
思春期早発症	+ >18 Gy (F)	② 甲状腺と性腺は、放射線感受性が高い		
性腺機能不全・不妊	+ >40 Gy	+	+ >10 Gy (F) >1 Gy (M) >20 Gy (Leydig)	+アルキル化剤 ↓ ③ 特定の薬剤が重要
骨粗鬆症	① 頭部照射が最重要 ↑			+MTX, ステロイド, BMT
肥満	+ >18 Gy			+ステロイド
高プロラクチン血症	+ >40 Gy			

MTX: メソトレキセート, BMT: 骨髄移植, (主に Nandagopal ら, 2008 を参考に作成)<sup>6)</sup>

治療内容とによって起こりうる合併症が挙げられ、また、それ以外の合併症は標準リスクを超えて起こる理由がないと判断することができる。こうした考えにより、初めて有効で効率的なフォローアップが可能となり、早期診断・治療に結びつけることができる。このことは、CCS 本人や家族にとっても極めて重要である。無用な心配から解放され、しかし、起こりうる合併症には注意しながら定期的なフォローアップを受けることが期待できる。CCS の長期フォローアップには、このようにリスクに基づいた (risk-based, risk-stratified) 対応が不可欠である。

内分泌合併症についても当然、危険因子が知られている。北米の COG (Childhood Oncology Group) では、極めて多数の合併症を挙げて合併症ごとに危険因子や適切なフォローアップについて、情報をウェブ上で公開しているが<sup>5)</sup>、そのうちの内分泌合併症については最近のレビューに手際よくまとめられているので参照されたい<sup>6)</sup>。

表に、起こりうる主な内分泌合併症と、それぞれに関連する危険因子をまとめた。そこに示したように、概ね3つの危険因子に分類することができる。第1は、頭部照射である。極めて多くの内分泌合併症 (多種の下垂体ホルモン分泌異常) が頭部照射によって引き起される。このことは、脳腫瘍に対してしばしば行われる放射線治療が、内

分泌合併症の危険因子として極めて重要であることを示している。しかし、全身照射の一環として行われる頭部照射では、その線量からみて、GH 分泌不全性低身長症以外の視床下部・下垂体機能障害のリスクは上昇しない。第2は、甲状腺と性腺に対する放射線照射である。これらの器官は、内分泌器官のなかで放射線感受性が最も高いため、直接の局所照射ではもちろんのこと、全身照射であっても、内分泌合併症は起こる可能性がある。第3は、限られた種類の化学療法の薬剤、すなわち、アルキル化剤の一部と、大量・長期のコルチコステロイドである。表からわかるように、放射線合併症が、部位・線量特異的なのに対して、化学療法合併症は、薬剤・用量特異的である。どこにどれだけの放射線照射が行われたか、どの薬剤がどれだけ使われたかは、適切なフォローアップのためには不可欠な情報である。

### III. 成長障害と GH 分泌不全性低身長症

白血病や脳腫瘍を中心として、CCS では成長障害を生ずることが多い。北米の研究では、小児期の脳腫瘍患者のうちで成人に達した者の平均身長は、同性の同胞に比べて、男子で 10 cm, 女子で 7 cm 低かった (それぞれ,  $p < 0.01$ ) と報告されている<sup>7)</sup>。その原因には、1) GH 分泌不全性低身長症 (GHD), 2) 中枢性または原発性甲状腺機能

低下症, 3) 中枢性思春期早発症による骨成熟促進, といった内分泌疾患以外に, 4) 原疾患と集中的治療に伴う低栄養・異化亢進, 5) 骨(とくに脊椎)の放射線障害などが考えられ, 実際にはこれらが組み合わさって成人身長を低くするように作用していることが多い。

GH は, 視床下部・下垂体へのさまざまな侵襲に対して最も分泌不全を起こしやすい前葉ホルモンである。わずか 7 Gy の頭部照射でも, 小児では GHD が起こりうると言われており, 18 Gy を超えれば珍しくなく起こる。40 Gy を超えれば, 数年以内にはほぼ 100% に GHD が合併する。このような放射線感受性の高さから, 脳腫瘍に対する頭部照射だけでなく, 造血幹細胞移植のための全身照射などでも GHD は高い頻度で起こると考えるべきである。放射線照射量が多ければ多いほど短期間に高率で, 少ない照射では 10 年にも及ぶ経過で徐々に, GHD が完成する。

小児期の GHD は, 成長速度の低下で見つけることができる。原疾患や治療によりその可能性があるかと判断される CCS では, 成長曲線を描きながらフォローし, 標準成長曲線に比べて成長速度(成長曲線の傾き)が低下してきた場合には, GHD を疑うべきである。GHD の診断には, 身長によらず成長速度が 2 年以上にわたって  $-1.5$  SD 以下であれば成長障害の要件を満たす。脳内の器質的原因や頭部放射線照射の既往のある CCS では, GH 分泌刺激試験は 1 種類で十分であると考えられている(厚生労働省研究班による診断の手引き<sup>8)</sup>), および, 小児慢性特定疾患の認定基準)。成長障害がありながら, GH 分泌低下が認められない場合にも, GHD は年の単位で完成するので, しばらく後に再検査を行うと分泌低下を示すことも珍しくない。こうしたことを熟知して, 適切な症例には, 遅れることなく GH 治療が積極的に考慮されるべきである。

#### IV. ゴナドトロピン-性腺系の機能異常

ゴナドトロピン(Gn)-性腺系の異常は, 次項・次々項で述べられるので簡単に述べる。頭部照射では, 18 Gy を超えると女子において思春期早発症をきたすことが珍しくない。30 Gy を超えると

男子でもその可能性がある。40 Gy を超えると, 逆に GnRH 分泌が障害されて, しばしば中枢性性腺機能不全を起こす。また, 40 Gy 以上では, 視床下部による抑制が解除されて高プロラクチン血症をきたすことがあり, これも性腺機能を抑制する原因になりうる。

一方, 性腺自体への直接の障害では, アルキル化剤(とくに, busulfan と cyclophosphamide)の使用が危険因子として知られている。放射線療法では, わずか 1 Gy でも精子形成障害が起こり, 4 Gy を超えると永続的な無精子症となることが多い。Leydig 細胞障害(すなわちテストステロン分泌障害)は, 20 Gy 以上が危険因子である。テストステロン分泌障害では, 思春期の遅発や停止として現われるので, 危険因子がある場合には二次性徴に注意してフォローする必要がある。卵巣の放射線感受性は思春期開始前と後では異なっていて, 思春期前では 10~15 Gy を超えると危険因子となるが, 思春期開始後では 5~10 Gy 以上で卵巣機能不全が起こりうる。アルキル化剤に対する感受性も同様で, 思春期開始後のほうが障害されやすい。

男女いずれの場合も, 性腺機能不全では, 中枢性にしても原発性にしても, ホルモン補充療法が適切に行われることが必要である。それは, 二次性徴や性機能のためだけではなく, 骨密度の増加・維持のために不可欠と考えられるからである。小児期には, 二次性徴の完成までを目指す段階的な治療により補充療法が開始される<sup>9)</sup>。

#### V. その他の内分泌合併症

下垂体機能では, 40 Gy(とくに 50 Gy)を超えた頭部照射で, GH に加えて TSH, ACTH, 時には, ADH の分泌不全を合併することが少なくない。

甲状腺自体も放射線の影響を受けやすい。10 Gy を超えると, 甲状腺機能低下症, 時に亢進症を発症する。25 Gy を超えると甲状腺結節を起こしやすい。甲状腺癌は 20~29 Gy で最も起こりやすいと報告されている。

骨粗鬆症は, アルキル化剤(とくに, メソトレキセート)とコルチコステロイド(とくに, プレ

ドニゾンとデキサメサゾン)が危険因子となって起こりやすい。とくに、これらの併用療法, GVHD などでコルチコステロイドの長期投与, GHD・性腺機能低下・甲状腺機能亢進症などの内分泌合併症, 喫煙・アルコール・運動不足・カルシウム摂取不足などの生活習慣が危険を高める。

## VI. CCS への最近の取り組み

国内では、日本小児白血病・リンパ腫治療研究グループ (JPLSG) の長期フォローアップ委員会 (石田也寸志委員長) と、厚生労働省の研究班 (石田班) によって、身体的心理的晩期合併症や QOL の後方視的な調査が行われ、フォローアップガイドの翻訳, CCS のための健康手帳や共通治療サマリーの制作などが進行している。内分泌合併症については、日本小児内分泌学会のなかに、CCS の内分泌合併症に関する委員会 (委員長: 横谷 進) が 2006 年 9 月に発足し、長期フォローアップ委員会・研究班と歩調を合わせて活動し、現在は、内分泌合併症の早期診断と介入のためのガイドラインを作成中である。さらに、2007 年には、コンセンサス作成・小児がんフォローアップ拠点病院モデル事業・小児がん登録の基盤整備を 3 本柱とする、新たな研究班 (主任研究者: 藤本純一郎) が発足した。このように、国内ではようやく本格的な取り組みが始まったところである。

## VII. 2 つのトランジション

小児がんの治療は、小児血液・腫瘍科医・小児外科医・脳外科医など、腫瘍の専門家により行われ、通常は、これらの人々が中心となってフォローが行われている。起こりうる合併症に焦点をあてた適切なフォローアップの間に合併症 (の疑い) が生じれば、専門家に紹介されるが、これは、第 1 の移行 (トランジション) と呼ばれる。この移行がスムーズに行われるためには、適切なフォローアップとリファアの基準、そして、何よりもフォローアップ医と合併症専門医 (小児内分泌科医) の日常的な協力関係が重要である。第 2 のトランジションは、小児期から成人期への移行である。内分泌合併症は、その多くが永続的であることから、いずれは成人内分泌科医による診療に移

行しなければならない。GH 分泌不全について、日本小児内分泌学会によるトランジションのガイドラインがある<sup>10)</sup>。成人診療医にも、CCS の合併症と生涯にわたるケアについての知識と理解が求められる<sup>11)</sup>。

## おわりに

本稿の主旨は以下のとおりである。

- 1) 小児がん経験者 (CCS) のなかで、内分泌合併症の頻度は高い。
- 2) 種々の内分泌合併症の可能性は、原病と治療内容により合併症ごとに予測できる。内分泌合併症の危険因子のなかでは、頭部放射線照射、甲状腺・性腺への照射、一部のアルキル化剤と長期・大量のコルチコステロイドが重要である。
- 3) リスクに基づいたフォローアップと、小児内分泌科医への適切なリファアが強く望まれる。
- 4) 成人診療医へのトランジションが準備されなければならない。

## 文 献

- 1) 石田也寸志: 北米 Childhood Cancer Survivors Study による小児がん経験者の長期的な問題点, 第 1 編. 日小児会誌 110: 1513-1522, 2006
- 2) 石田也寸志: 北米 Childhood Cancer Survivors Study による小児がん経験者の長期的な問題点, 第 2 編. 日小児会誌 110: 1523-1533, 2006
- 3) Stevens MC, Mahler H, Parkes S: The health status of adult survivors of cancer in childhood. *Eur J Cancer* 34: 694-698, 1998
- 4) Geenen MM, Cardous-Ubbink MK, Kremer LCM, et al: Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA* 297: 2705-2715, 2007
- 5) <http://www.childrensoncologygroup.org/>
- 6) Nandagopal R, Laverdière C, Mulrooney D, et al: Endocrine late effects of childhood cancer therapy: a report from the Children's Oncology Group. *Horm Res* 69: 65-74, 2008
- 7) Gurney JG, Ness KK, Stovall M, et al: Final height and body mass index among adult survivors of childhood brain cancer: childhood cancer survivor study. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4731-4739, 2003
- 8) 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「間脳下垂体機能障害に関する調査研究」: 成長ホルモン分泌不全

- 性低身長症の診断の手引き (平成 19 年度改訂)
- 9) 横谷 進: 小児思春期における補充療法. 日内分泌会誌 82 (増刊): 53-55, 2006
- 10) 横谷 進, 依藤 亨, 田中敏章, 他, 日本小児内分泌学会成長ホルモン委員会: 成長ホルモン分泌不全性低身長症の小児期の成長ホルモン治療から成人期

の成長ホルモン治療への移行ガイドライン. 日小児会誌 110 (10): 1475-1479, 2006

- 11) 横谷 進: 第 18 回臨床内分泌代謝 Update 「臨床医に必要な Childhood Cancer Survivors (CCS) の知識」. 日内分泌会誌 84 (増刊): 掲載予定, 2008

---

## Childhood Cancer Therapy and Endocrine Complications

SUSUMU YOKOYA

*Department of Medical Subspecialties, National Center for Child Health and Development*

**Key words** : Childhood cancer survivors, Late effects, Endocrine complications, Risk-based follow-up, Transition.  
Jpn. J. Pediatr. Surg., 40(6) ; 671~675, 2008.

The incidence of the endocrine complications is the most common of the late effects observed in childhood cancer survivors (CCS). Occurrence of various endocrinopathies can be predicated by their specific risk factors, of which the most important are cranial irradiation, radiation exposure to thyroid or sex glands, and chemotherapy including use of alkylating agents and corticosteroids. Thus risk-based follow-up and adequate referral to pediatric endocrinologists (first transition) are essential. This will assure CCSs' growth, sexual development, and acquisition of bone mineral content to remain normal. Transition from pediatric to adult care (second transition) is another issue to be resolved.

\*

\*

\*

# Association of a missense single nucleotide polymorphism, Cys1367Arg of the WRN gene, with the risk of bone and soft tissue sarcomas in Japan

Robert Nakayama,<sup>1,2</sup> Yasunori Sato,<sup>1</sup> Mitsuko Masutani,<sup>3</sup> Hideki Ogino,<sup>3</sup> Fumihiko Nakatani,<sup>4</sup> Hirokazu Chuman,<sup>4</sup> Yasuo Beppu,<sup>4</sup> Hideo Morioka,<sup>2</sup> Hiroo Yabe,<sup>2</sup> Hiroshi Hirose,<sup>5</sup> Haruhiko Sugimura,<sup>6</sup> Hiromi Sakamoto,<sup>1</sup> Tsutomu Ohta,<sup>1</sup> Yoshiaki Toyama,<sup>2</sup> Teruhiko Yoshida<sup>1,7</sup> and Akira Kawai<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Genetics Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045; <sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582; <sup>3</sup>ADP-ribosylation in Oncology Project, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045; <sup>4</sup>Division of Orthopedic Surgery, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045; <sup>5</sup>Health Center, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582; <sup>6</sup>Department of Pathology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu-shi, Shizuoka, 431-3192 Japan

(Received June 5, 2007/Revised October 3, 2007/Accepted October 15, 2007/Online publication February 4, 2008)

Bone and soft tissue sarcomas (BSTSs) are rare malignant tumors of mesenchymal origin. Although BSTSs frequently occur in some hereditary cancer syndromes with germline mutations of DNA repair genes, genetic factors responsible for sporadic cases have not been determined. In the present study we undertook a case-control study and analyzed possible associations between the susceptibility to BSTS and the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes. Genomic DNAs extracted from case and control peripheral blood leukocytes were genotyped by pyrosequencing. For candidate polymorphisms, we chose 50 non-synonymous missense SNPs, which we have previously been identified by resequencing 36 DNA repair genes among the Japanese population. In the first screening, we analyzed 240 cases and 685 controls and selected six SNPs at the significance level of  $P < 0.1$  (Fisher's exact test). The six SNPs were further analyzed in the second genotyping on an additional set of 304 cases and 834 controls. In the joint analysis (the first and second genotyping combined) of 544 cases and 1378 controls, Cys1367Arg of the WRN gene was found to be a protective factor of BSTS (odds ratio = 0.66, 95% confidence interval = 0.49–0.88,  $P = 0.005$ ). An exploratory subgroup analysis without multiple comparison adjustment suggested that the WRN-Cys1367Arg SNP is associated with soft tissue sarcomas, sarcomas with reciprocal chromosomal translocations and malignant fibrous histiocytoma. (*Cancer Sci* 2008; 99: 333–339)

**B**one and soft tissue sarcomas (BSTSs) are non-epithelial, non-hematological malignant tumors of mesenchymal origin. Three characteristics of BSTS are that: (i) they are rare malignancies; (ii) they develop at a variety of sites; any mesenchymal tissues throughout the body; and (iii) show highly heterogeneous histological types. In the United States, the incidence of malignant bone tumors is estimated to be around 0.8 per 100 000 population,<sup>(1)</sup> and that of soft tissue sarcomas (STS) approximately 5.0 per 100 000.<sup>(2)</sup> It is estimated that 2370 bone and joint malignancies and 9220 malignant soft tissue tumors would newly develop in 2007.<sup>(3)</sup>

The rarity and the histological heterogeneity of BSTSs have hampered the identification of the risk factors and etiology. BSTSs show a slight male predominance, and the incidence of these rare tumors both in Japan and in other countries seems to be stable in the last several decades except for an increase in Kaposi sarcoma as reported in the United States.<sup>(4,5)</sup> This appears to be in contrast to several other types of cancers, such as gastrointestinal or gynecologic cancers, which have shown a significant change in incidence in Japan probably due to the change in environmental and life style factors. No significant

racial variation has been noted in the overall incidence of sarcomas with some exceptions, such as Ewing sarcoma, which reportedly occurs more frequently in Caucasians.<sup>(6)</sup>

To date, some environmental and genetic factors for BSTS risk have been suggested. The environmental factors include external radiation therapy,<sup>(7)</sup> Thorotrast, arsenical pesticides and medications, phenoxyherbicides, dioxin, vinyl chloride, immunosuppressive drugs, alkylating agents, androgen-anabolic steroids, human immunodeficiency virus, and human herpes virus type 8.<sup>(5)</sup> Information on the genetic factors has so far been limited to certain monogenic hereditary cancer syndromes known to be associated with the incidence of BSTS, such as Li-Fraumeni syndrome, hereditary retinoblastoma, and Werner syndrome with a germline mutation of *TP53*, *RBI*, and *WRN*, respectively. These genes are involved in DNA repair and related systems. Other monogenic hereditary syndromes are also associated with the specific type of multiple benign tumors and their malignant transformation, such as multiple neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1, and multiple osteochondromas and chondrosarcomas in hereditary multiple exostosis, that have a germline mutation of *NFI* and *EXT1/2*, respectively.

Recently, BSTSs have been considered to be divided into two distinct entities based on their somatic genetic aberrations. One group is characterized by reciprocal chromosome translocations resulting in tumor-specific fusion genes, which may be a critical step for pathogenesis. Another group of sarcomas tend to show complex abnormalities in the karyotypes, suggesting an overall increase in genetic and chromosomal instability. However, the precise mechanisms of tumorigenesis in both groups remain unclear.

The characteristic increase in the risk of BSTS in inherited diseases caused by germline mutations in the DNA repair and related systems has prompted us to investigate the association of the DNA repair gene polymorphisms with the risk of BSTSs. A case-control study was carried out on 544 cases with BSTS and 1378 controls at 50 non-synonymous coding single nucleotide polymorphisms (cSNPs), which we have identified by resequencing of 36 candidate genes on a Japanese population<sup>(8)</sup>. Associated studies of common polymorphisms of the DNA repair genes have already been reported in many types of cancer,<sup>(9)</sup> but to our knowledge, this study is the first report on BSTS.

<sup>7</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: tyoshida@ncc.go.jp

Table 1. Fifty missense single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes grouped by their representative pathways

DNA repair gene	Gene name	SNP	Amino acid change
Base excision repair			
<i>PARP-1/ADPRT1</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	T2444C A2978G	Val762Ala Lys940Arg
<i>APE1/APEX</i>	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	A395G T649G	Ile64Val Asp148Glu
<i>MBD4</i>	Methyl-CpG binding domain protein 4	G1212A	Glu346Lys
<i>NUDT1</i>	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1	G273A	Val83Met
<i>OGG1</i>	8-oxoguanine DNA glycosylase	C2243G	Ser326Cys
<i>XRCC1</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	C685T G944A G1301A	Arg194Trp Arg280His Arg399Gln
Nucleotide excision repair			
<i>ERCC5/XPB</i>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	C3507G	His1104Asp
<i>ERCC6/CSB</i>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6	G1275A	Gly399Asp
<i>XPC</i>	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	A2655C	Lys822Gln
<i>XPDI/ERCC2</i>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2	G1615A A2932C	Asp312Asn Lys751Gln
Mismatch repair			
<i>MLH1</i>	mutL homolog 1, colon cancer, non-polyposis type 2	A676G	Ile219Val
<i>MLH3</i>	mutL homolog 3 ( <i>Escherichia coli</i> )	C2645T C2939T	Pro844Leu Thr942Ile
<i>MSH2</i>	mutS homolog 2 ( <i>E. coli</i> )	C91T	Thr8Met
<i>MSH3</i>	mutS homolog 3 ( <i>E. coli</i> )	A3122G	Thr1036Ala
<i>MSH6</i>	mutS homolog 6 ( <i>E. coli</i> )	G203A	Gly39Glu
DNA damage response genes			
<i>TP53</i>	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	G466C	Arg72Pro
DNA double strand break repair			
<i>BLM</i>	Bloom syndrome	C967T G4035A	Thr298Met Val1321Ile
<i>BRCA2</i>	Breast cancer 2, early onset	A1342C	Asn372His
<i>KIAA0086</i>	DNA cross-link repair 1A	C1867G	His317Asp
<i>LIG4</i>	DNA ligase IV	A2245G	Ile591Val
<i>NBS1</i>	Nijmegen breakage syndrome 1	G605C	Glu185Gln
<i>RAD51L3</i>	RAD51-like 3 ( <i>S. cerevisiae</i> )	G501A	Arg126Gln
<i>RAD54L</i>	RAD54-like ( <i>S. cerevisiae</i> )	A551G	Lys151Glu
<i>RINT1</i>	RAD50 interactor 1	G33C	Glu4Gln
<i>WRN</i>	Werner syndrome	C2573T T4330C	Thr781Ile Cys1367Arg
<i>XRCC3</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3	C1075T	Thr241Met
DNA polymerase			
<i>POLD1</i>	Polymerase (DNA directed), delta 1	G409A	Arg119His
<i>POLH/XPV/RAD30</i>	Polymerase (DNA directed), eta	A1840G	Lys535Glu
<i>POLII/RAD30B</i>	Polymerase (DNA directed) iota	A2180G	Thr706Ala
<i>POLL</i>	Polymerase (DNA directed), lambda	C1683T	Arg438Trp
<i>POLZ/REV3</i>	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast)	C4259T	Thr1146Ile
<i>REV1</i>	REV1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	T982C A1330G	Phe257Ser Asn373Ser
Other pathways			
<i>FANCA</i>	Fanconi anemia, complementation group A	G827A G1080A A1532G A2457G	Ala266Thr Arg350Gln Ser501Gly Asp809Gly
<i>FANCE</i>	Fanconi anemia, complementation group E	C3294T G451T G1213A	Ser1088Phe Arg89Leu Arg343Gln
<i>FANCF</i>	Fanconi anemia, complementation group F	A983G	Lys324Glu
<i>FANCG/XRCC9</i>	Fanconi anemia, complementation group G	C1382T	Thr297Ile

ADP, adenosine diphosphate;



Table 2. Case and control subjects

		1st screening		2nd genotyping		Joint analysis	
		Case	Control	Case	Control	Case	Control
Gender	Male	143	483	174	492	317	875
	Female	97	202	130	342	227	503
Age	<40	109	113	127	214	236	318
	≥40	131	572	177	620	308	1060
Institutions <sup>1</sup>	NCCH	240	242	127		367	242
	NCCE			19		19	
	KEIO		302	158	507	158	809
	IWT				327		327
	NNH		141				
Total		240	685 <sup>1</sup>	304	834	544	1378 <sup>2</sup>

Distributions of gender, age and five institutions where case and/or control subjects were recruited are listed. <sup>1</sup>The 685 controls in the first screening are from our published data (8). <sup>2</sup>The 141 NNH control data were not available for the joint analysis. KEIO, Keio University Hospital, Tokyo; IWT, Iwata Hospital, Shizuoka; NCCE, National Cancer Center East, Chiba; NCCH, National Cancer Center Hospital, Tokyo; NNH, National Nishigunma Hospital, Gunma.

Table 3. Histological distribution of the cases and subgroup classification

Bone sarcoma		Soft tissue sarcoma		Subgroup	Total (%)
Osteosarcoma	105	Liposarcoma	111	ALL	544 (100.0)
Chondrosarcoma	41	MFH	92	BS/STS	
EWS/PNET	18	Synovial sarcoma	38	BS	190 (34.9)
MFH	11	Leiomyosarcoma	19	STS	354 (65.1)
Chordoma	8	MPNST	19	Translocation	
Adamantinoma	3	Dermatofibrosarcoma protuberance	17	(+)	154 (28.3)
Leiomyosarcoma	2	EWS/PNET	15	(-)	390 (71.7)
MPNST	1	EMC	7	Histopathology	
Fibrosarcoma	1	Osteosarcoma	6	Osteosarcoma	111 (20.4)
	190	Fibrosarcoma	5	MFH	103 (18.9)
		Epithelioid sarcoma	5	Liposarcoma	111 (20.4)
		Rhabdomyosarcoma	6	Others	219 (40.3)
		Angiosarcoma	6		
		Alveolar soft part sarcoma	4		
		Clear cell sarcoma	2		
		Mesenchymal chondrosarcoma	1		
		Hemangiopericytoma	1		
			354		

ALL, all samples; BS, bone sarcomas; EMC, extraskeletal myxoid chondrosarcoma; EWS/PNET, Ewing sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor; MFH, malignant fibrous histiocytoma; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor; STS, soft tissue sarcomas; Translocation (+), sarcomas with reciprocal chromosomal translocations; Translocation (-), sarcomas without reciprocal chromosomal translocations.

## Materials and Methods

**Study design, case and control subjects.** Genotype data of the 50 SNPs,<sup>(8)</sup> in Table 1 from 240 cases and 685 controls were analyzed as the first screening to select those SNPs to be subjected to the second genotyping in the additional 304 cases and 834 controls. In this study, we used a joint analysis,<sup>(10)</sup> in which the results of the second genotyping were combined with those of the first genotyping (Table 2).

The cases were recruited in three hospitals (National Cancer Center Hospital [NCCH], Tokyo, National Cancer Center East Hospital, Chiba [NCCE], and Keio University Hospital, Tokyo [KEIO]) from January 2004 to March 2005 (Table 2). The patients, all Japanese, were either newly diagnosed as BSTS or had been followed up in an outpatient clinic for the history of BSTS. The cases consisted of various histological subtypes, which were confirmed by histological examination in each hospital (Table 3).

We used 685 control subjects in the first screening, which were the same control population as those used in our previous

study on the same set of SNPs but on a different type of malignancy, lung cancer (Table 2).<sup>(8)</sup> Those subjects consisted of 383 non-cancer patients in two hospitals (NCCH and National Nishigunma Hospital, Gunma [NNH] in Table 2) and 302 healthy volunteers in KEIO (Table 2). We did not, however, include the 141 control subjects from NNH (Table 2) in the subsequent joint analysis, because their individual genotyping data have not been published and are unavailable for analyses other than the lung cancer study. In the second genotyping, we analyzed additional samples from 834 people who participated in the health examination programs (KEIO and Iwata Hospital, Shizuoka [IWT] in Table 2). We consider that these subjects were suitable enough as controls for our cases; most of the control subjects in this study were also analyzed in our separate gastric cancer project involving a SNP-based genome scan, and its data suggested little if any population stratification (unpublished data, 2007). Therefore, the control subjects for the joint analysis totaled 1378 people with a criterion of no history of cancer during the study period (Table 2).

Subgroup analysis was carried out on the subgroups defined by Table 3. For the 'sarcomas with reciprocal chromosomal

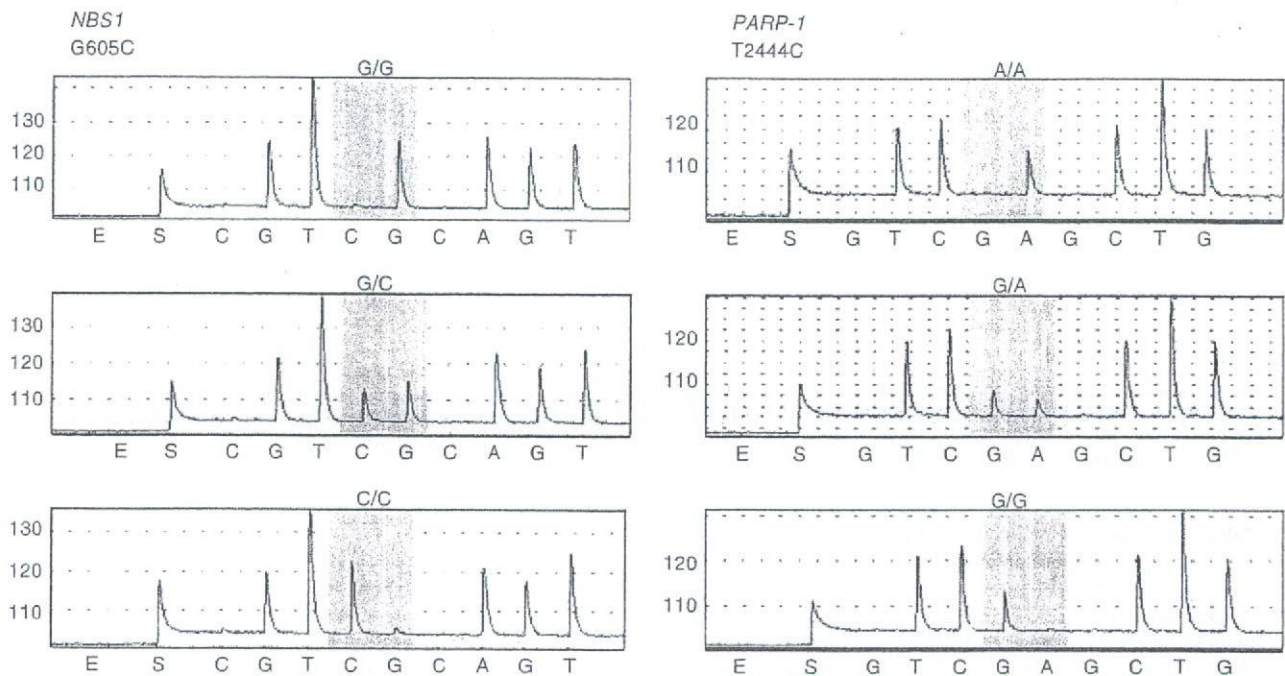


Fig. 1. Genotyping by pyrosequencing. (a) NBS1-Glu185Gln (G605C) and (b) PARP-1-Val762Ala (T2444C) (sequencing in reverse direction). Top, major homozygote; middle, heterozygote; and bottom, minor homozygote.

translocations', we included synovial sarcoma, Ewing sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor, myxoid/round cell liposarcoma, clear cell sarcoma, dermatofibrosarcoma protuberance, extraskeletal myxoid chondrosarcoma, and alveolar soft part sarcoma. The specific fusion genes have been reported for those sarcomas, and cytogenetic examinations are routine for their histological diagnosis.<sup>(11)</sup>

This study was approved by Institutional Review Board of each institution, and all of the subjects signed an informed consent form to participate in the study.

**DNA extraction and genotyping.** From each individual we obtained a 10–20-mL sample of whole blood. Genomic DNAs were isolated directly from the samples using Blood Maxi Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) or FlexiGene DNA Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Ten nanograms of genomic DNA were subjected to genotyping for 50 SNPs by pyrosequencing using the PSQ96 system (Pyrosequencing, Uppsala, Sweden) as described previously.<sup>(12)</sup> Briefly, a genomic fragment containing an SNP site was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with a set of PCR primers, one of which was biotinylated. The PCR products were purified using streptavidin-modified paramagnetic beads (Dynabeads M-280; Dynal, Skoyen, Norway), denatured and subjected to nucleotide sequencing by pyrosequencing chemistry. Quality of the SNP typing was confirmed by inspection of the sequence data and by Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) tests.

**Statistical analysis.** Fisher's exact test, odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were used to analyze association of the SNPs and BSTS risk in allele, dominant (i.e. aa + aA vs AA, where 'A' is major allele and 'a' is minor allele) and recessive (i.e. aa vs aA + AA) models.<sup>(13)</sup> Crude OR was used for the allele model, while the dominant and recessive models were analyzed using OR adjusted for age ( $\geq 40$  vs  $< 40$ , see Suppl. Fig. S1 online) and gender with 95% CI calculated using a logistic regression analysis. When statistical calculation is not applicable due to 0 subjects being in a cell of a contingency table, we indicate the result as 'NA'.

In order to identify disease-associated SNPs, the following criteria were used: candidate SNPs were selected by *P*-value

$< 0.10$  on the allele model in the first screening, and then disease associated-SNPs were statistically identified by the allele model in the joint analysis with a multiple comparison adjustment using the Holm's method,<sup>(14)</sup> for six SNPs. Please note that the family wise error rate may be inflated by a few percent, depending on the number of the true SNPs present in the initial 50 SNPs, by this method of multiple comparison adjustment, because the first and second screenings are not independent in the joint analysis (see Suppl. Table S1 online).

A subgroup analysis was carried out as an exploratory, adjunct analysis without multiple comparison adjustment to address the histological heterogeneity of BSTS. Because the subgroups showed different age preferences, dominant and recessive models were used in order to adjust age and gender by multiple logistic regression.

## Results

**Results of the joint analysis.** The typical pyrosequencing data are shown in Fig. 1, and the results of the two-stage genotyping are summarized in Table 4. Minor allele frequencies and *P*-values of the HWE tests are also listed in Table 4. The six SNPs were selected by the first screening, and the final statistical gene selection was made using all the samples genotyped in the first screening and the second genotyping combined, except 141 controls from Nishigunma Hospital (cases = 544 and controls = 1378 in total). We identified a SNP, WRN-Cys1367Arg, whose allele frequency was significantly different between all BSTS cases and the control subjects (OR = 0.66, 95% CI = 0.49–0.88,  $P = 0.005$  and  $P = 0.03$ , before and after six-SNP multiple comparison adjustment by Holm's method, respectively), showing a protective effect. The minor allele frequency of the SNP is 8.2%.

**Subgroup analysis.** Since BSTS is characterized by the substantial heterogeneity in its histology, the effects of the DNA repair gene polymorphisms might differ among the subgroups. The results of the subgroup analysis of the WRN-Cys1367Arg SNP are shown in Table 5. Although under-powered and exploratory in nature, the subgroup analysis suggested that the difference in genotype frequency of WRN-Cys1367Arg between the cases and controls

Table 4. Statistics of allele model analysis for the single nucleotide polymorphisms (SNPs) selected in the first screening by  $P < 0.1$

Gene	SNP		Minor allele frequency		HWE (P-value)		OR	Allele model	
			Cases (n)	Controls (n)	Cases	Controls		95% CI	P-value
MBD4	G1212A	1st screening	0.304 (240)	0.349 (685)	0.545	0.207	0.82	0.65–1.02	0.083
		Joint analysis	0.335 (544)	0.353 (1378)	0.620	0.199	0.92	0.79–1.07	0.286
MSH6	G203A	1st screening	0.275 (240)	0.323 (685)	0.074	0.793	0.80	0.63–1.00	0.057
		Joint analysis	0.304 (544)	0.310 (1378)	0.434	0.621	0.97	0.84–1.13	0.750
PARP-1	A2978G	1st screening	0.077 (240)	0.050 (685)	1.000	1.000	1.58	1.04–2.38	0.044
		Joint analysis	0.066 (544)	0.052 (1378)	1.000	0.509	1.30	0.97–1.74	0.098
REV1	A1330G	1st screening	0.023 (240)	0.043 (685)	1.000	1.000	0.52	0.27–1.00	0.055
		Joint analysis	0.029 (544)	0.044 (1378)	0.042	0.680	0.67	0.45–0.99	0.049
WRN	T4330C	1st screening	0.056 (240)	0.090 (685)	1.000	0.480	0.61	0.40–0.93	0.024
		Joint analysis	0.052 (544)	0.082 (1378)	0.213	0.619	0.66	0.49–0.88	0.005
XRCC1	C685T	1st screening	0.279 (240)	0.327 (685)	0.016	1.000	0.80	0.63–1.00	0.058
		Joint analysis	0.292 (544)	0.323 (1378)	0.587	0.811	0.87	0.74–1.01	0.073

CI, confidence interval; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; OR, odds ratio.

Table 5. Statistics of subgroup analysis using recessive and dominant models

SNP	Subgroup	(n)	Recessive model <sup>†</sup>			Dominant model <sup>‡</sup>		
			OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
WRN	ALL	544	0.43	0.09–2.01	0.442	0.66	0.48–0.91	0.011
T4330C	BS	190	NA	NA–NA	0.489	0.85	0.53–1.37	0.589
Cys1367Arg	STS	354	0.72	0.16–3.32	0.998	0.58	0.40–0.85	0.005
	Translocation (+)	154	NA	NA–NA	0.632	0.52	0.29–0.95	0.034
	Translocation (-)	390	0.61	0.13–2.86	0.817	0.72	0.51–1.02	0.068
	Osteosarcoma	111	NA	NA–NA	0.826	1.00	0.56–1.80	1.000
	MFH	103	NA	NA–NA	1.000	0.45	0.22–0.94	0.032
	Liposarcoma	111	NA	NA–NA	0.911	0.72	0.40–1.31	0.346

Odds ratios (OR) adjusted for age ( $\geq 40$ ,  $< 40$ ) and gender with 95% confidence intervals (CI) were calculated using a logistic regression analysis for all subgroups. Cases = 544 and Controls = 1378 in total. <sup>†</sup>Recessive model is aa versus aA + AA. <sup>‡</sup>Dominant model is aa + aA versus AA, where a is a minor allele. ALL, all samples; BS, bone sarcomas; MFH, malignant fibrous histiocytoma; NA, statistical calculation not applicable, because the number of the subjects is less than five in any cell in a contingency table; SNP, single nucleotide polymorphism; STS, soft tissue sarcomas; Translocation (+), sarcomas with reciprocal chromosomal translocations; Translocation (-), sarcomas without reciprocal chromosomal translocations.

appears to be significant in STS, sarcomas with reciprocal chromosomal translocations and malignant fibrous histiocytoma. It is noted, however, that the effect direction of the minor allele (Arg1367) of this SNP was protective in all of the subgroups, except osteosarcoma (OR = 1.00), irrespective of the statistical significance. The subgroup analysis data of the other five SNPs analyzed in the second stage is shown in Suppl. Table S2 online.

## Discussion

This study attempted the first systematic survey on the possible role of DNA repair gene polymorphisms in the susceptibility to sporadic BSTS. From the joint analysis of the two-stage case-control study on total 544 cases with BSTS of various histology and 1378 controls, a missense SNP of the WRN gene, Cys1367Arg, was identified. WRN is a member of the RecQ family of DNA helicases, and mutations of the gene can give rise to a rare autosomal recessive genetic instability disorders, Werner syndrome (WS).<sup>(15)</sup> WS is a premature aging disease characterized by predisposition to cancer and the early onset of symptoms related to normal aging.<sup>(16)</sup> The types of cancer with elevated risk appear selective, including soft tissue sarcomas, thyroid carcinoma, malignant melanoma, meningioma, hematological malignancies, and osteosarcoma. A diversity of malignancies was found in WS in the literature from 1939 to 1995, but it is noteworthy that the ratio of epithelial to nonepithelial cancers was about 1:1, instead of the usual 10:1.<sup>(17)</sup> BSTS make up more than 20% of cancer arising in WS patients.<sup>(17)</sup> Soft tissue sarcomas that have been

identified in WS patients include malignant fibrous histiocytoma, malignant peripheral nerve sheath tumor, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma, and synovial sarcoma. The reason for the high representation of mesenchymal tumors in WS patients has not been clarified.

WRN encodes a protein with 1432 amino acids that possesses both 3'→5' DNA helicase and 3'→5' DNA exonuclease activities. DNA helicases are enzymes that unwind the energetically stable double-stranded structure of DNA to provide a single-stranded template for important cellular processes such as replication, base excision repair, homologous recombination, and telomere maintenance.<sup>(15,18,19)</sup>

Several epidemiological studies have already been carried out on WRN-Cys1367Arg. Most of those studies focused on the diseases relating to the WS phenotype, such as myocardial infarction, diabetes mellitus and lymphomas. The more frequent Cys1367 allele has been reported to be associated with a lower frequency of osteoporosis in postmenopausal Japanese women,<sup>(20)</sup> whereas the minor allele Arg1367 may be associated with a lower risk of myocardial infarction and type 2 diabetes mellitus in the Japanese population.<sup>(21,22)</sup> With regard to cancer risk, Arg1367 was reported to be associated with a decreased risk of non-Hodgkin lymphoma among women in Connecticut.<sup>(23)</sup> Of note, in three out of the four reports listed above, WRN-Cys1367Arg showed protective effects against the various diseases associated with WS phenotype, and the same held true for our observations on BSTS.

Based on the observations that all of the pathogenic WRN mutations identified so far result in truncation of the C-terminal

of the WRN protein, it has been proposed that a lack of the C-terminal nuclear localization signal is important in the pathogenesis of WS.<sup>(24,25)</sup> Although WRN-Cys1367Arg is located adjacent to the nuclear localization signal, a previous report has failed to detect any significant difference between WRN (Arg1367) and WRN (Cys1367) with respect to their nuclear localization,<sup>(26)</sup> or helicase and helicase-coupled exonuclease activity.<sup>(27)</sup> Other possible explanations for the observed association include the allelic difference of WRN-Cys1367Arg in the interactions with other proteins or the presence of unknown functionally responsible polymorphisms that are in linkage disequilibrium with WRN-Cys1367Arg.

Some of the SNPs on the genes responsible for a hereditary form of cancer have shown association with a sporadic form of the same type of cancer.<sup>(28-31)</sup> Our findings on the WRN SNP on BSTS may add another example of the possible sharing, at least in part, of the oncogenesis pathway between the monogenic and polygenic forms of the same type of cancer and a continuity of the genotype-phenotype spectrum.

It may be controversial to analyze the possible genetic backgrounds with all types of BSTS combined because of its highly heterogeneous nature in histology. However, little if any information is currently available on the genetic predisposition to the

sporadic forms of BSTS, and genetic factors that are common to most BSTSs may exist, as well as those specific to certain subgroups. As one of the first exploratory analyses on the genetic susceptibility of sporadic BSTS, the primary role of this study is to generate hypotheses, which deserve further validation. To validate the hypothesis, evidence should be sought both in statistical replication and meta-analysis using future case-control panels and also in biological functional analyses.

## Acknowledgments

We are grateful to Dr Matsuhiko Hayashi and Dr Yoichi Ohno of Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, and Dr Fumihiko Tanioka of Department of Pathology and Laboratory Medicine, Iwata Municipal General Hospital for their help in collecting blood samples, and Ms. Sachiyo Mimaki and Mr Hirohiko Totsuka of the Center for Medical Genomics, National Cancer Center for providing considerable contributions to DNA sequencing and statistical analysis. This study was supported by the program for promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NiBio) and in part by Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Area (18014009) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

## References

- Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer* 1995; 75: 203-10.
- Toro JR, Travis LB, Wu HJ, Zhu K, Fletcher CD, Devesa SS. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: an analysis of 26 758 cases. *Int J Cancer* 2006; 119: 2922-30.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66.
- Ross JA, Severson RK, Davis S, Brooks JJ. Trends in the incidence of soft tissue sarcomas in the United States from 1973 through 1987. *Cancer* 1993; 72: 486-90.
- Zahm SH, Fraumeni JF Jr. The epidemiology of soft tissue sarcoma. *Semin Oncol* 1997; 24: 504-14.
- Polednak AP. Primary bone cancer incidence in black and white residents of New York State. *Cancer* 1985; 55: 2883-8.
- Mark RJ, Poen J, Tran LM, Fu YS, Selch MT, Parker RG. Postirradiation sarcomas. A single-institution study and review of the literature. *Cancer* 1994; 73: 2653-62.
- Sakiyama T, Kohno T, Mimaki S *et al*. Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes TP53, POLI, REV1 and LIG4 with lung cancer risk. *Int J Cancer* 2005; 114: 730-7.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1513-30.
- Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006; 38: 209-13.
- Sandberg AA. Cytogenetics and molecular genetics of bone and soft-tissue tumors. *Am J Med Genet* 2002; 115: 189-93.
- Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res* 2000; 10: 1249-58.
- Breslow NE, Day NE. Statistical methods in cancer research. Vol. I. the analysis of case-control studies. *IARC Sci Pub* 1980: 5-338.
- Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statistics* 1979; 6: 65-70.
- Yu CE, Oshima J, Fu YH *et al*. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996; 272: 258-62.
- Epstein CJ, Martin GM, Schultz AL, Motulsky AG. Werner's syndrome: a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)* 1966; 45: 177-221.
- Goto M, Miller RW, Ishikawa Y, Sugano H. Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 239-46.
- Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS *et al*. The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 1997; 17: 100-3.
- Kamath-Loeb AS, Shen JC, Loeb LA, Fry M. Werner syndrome protein. II. Characterization of the integral 3'→5' DNA exonuclease. *J Biol Chem* 1998; 273: 34 145-50.
- Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Koshizuka Y, Nakamura K, Kawaguchi H. A polymorphic variant at the Werner helicase (WRN) gene is associated with bone density, but not spondylosis, in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 2001; 19: 296-301.
- Ye L, Miki T, Nakura J, Oshima J *et al*. Association of a polymorphic variant of the Werner helicase gene with myocardial infarction in a Japanese population. *Am J Med Genet* 1997; 68: 494-8.
- Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y *et al*. WRN gene 1367 Arg allele protects against development of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 69: 287-92.
- Shen M, Zheng T, Lan Q *et al*. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin lymphoma among women in Connecticut. *Hum Genet* 2006; 119: 659-68.
- Matsumoto T, Shimamoto A, Goto M, Furuichi Y. Impaired nuclear localization of defective DNA helicases in Werner's syndrome. *Nat Genet* 1997; 16: 335-6.
- Yu CE, Oshima J, Wijsman EM *et al*. Mutations in the consensus helicase domains of the Werner syndrome gene. Werner's Syndrome Collaborative Group. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 330-41.
- Bohr VA, Metter EJ, Harrigan JA *et al*. Werner syndrome protein 1367 variants and disposition towards coronary artery disease in Caucasian patients. *Mech Ageing Dev* 2004; 125: 491-6.
- Kamath-Loeb AS, Welcsh P, Waite M, Adman ET, Loeb LA. The enzymatic activities of the Werner syndrome protein are disabled by the amino acid polymorphism R834C. *J Biol Chem* 2004; 279: 55 499-505.
- Healey CS, Dunning AM, Teare MD *et al*. A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability. *Nat Genet* 2000; 26: 362-4.
- Slatery ML, Samowitz W, Ballard L, Schaffer D, Leppert M, Potter JD. A molecular variant of the APC gene at codon 1822: its association with diet, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1000-4.
- Freedman ML, Penney KL, Stram DO, Le Marchand L *et al*. Common variation in BRCA2 and breast cancer risk: a haplotype-based analysis in the Multiethnic Cohort. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2431-41.
- Freedman ML, Penney KL, Stram DO *et al*. A haplotype-based case-control study of BRCA1 and sporadic breast cancer risk. *Cancer Res* 2005; 65: 7516-22.