

2009-4010A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清河 信敬

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清河 信敬

平成22（2010）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報の体系的解析と、 その知見に基づく診断治療法の開発に関する研究	-----	1
清河信敬		

II. 分担研究報告

1. 難治性小児がんの網羅的糖鎖・ゲノム解析とその臨床応用	-----	13
清河信敬		
2. 小児がんの中央診断と保存検体を活用したトランスレーショナルリサーチ	-----	16
藤本純一郎		
3. 小児がんの遺伝子変異解析	-----	19
林泰秀		
4. 小児がんの網羅的ゲノム解析による治療標的分子の探索	-----	24
小川誠司		
5. ゲノム・遺伝子発現情報からみた小児がんの臨床的特性の解明	-----	28
大平美紀		
6. 難治性小児がんの悪性度診断	-----	31
中川温子		
7. 難治性小児がんの薬物代謝関連遺伝子多型解析とその臨床応用	-----	36
森鉄也		
8. 難治性小児がんの臨床的特性の解析と新規診断・治療法開発	-----	40
大喜多肇		
9. 小児造血器腫瘍の遺伝子診断と分子モニタリングに関する研究	-----	43
横澤敏也		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 46

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 50

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

研究代表者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部長

研究要旨： 難治性小児がんの治療予後向上を目指し、臨床的特性に関する分子情報の体系的解析とその知見の診断治療法開発への応用を目的とした包括的・体系的な生体分子情報解析を継続した。(1)小児急性リンパ芽球性白血病(ALL)のマイクロアレイによる網羅的発現遺伝子解析を行いB前駆細胞型およびT細胞型に特徴的な発現遺伝子群を明らかにした。(2)神経芽腫以外の小児固形腫瘍におけるALK遺伝子の関与について検討し、横紋筋肉腫とEwing肉腫(ESFT)で高度増幅と変異を検出し、ALKが同腫瘍群の治療標的になりうることを示した。(3)小児急性骨髄性白血病(AML)患児につきWT1遺伝子変異を有する症例はKIT変異の割合が有意に高く、寛解導入率、無病生存率、全生存率が低い傾向があることを明らかにした。(4)11p15転座型(NUP98遺伝子再構成)小児白血病ではKIT、FLT3-ITDとWT1遺伝子の変異が高頻度で、その予後不良の原因である可能性を明らかにした。(5)肝芽腫のゲノムパターンによるリスクグループ分類の再現性を追加症例により確認し、その有用性を示した。(6)小児AMLの診断時キメラ遺伝子スクリーニングとAML1-ETOを利用した治療後の微小残存病変の解析を継続した。(7)ESFTの標的遺伝子であるDKK1/DKK2の下流因子の候補を同定するとともに、DKK2の発現抑制がEwing肉腫細胞に与える影響やEWS/ETSとWNTシグナルの関係について明らかにした。(8)発がん重要なcyclin kinase inhibitorの発現解析を行い、従来の組織学的診断によらない悪性度診断の確立、分子標的療法の開発を行なった。(9)小児がんのトランスレーショナルリサーチ推進を支えるためのバイオリソース形成を目的に小児固形腫瘍・白血病の中央診断と検体保存を継続し、腫瘍生物学的特性を指標とした悪性度診断を確立するための悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫等の中央診断システムの確立と診断法の標準化、フローサイトメトリーによる10カラー解析や新規検査項目を加えた新たな小児白血病マーカー診断システムや、治療8日目の末梢血残存白血病細胞数測定法の確立を行なった。

研究分担者

藤本純一郎

・国立成育医療センター研究所副所長

林泰秀

・群馬県立小児医療センター院長

小川誠司

・東京大学医学部附属病院 特任准教授

大平美紀

・千葉県がんセンター 室長

中川温子

・国立成育医療センター 医長

森鉄也

・国立成育医療センター 医長

大喜多肇

・国立成育医療センター研究所 室長

横澤敏也

・独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター 室長

A. 研究目的

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

績改善には結びついておらず、一部の小児がんは依然予後不良である。このような現状の克服には、上記解析に加え、全ゲノム的な遺伝子構造やエピゲノムの異常、蛋白糖鎖発現等の生体分子情報を網羅的に解析し、小児がんの臨床的特性にかかわる異常を包括的に解明していくことが必須である。また、人種差を考慮すると我国独自の研究の推進が必要である。

そこで本研究では、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫、Wilms 腫瘍、神経芽腫、難治例や再発例を含む小児白血病等の臨床検体に対し、包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）を行って、難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報を網羅的に明らかにし、その知見に基づいた新規診断・治療法開発を行うことを目的とする。特に、急速な進展や再発を繰り返す亜型の分子特性を明らかにし、QOL 改善を目標とした予後予知法確立や新規治療モデルの提示を目指す。小児がんは、成人のがんと比較した場合、発生頻度としては非常に低く、症例数も少ない希少疾患であり、上記目的を達成するためには、全国的規模の臨床共同研究の枠組みの中で中央診断および検体保存を行い、保存された臨床検体を有効に基礎研究に活用することが不可欠である。また、このようなシステムを構築することにより、基礎研究で得られた知見を診断・治療面で臨床へフィードバックすることが容易になり、トランスレーショナルリサーチの推進にも寄与するものと期待される。

一方、本邦においては、小児がんの登録システムさえも十分に確立されていない。そこで本研究では、種々の小児固形腫瘍および白血病・リンパ腫に対する中央診断と検体保存のシステムを構築するとともに、診断や治療層別化に応用可能な研究的検査法を開発して臨床に還元する研究も合わせて実施する。本研究の実施によって、小児がんの臨床特性に関連する分子情報が明らかになり、その成果が新たな分子標的の同定に結びついて、診断法の標準化や新規治療戦略を提案することが可能となり、難治性小児がんの治療成績向上に寄与でき、小児がんの予後や QOL が改善され、健全な次世代を育む環境整備が可能となる。以上により、厚生労働行政にも貢献可能である。

B. 研究方法

1. ゲノム異常の網羅的探索：

腫瘍試料から抽出したゲノム DNA につき、GenChip 50K/250K Array、(Affimetrix 社)、ヒトオリゴアレイ (Agilent 社) あるいは BAC アレイ (UCSF 製) を用いて網羅的ゲノムコピー数解析を行った。結果につき、FISH、real-time PCR 解析、Heteroduplex mobility assay、直接塩基配列決定による変異解析により腫瘍化との関連性の検証を行い、培養細胞を用いた発現導入やノックダウン免疫不全マウスへの移植によって標的遺伝子の性状を解析した。

2. 網羅的遺伝子発現解析：

白血病細胞検体から total RNA を RNeasy Plus kit (Qiagen 社) で抽出し、各 50 ng を用いて WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NyGen 社) により cDNA を合成、増幅し、Biotin 標識した後、マイクロアレイ (Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) により網羅的遺伝子発現を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring (Agilent 社) を用いて解析した。

3. AML の遺伝子解析：

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

4. 小児 ALL のマーカー解析：

初診時検体に対して 4 カラーあるいは 10 カラー全血法の蛍光染色を行いフローサイトメトリーにより解析した。

5. 小児がんの検体保存中央診断：

小児がんの治療を効率的に実施するため、中央病理診断の迅速化を目的とし、Rapid Review と Group Review (最終診断) による中央病理診断システムにより病理診断を行った。各小児がんの組織型に応じた免疫組織化学染色パネルを作成し、保存検体の配分方法について検討を行った。

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

6. Ewing 肉腫発症モデル系の解析：

間葉系細胞で tetracycline 誘導性に EWS/ETS 遺伝子を発現する細胞系を用いて、ヌードマウス移植による腫瘍形成、Soft agar 上での colony 形成能、遊走能、Matrigel 内での浸潤能の測定を行った。

(倫理面への配慮)

関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。動物実験についても、同様に関連法規を遵守して動物愛護と動物福祉の観点に立った倫理的配慮を行った。

C. 研究結果

1. 小児がんの発現遺伝子解析：

B-cell precursor (BCP) ALL 8 例、T-ALL 6 例の網羅的発現遺伝子解析を行い、対象としての成熟 B-ALL を加えた 3 者間での、発現遺伝子を比較し、各亜群に特徴的な発現遺伝子を選択した。この結果、BCP-ALL に特徴的な発現遺伝子として、CDH2, PPP1R1C, 等が、また T-ALL に特徴的に発現する遺伝子として AKAP12, TCL1BLARGE, IRF4 等が、さらに BCP-ALL と T-ALL に共通に発現するが成熟 B-ALL には発現しない遺伝子として、SPRY2, LILRA2, ERG, 等、多数の遺伝子が同定された。そこで、上記遺伝子のうちの一部について、RT-PCR による、その発現の特異性を確認した。さらに症例を増やして解析を進めるとともに、選択された各遺伝子について、ゲノム解析の結果との関連性や生物学的意義についての解析により、診断・治療の標的因子としての可能性について検討を進めている。

2. 横紋筋肉腫、Ewing 肉腫における ALK 遺伝子の異常：

横紋筋肉腫の細胞株 8 検体、臨床検体 62 検体に対して検討を行った結果、胞巣型横紋筋肉腫の臨床検体の 1 例において ALK 遺伝子の高度増幅を検出した。この 1 検体は横紋筋肉腫に特異的である PAX3/FKHR 融合遺伝子も検出された。ALK 遺伝子の変異は検出されなかった。Ewing 肉腫の細胞株 17 検体、臨床検体 26 例に対して検討を行った結果、臨床検体 2 例と、うち 1 例から樹立した細胞株において ALK の kinase domain 内に変異 (R1192G および A1280V) を検出した。

A1280V 変異は腫瘍細胞では片親性ダイソミーの結果、ホモ変異となっていることが確認された。また、いずれの症例でも Ewing 肉腫に特異的な EWS 遺伝子の転座が検出された。ALK 変異をみとめた細胞株に対して、ALK 阻害剤を付加したところ、その細胞増殖は抑制され、siRNA を用いた ALK 遺伝子の knock down によっても増殖は抑制された。横紋筋肉腫および Ewing 肉腫以外の疾患 (肝芽腫、悪性ラブドイド腫瘍など) においては、ALK 遺伝子の異常は検出されなかった。

3. AML の WT1 異常遺伝子解析：

AML99 138 例では WT1 遺伝子変異を有する症例は有さない症例と比べて FLT3-ITD の頻度は高くはなかったが、KIT 変異を有する割合が有意に高かった。また、WT1 遺伝子変異を認める症例では、寛解導入率、無病生存率、全生存率が低い傾向がみられた。今後、現在行われている小児 AML-05 プロトコールにおける WT1 遺伝子変異の臨床的意義を前方視的に検討する予定である。

4. 11p15 転座型小児白血病の解析：

まれな 11p15 転座型小児白血病 10 例の FLT3-ITD、RAS、KIT、WT1、AML1、NPM1、CEBPA 遺伝子の解析では、KIT、FLT3-ITD と WT1 遺伝子の変異が高頻度であり、これらの変異を有する症例は予後不良例が多かったことにより 11p15 転座型白血病の予後不良の原因と考えられた。この 10 例には AML1、NPM1、CEBPA 遺伝子の変異はみられなかった。

5. 肝芽腫のアレイ CGH 解析：

これまでに肝芽腫についてゲノムと発現遺伝子のプロファイルが共に肝芽腫の予後と強く相関し、さらに 2 つの組み合わせで効率の良い腫瘍の層別化ができることを示した。今年度はこれらの結果を追加症例 20 例を用いて検証し、特に重要と考えられるゲノム異常と遺伝子発現を絞り込むことを目的とした。アレイ CGH により得られたデータに関しては、追加症例においても染色体腕レベルの増減をほとんど持たない症例群はほぼ予後良好 (8 例中 1 例のみ死亡) であり、これまでのデータを合わせると 39 例中 2 例のみの死亡であった。一方、染色体腕レベルの増減が多く見られた症例群 39 例については、死亡例は 14 例であり、アレイ CGH

により予後不良となる可能性の高い症例群の層別化に有用であることが改めて示された。

6. AMLのキメラ遺伝子解析：

診断時の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 361 例中 157 例（43.5%）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 99 例、CBF β -MYH11 20 例、MLL-AF6 2 例、MLL-AF9 25 例、MLL-ELL 6 例、TLS/FUS-ERG 3 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 69 例が登録され、242 検体の解析を行った。69 例中 46 例が AML1-ETO 陽性の症例であり、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 RNA 1 μ g あたりの発現量は中央値で 3.7x10⁵ コピーであったが、寛解導入療法 1 コース後では、中央値 1.3x10³ コピー、寛解導入療法第 2 コース後では、中央値 4.7x10² コピー、強化療法 1 コース後では、中央値 3.1x10² コピー、強化療法 2 コース後では、中央値 2.4x10² コピー、強化療法 3 コース後（全治療終了時点）では、中央値 1.6x10² コピーであった。

7. Ewing 肉腫発症モデル系の解析：

昨年度までに、DKK2 は Ewing 肉腫で高発現であり EWS/ETS の直接の標的遺伝子、DKK1 は Ewing 肉腫において低発現で、EWS/ETS によって発現低下するが必ずしも直接の標的分子ではないとの結果が得られている。DKK1 過剰発現 SK-ES1 細胞及び DKK2 過剰発現 SK-ES1 細胞を用いて網羅的遺伝子解析発現を行った。DKK1、DKK2 によって発現が上昇あるいは低下する遺伝子群を同定し、その中で、G protein family の一分子が、DKK1 によって過剰発現、DKK2 によって発現抑制されることが明らかとなった。この分子は DKK2 ノックダウンにより発現が上昇し、DKK1/2 の下流因子と考えられ、現在、この分子について更に解析中である。

SK-ES1 細胞に DKK2 の shRNA を安定遺伝子導入し定量 PCR 法で DKK2 の発現抑制を確認した。shRNA DKK2 SK-ES1 細胞は、増殖能が軽度低下傾向にあった一

方で、DKK2 発現量と浸潤能、遊走能には強い相関は認められなかった。このことから、EWS/ETS 依存的 DKK2 発現上昇は、Ewing 肉腫腫瘍形成に関与している可能性が考えられた。

Ewing 肉腫細胞での WNT シグナルについて、EWS/FLI1 が WNT3a による TCF/LEF 活性化を抑制することが示された。

8. p16^{INK4a} 細胞内分子標的療法：

細胞周期関連分子の発現と p16INK4a 細胞内分子標的療法の基礎的検討について ALCL4 株においては、1 株(Su-DHL1)を除いて p16INK4a 発現がなく、Rb/phospho-Rb, p27 は全株で発現していた。ALCL 細胞 2 株(DEL, Su-DHL1)に p16INK4a ペプチド導入後 72 時間の時点での増殖抑制率は 16 μ M でそれぞれ 76%、75%であった。同様の実験を健常者の末梢血単核球を用いて行ったが、ペプチド複合体導入は認められたが、細胞傷害効果はみられなかった。p16INK4a ペプチド 8 μ M 皮下注による in vivo 抗腫瘍(DEL)効果は、投与 1 日目を 100%とすると 4 日目で対照(PBS)が 150%であったのに対し、ペプチドのみが 110%、ペプチド複合体（機能性ペプチド+輸送体ペプチド）では 40%と明らかな腫瘍縮小効果が得られた。

9. 中央診断と検体保存：

小児がんのトランスレーショナルリサーチ推進を支えるためのバイオリソース形成を目的として、小児固形腫瘍の検体保存、急性リンパ性白血病(ALL)のマーカー中央診断および検体保存、急性骨髄性白血病の検体保存を継続した。悪性リンパ腫、神経芽腫中央病理診断システム、横紋筋肉腫について中央病理診断システムを整備した。

デジタル 4 カラーフローサイトメトリー (FCM) を用いた自動測定システムを用いて、同一プロトコールで治療された小児 ALL 30 症例の治療 8 日目の末梢血残存白血病細胞絶対数を測定し、その結果を従来からの目算方での結果と比較解析した結果、両者の間には一定の相関性が認められた

考察

1. 小児がんの発現遺伝子解析：

小児 ALL の各亜群に特徴的な発現遺伝子が明らかとなった。今後さらに症例を

増やし、これまでに行なってきたゲノム構造解析の結果や、治療反応性や臨床予後等との相関解析を行なうことにより、診断・治療に有用な標的因子の同定に結びつくことが期待される。

2. 横紋筋肉腫、Ewing 肉腫における ALK 遺伝子の異常：

変異が検出された横紋筋肉腫および Ewing 肉腫の検体はいずれもそれぞれの疾患に特徴的な転座を併せ持っており、ALK 遺伝子の異常は広く小児固形腫瘍の発生に関与しており、それぞれの転座遺伝子などが腫瘍の表現型に関与していることが推定された。この成果は ALK 活性を抑制する分子標的薬が、神経芽腫のみならず同じく難治性小児腫瘍である胞巣型横紋筋肉腫や Ewing 肉腫の画期的な治療薬になりうることを示した。

3. AML の WT1 異常遺伝子解析：

近年 WT1 遺伝子の変異のある AML 症例は有意に予後不良であると報告された。我々の AML99 プロトコールの 138 例における WT1 遺伝子変異の解析では、WT1 遺伝子変異を有する症例では有さない症例と比べ、KIT 変異を有する割合が有意に高かった。また、WT1 遺伝子変異を認める症例では、寛解導入率、無病生存率、全生存率が低い傾向がみられた。今後小児 AML における WT1 遺伝子変異の臨床的意義を検討するためには、より多数例での DNA を用いた解析が必要であり、現在 AML-05 プロトコール 350 症例の解析を準備している。

4. 11p15 転座型小児白血病の解析：

まれな 11p15 転座型小児白血病 10 例の FLT3-ITD、RAS、KIT、WT1、AML1、NPM1、CEBPA 遺伝子の解析では、KIT、FLT3-ITD と WT1 遺伝子の変異が高頻度であり、重複例もみられ、11p15 転座型白血病の予後不良の原因と考えられた。

5. 肝芽腫のアレイ CGH 解析：

肝芽腫の予後診断においては、病理組織型（高分化型、低分化型、未分化型）や病期が従来取り入れられてきたが、病期に関しては欧米で使用されている分類とやや異なるため、過去の症例については海外のスタディとの比較が容易ではなかった。本研究で症例ごとに明らかにした分子情報、特にグローバルなゲノム異常の情報は解析プラットフォームが異な

っても得られる結果に大きな違いはないため、異なるスタディ間でも容易に共有でき、汎用性のある層別化の実現に非常に有用である。今後さらなるデータの蓄積と独立試験、各染色体領域の悪性度への寄与の評価が必須である。

6. AML のキメラ遺伝子解析：

小児 AML361 例のキメラ遺伝子スクリーニングで、AML1-ETO のキメラ遺伝子の頻度は約 27%であり、欧米の報告と比べて高頻度であるが、我が国の成人においても同様の傾向にあり、人種による違いと考えられる。AML1-ETO に比べて CBF β -MYH11 はおよそ 5分の1であり、全体の約 5%と低頻度であった。

AML1-ETO のキメラ遺伝子を対象にした MRD の解析では、寛解導入量法終了時の 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。

7. Ewing 肉腫発症モデル系の解析：

DKK1/2 が DKK1/2 は、EWS/ETS の直接的、あるいは間接的な標的遺伝子の一つとして機能していると考えられ、EWS/ETS による腫瘍発生に関与していると考えられる。今回、G protein family の一分子を DKK1/2 の下流因子の候補として同定した。更に本分子について解析することにより、DKK1/2 が Ewing 肉腫の発生に関与する経路が解明されることが期待される

8. p16INK4a 細胞内分子標的療法：

ALCL 細胞株において、輸送体ペプチドと p16INK4a 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。p16INK4a が発現していない細胞株（DEL）においては、p16INK4a 複合体ペプチド導入により Rb のリン酸化が抑制され、p16INK4a の機能が補填されることが確認された。マウス ALCL xenograft への p16INK4a 機能性ペプチド皮下注による in vivo での増殖抑制効果も明らかに認められた。ALCL は再発率の高い

リンパ腫で、多剤併用療法による初期治療の後に皮下腫瘍として再発してくる症例も多いため、p16INK4a 機能性ペプチドの皮下注は分子標的療法としての臨床応用が期待できる。

9. 中央診断と検体保存：

白血病、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と検体保存、ならびにその分配の実施するシステムについてはすでに確立し、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。

小児 ALL の診断における 10 カラー解析の有用性が明らかとなり、今後、特定の生物学的な特徴を有する ALL 亜群の検出に有用なマーカーを組み合わせて小児 ALL の中央診断に実用化して行くことにより、初期診断や治療の層別化に必要なより多くの情報が得られ、さらに、検査時間の短縮や使用検体を減らすことが可能である。

E. 結論

これまでの研究の成果により、難治性小児がんの治療予後向上を目指して、その臨床的特性に関する分子情報の体系的解析を行い、ゲノム構造解析や発現遺伝子解析によって、複数の診断・治療標的因子、あるいはその候補が同定されており、現在その臨床応用に向けた研究がさらに進められている。また、本研究の成果として、難治性小児がんの中央診断や検体保存のシステムが確立され、また新たな診断法の開発も進んだ。今後はさらにその成果を発展させ、難治性小児がんの治療に応用し、予後向上に寄与することを目指す。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 2009 Jul;33(7):908-12. Epub 2009 Feb 24.

- 2) Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyokawa N. Kinetics and Effect of Integrin Expression on Human CD34(+) Cells during Murine Leukemia Virus-Derived Retroviral Transduction with Recombinant Fibronectin for Stem Cell Gene Therapy. *Hum Gene Ther.* 2009 Jul;20(7):777-83.

- 3) Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology.* 2009 Nov;128(3):405-19.

- 4) Onda K, Iijima K, Katagiri YU, Okita H, Saito M, Shimizu T, Kiyokawa N. Differential effects of BAFF on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. *Int J Hematol.* (in press).

- 5) Yang L, Fujimoto J, Qiu D, Sakamoto N. Trends in cancer mortality in Japanese adolescents and young adults aged 15 to 29 years, 1970-2006. *Ann Oncol.* 2009;20(4):758-66.

- 6) Tsuchida M, Ohara A, Manabe A, Kumagai M, Shimada H, Kikuchi A, Mori T, Saito M, Akiyama M, Fukushima T, Koike K, Shiobara M, Ogawa C, Kanazawa T, Noguchi Y, Oota S, Okimoto Y, Yabe H, Kajiwara M, Tomizawa D, Ko K, Sugita K, Kaneko T, Maeda M, Inukai T, Goto H, Takahashi H, Isoyama K, Hayashi Y, Hosoya R, Hanada R. Long-term results of Tokyo Children's Cancer Study Group trials for childhood acute lymphoblastic leukemia, 1984-1999. *Leukemia* 24 : 383-396, 2010.

- 7) Ono R, Kumagai H, Nakajima H, Hishiya A, Taki T, Horikawa K, Takatsu K, Satoh T, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia* 23 : 2197-2209, 2009

- 8) Kuroiwa M, Sakamoto J, Shimada A, Suzuki N, Hirato J, Park MJ, Sotomatsu M, Hayashi Y. Manifestation of alveolar rhabdomyosarcoma as primary cutaneous lesions in a neonate with Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pediatr Surg.* 44 : 31-35, 2009.

- 9) Kurosawa H, Okuya M, Matsushita T, Kubota T, Endoh K, Kuwashima S, Hagiwara S, Sato Y, Fukushima K, Sugita K, Okada Y, Park MJ, Hayashi Y, Arisaka O. JAK2V617F mutation-positive childhood essential thrombocythemia associated with cerebral venous sinus thrombosis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 31 : 678-680, 2009

- 10) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T,

- Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koefler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature*. 460 : 904-908, 2009
- 11) Takita J, Motomura A, Koh K, Ida K, Taki T, Hayashi Y, Igarashi T. Acute megakaryoblastic leukemia in a child with the MLL-AF4 fusion gene. *Eur J Haematol*. 83 : 149-153, 2009
- 12) Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 459 : 712-716, 2009
- 13) Taketani T, Taki T, Nakamura H, Taniwaki M, Masuda J, Hayashi Y. NUP98-NSD3 fusion gene in radiation-associated myelodysplastic syndrome with t(8;11)(p11;p15) and expression pattern of NSD family genes. *Cancer Genet Cytogenet*. 190 : 108-112, 2009
- 14) Watanabe-Okochi N, Oki T, Komeno Y, Kato N, Yuji K, Ono R, Harada Y, Harada H, Hayashi Y, Nakajima H, Nosaka T, Kitaura J, Kitamura T. Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. *Int J Hematol*. 89 : 470-481, 2009
- 15) Mizoguchi Y, Fujita N, Taki T, Hayashi Y, Hamamoto K. Juvenile myelomonocytic leukemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98-HOXA11 fusion. *Am J Hematol*. 84 : 295-297, 2009
- 16) Park MJ, Taki T, Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia and T cell non-Hodgkin lymphoma. *Brit J Haematol* 145:198-206, 2009
- 17) 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 Haematology* 144: 917-929, 2009
- 18) Kitoh T, Taki T, Hayashi Y, Nakamura K, Irino T, Osaka M. Transient abnormal myelopoiesis in a Down syndrome newborn followed by acute myeloid leukemia: identification of the same chromosomal abnormality in both stages. *Cancer Genet Cytogenet*. 188:99-102, 2009
- 19) Masuda S, Kumano K, Suzuki T, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Tojo A, Shibutani M, Mitsumori K, Hanazono Y, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S. Dual antitumor mechanisms of Notch signaling inhibitor in a T-cell acute lymphoblastic leukemia xenograft model. *Cancer Sci*. 2009 Aug 27. (Epub ahead of print)
- 20) Akagi T, Shih LY, Ogawa S, Gerss J, Moore SR, Schreck R, Kawamata N, Liang DC, Sanada M, Nannya Y, Deneberg S, Zachariadis V, Nordgren A, Song JH, Dugas M, Lehmann S, Koefler HP. Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. *Haematologica*. 94:1301-6, 2009
- 21) Kawamata N, Ogawa S, Gueller S, Ross SH, Huynh T, Chen J, Chang A, Nabavi-Nous S, Megrabian N, Siebert R, Martinez-Climent JA, Koefler HP. Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Exp Hematol*. 37:937-946, 2009.
- 22) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koefler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature*. 460:904-8, 2009.
- 23) Kawamata N, Ogawa S, Seeger K, Kirschner-Schwabe R, Huynh T, Chen J, Megrabian N, Harbott J, Zimmermann M, Henze G, Schrappe M, Bartram CR, Koefler HP. Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol*. 34:1603-1612, 2009.
- 24) Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch activation induces the generation of functional NK cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of IL-15. *J Immunol*. 182:6168-6178, 2009.
- 25) Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 459:712-6, 2009.
- 16) Lee SY, Kumano K, Nakazaki K, Sanada M, Matsumoto A, Yamamoto G, Nannya Y, Suzuki R, Ota S, Ota Y, Izutsu K, Sakata-Yanagimoto M, Hangaishi A, Yagita H, Fukayama M, Seto M, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 100:920-6, 2009.
- 27) Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Tunici P, Finocchiaro G, Eoli M, Ruckert C, Huynh T, Liu G, Kato M, Sanada M, Jauch A, Dugas M, Black KL, Koefler HP. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by

single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol Cancer Res.* 7:665-77, 2009.

28) Akagi T, Shih LY, Kato M, Kawamata N, Yamamoto G, Sanada M, Okamoto R, Miller CW, Liang DC, Ogawa S, Koefler HP. Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations. *Blood.* 113:1741-8, 2009.

29) Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Yung A, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C, Koefler HP. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica.* 94:213-23, 2009.

30) Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Takehiko S Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies. *Japan Marrow Donation Program (JM DP). Biol Blood Marrow Transplant.* 15(1 Suppl):39-41, 2009.

31) Nowak D, Le Toriellec E, Stern MH, Kawamata N, Akagi T, Dyer MJ, Hofmann WK, Ogawa S, Koefler HP. Molecular allelokaryotyping of T-cell prolymphocytic leukemia cells with high density single nucleotide polymorphism arrays identifies novel common genomic lesions and acquired uniparental disomy. *Haematologica.* 94:518-527, 2009.

32) Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood.* 113:6584-6592, 2009.

33) Suzuki I, Takenouchi T, Ohira M, Oba S, Ishii S. Robust Model Selection for Classification of Microarrays.

Cancer Informatics 7: 141-57, 2009.

34) Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y, Ozaki T, Isogai E, Kamijo T, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, Nakagawara A. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma.

Int. J. Oncol. 34(4):931-8, 2009.

35) Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Sakai R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 28(5): 662-73, 2009.

36) Kusuki S, Hashii Y, Fukushima N, Takizawa S, Tokimasa S, Kogaki S, Ohta H, Tsuda E, Nakagawa A, Ozono K. Pediatric post-transplant diffuse large B cell lymphoma after cardiac transplantation. *Int J Hematol* 89:209-213, 2009

37) Watanabe N, Okita H, Matsuoka K, Kiyotani C, Fujii E, Kumagai M and Nakagawa A. Vaginal yolk sac (endodermal sinus) tumors in infancy presenting persistent vaginal bleeding. *J Obstet Gynaecol Res* 36(1) 213-216, 2010.

38) Kobayashi R, Yamato K, Tanaka F, Takashima Y, Inada H, Kikuchi A, Kumagai MA,

Sunami S, Nakagawa A, Fukano R, Fujita N, Mitsui T, Tsurusawa M, Mori T; Lymphoma Committee, Japanese Pediatric

Leukemia/Lymphoma Study Group.

Retrospective analysis of non-anaplastic peripheral T-cell lymphoma in pediatric patients in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54: 212-5.

39) Mitsui T, Mori T, Fujita N, Inada H, Horibe K, Tsurusawa M; Lymphoma Committee, Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Retrospective analysis of relapsed or primary refractory childhood lymphoblastic lymphoma in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52: 591-5.

40) Ohashi H, Arita K, Fukami S, Oguri K, Nagai H, Yokozawa T, Hotta T, Hanada S. Two rare MPL gene mutations in patients with essential thrombocythemia. *Int J Hematol.* 2009 Oct;90(3):431-432.

41) Nishiwaki S, Terakura S, Yasuda T, Imahashi N, Sao H, Iida H, Kamiya Y, Niimi K, Morishita Y, Kohno A, Yokozawa T, Ohashi H, Sawa M, Kodera Y, Miyamura K. Outcome of allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors for adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphocytic leukemia in first complete-remission. *Int J Hematol.* 2010 Feb 10.

2. 学会発表

1) 宮川世志幸, 大喜多肇, 佐藤伴, 片桐洋子, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 清河信敬.

Wnt シグナル拮抗因子 DKK の Ewing 肉腫ファミリー腫瘍発生における機能. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 5 月 1 日-3 日, 2009.

2) 恩田恵子, 齋藤正博, 森鉄也, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 清河信敬. TCCSG-L1602 治療研究/Day8 末梢血-芽球数のフローサイトメトリー測定. 第 19 回日本サイトメトリー学会学術集会, 松江, 6 月 20 日-21 日, 2009.

3) 清河信敬, 恩田恵子, 高野邦彦, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 9 color フローサイトメトリーによる小児白血病のマーカー解析. 第 19 回日本サイトメトリー学会学術集会, 松江, 6 月 20 日-21 日, 2009.

4) 大喜多肇, 宮川世志幸, 佐藤伴, 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 family tumor 特異的融合遺伝子 EWS/ETS による Dickkopf1/2 の発現制御. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 10 月 1 日~3 日, 横浜.

5) 恩田恵子, 齋藤洋平, 飯島一智, 齋藤正博, 清河信敬. B 細胞性腫瘍に対する BAFF の効果. 第 71 回日本血液学会学術集会, 京都, 10 月 23 日-25 日, 2009.

6) 清河信敬, 恩田恵子, 飯島一智, 長谷川大輔, 加藤元博, 大喜多肇, 齋藤正博, 森

- 鉄也, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 中川温子, 小川誠司, 藤本純一郎. 小児 B 細胞性リンパ腫のマイクロアレイを用いた molecular karyotyping と網羅的発現遺伝子解析. 第 71 回日本血液学会学術集会, 京都, 10 月 23 日-25 日, 2009.
- 7) 恩田恵子, 平林真介, 清河信敬, 齋藤正博, 森鉄也, 福島敬, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. TCCSG-L1602 治療研究における Day8 末梢血-芽球数のフローサイトメトリー測定についての評価. 第 51 回日本小児血液学会, 東京, 11 月 27 日-29 日, 2009.
- 8) 恩田恵子, 斎藤洋平, 飯島一智, 齋藤正博, 清河信敬. BAFF の B 細胞性腫瘍に対する効果の検討. 第 51 回日本小児血液学会, 東京, 11 月 27 日-29 日, 2009.
- 9) 清河信敬, 恩田恵子, 平林真介, 飯島一智, 福島敬, 齋藤正博, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 熊谷昌明, 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急性リンパ性白血病第 16 次治療研究におけるマーカー中央診断. 第 51 回日本小児血液学会, 東京, 11 月 27 日-29 日, 2009.
- 10) 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. 小児がん教育プログラムの整備 (公開系統講義・診断実習の構築), 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 11 月 27 日~29 日, 2009.
- 10) 恩田恵子, 片桐洋子, 清河信敬. Distinct effects of BAFF on human B cell neoplasms/B 細胞腫瘍に対する BAFF の効果. 第 39 回日本免疫学会学術集会, 大阪, 12 月 2 日-4 日, 2009.
- 11) 藤本純一郎. 「イントロダクション」. がんワークショップ. 第 25 回日本小児がん会・第 51 回日本小児血液学会学術集会. 千葉, 11 月 27-29 日, 2009.
- 12) 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. 小児がん教育プログラムの整備 (公開系統講義・診断実習の構築), 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 11 月 27 日~29 日, 2009.
- 13) 藤本純一郎. 「小児がん経験者の長期フォローアップ体制整備」. 放医研シンポジウム・招待講演 KIDS workshop 2009 in NIRS (IAEA-NIRS ジョイントワークショップ NIRS 放射線防護研究センターシンポジウム WHO グローバルイニシアティブワークショップ). 千葉, 12 月 15-17 日, 2009.
- 14) Park MJ, Taki T, Oda M, Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y: FBW7 and NOTCH1 mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell non-Hodgkin's lymphoma; a Japan association of childhood leukemia study group. 第 48 回イギリス血液学会, イギリス 2008.4.5-9
- 15) 滝田順子, 陳玉彦, 崔永林, 加藤元博, 大平美紀, 真田昌, 曾田学, 菊地陽, 中川原章, 五十嵐隆, 林泰秀, 間野博行, 小川誠司. 小児固形腫瘍における ALK 遺伝子の解析. 第 6 回北関東小児がんセミナー, 高崎 2009.5.16
- 16) 長谷川大輔, 小川千登世, 神谷尚宏, 小澤美和, 真部淳, 細谷亮太, 久保田知里, 朴明子, 林泰秀: RUNX1 変異を伴った familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia (FPD/AML) 一家系. 第 6 回北関東小児がんセミナー, 高崎, 2009.5.16
- 17) 吉橋博史, 黒澤健司, 林泰秀. MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification) 法による染色体全サブプロムア微細構造異常の網羅的解析. 第 181 回日本小児科学会群馬地方会講話会, 高崎, 2009.6.13
- 18) 加藤元博, 小川誠司, 林泰秀. 若年性骨髄単球性白血病 (JMML) のゲノム解析. 厚生労働省がん研究助成金/厚生労働科学研究費補助金 藤本班・堀部班・石田班合同班会議. 名古屋 2009.6.20
- 19) 朴明子, 林泰秀. T 細胞性急性リンパ性白血病における PTEN と PI3K-AKT 経路の遺伝子解析. 厚生労働省がん研究助成金/厚生労働科学研究費補助金 藤本班・堀部班・石田班合同班会議. 名古屋 2009.6.20
- 20) 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 椎原隆, 畑中政博, 山本英輝, 西明, 黒岩実, 鈴木則夫, 林泰秀. Opsoclonus-myoeloclonus 症候群を契機に診断された神経芽腫の一例. 第 19 回群馬小児がん研究会, 前橋, 2009.8.21
- 21) 朴明子, 佐野弘純, 山田佳之, 小林富男, 丸山健一, 小林康之, 外松学, 林泰秀. ヘパリン起因性血小板減少症が疑われた 4 例. 第 19 回群馬小児がん研究会, 前橋, 2009.8.21
- 22) 松原亜以子, 加藤元博, 真田昌, 滝田順子, 千葉滋, 林泰秀, 小俣政男, 小林幸夫, 渡邊俊樹, 石川雄一, 吉野正, 小川誠司. 各種腫瘍における高密度 SNP アレイを用いた網羅的ゲノムプロファイリング. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.1-3
- 23) 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 金兼弘和, 大喜多肇, 藤本純一郎, 菊地陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 小児固形腫瘍における ALK 遺伝子

- の増幅と変異. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.1-3
- 24) 朴明子, 加藤元博, 清河信敬, 真田昌, 滝田順子, 小川誠司, 林泰秀. 小児 T 細胞型急性リンパ性白血病における網羅的ゲノム解析. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.1-3
- 25) 大木健太郎, 滝田順子, 西村力, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 神経芽細胞腫の ALK 遺伝子異常による ALK キナーゼ活性の以上増幅. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.1-3
- 26) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. ユーイング肉腫における高密度 SNP アレイによる網羅的遺伝子解析. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.1-3
- 27) 本村あい, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 小児固形腫瘍における ALK 阻害剤の感受性. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.1-3
- 28) 土田昌宏, 小原明, 花田良二, 真部淳, 熊谷昌明, 高橋浩之, 金沢崇, 藤村純也, 富澤大輔, 康勝好, 嶋田博之, 森鉄也, 後藤裕明, 福島敬, 小池和俊, 野口靖, 小川千登世, 犬飼岳史, 福島啓太郎, 塩原正明, 加藤陽子, 前田美穂, 菊地陽, 梶原道子, 矢部晋正, 外松学, 太田節雄, 磯山恵一, 金子隆, 林泰秀. 東京小児がん研究グループにて 1981 年から 1999 年の 5 つの研究に登録された小児急性リンパ性白血病 2035 例の長期追跡結果. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25
- 29) Hasegawa D, Ogawa C, Hirabayashi S, Park MJ, Hayashi Y, Manabe A, Hosoya R. A Japanese pedigree with RUNX1 mutation resulting in FPD/AML. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25
- 30) Park MJ, Kato M, Kiyokawa N, Sanada M, Takita J, Ogawa S, Hayashi Y. Genome-wide analysis of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25
- 31) Taketani T, Taki T, Fukada S, Yamaguchi S, Hayashi Y. Clinical significance of somatic mutations in hematological malignancies with NUP98-fusion genes. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25
- 32) Okubo J, Kato M, Takita J, Sanada M, Ohki K, Nishimura R, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Molecular allelo-karyotype of adult acute lymphoblastic leukemia(ALL) and pediatric ALL. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25
- 33) 佐野弘純, 久保田知里, 朴明子, 嶋田明, 外松学, 滝智彦, 田淵健, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 林泰秀. 小児急性骨髄性白血病における WT1 遺伝子変異と臨床像. 第 71 回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25
- 34) 黒岩実, 西明, 山本英輝, 鈴木則夫, 外松学, 朴明子, 林泰秀. 悪性奇形腫群腫瘍の治療成績と問題点. 第 51 回日本小児血液学会, 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 35) 橘木浩平, 佐野弘純, 朴明子, 山田佳之, 外松学, 大竹紗耶香, 山本英輝, 西明, 黒岩実, 鈴木則夫, 畠山信逸, 平戸純子, 林泰秀. 異なる病理組織像の急性虫垂炎を合併した白血病の 2 症例. 第 51 回日本小児血液学会, 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 36) 朴明子, 滝智彦, 小田慈, 八木啓子, 小林良二, 鈴木信寛, 原純一, 堀部敬三, 林泰秀. T 細胞性急性リンパ性白血病における PTEN と P13K-AKT 経路の遺伝子解析. 第 51 回日本小児血液学会, 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 37) 加藤元博, 滝田順子, 朴明子, 真田昌, 川俣紀彦, Claus Bartrum, H Phillip Koefler, 菊地陽, 五十嵐隆, 小川誠司, 林泰秀. 21 trisomy と小児急性リンパ性白血病. 第 51 回日本小児血液学会, 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 38) 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 畠山信逸, 林泰秀. 小児固形腫瘍の診断および治療効果判定における MRI 拡散強調画像の有効性について. 第 51 回日本小児血液学会, 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 39) 加藤元博, 滝田順子, 陳玉彦, 大木健太郎, 西村力, 真田昌, 井田孔明, 菊地陽, 小川誠司, 林泰秀, 五十嵐隆. 神経芽腫における短縮型 ALK による活性化. 第 51 回日本小児血液学会, 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 40) 大木健太郎, 滝田順子, 陳玉彦, 西村力, 加藤元博, 金兼弘和, 大喜多肇, 藤本純一郎, 真田昌, 菊地陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 固形腫瘍における ALK 遺伝子の解析. 第 51 回日本小児血液学会, 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 41) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 高密度 SNP アレイを用いたユーイング肉腫における網羅的ゲノム解析. 第 51 回日本小児血液学会, 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 42) 朴明子, 佐野弘純, 山田佳之, 小林富男, 丸山健一, 外松学, 小林康之, 林泰

- 秀. ヘパリン起因性血小板減少症が疑われた4症例. 第51回日本小児血液学会、第25回日本小児がん学会、千葉、2009.11.27-29
- 43) 朴明子, 佐野弘純, 小笠原水穂, 嶋田明, 外松学, 井田孔明, 林泰秀. Down症候群に伴う transient abnormal myelopoiesis (TAM) の予後因子についての検討. 第51回日本小児血液学会、第25回日本小児がん学会、千葉、2009.11.27-29
- 44) 竹谷健, 滝智彦, 福田誠司, 山口清次, 林泰秀. NUP98 遺伝子再構成を有する小児造血器腫瘍に同定された遺伝子変異とその臨床的意義. 第51回日本小児血液学会、第25回日本小児がん学会、千葉、2009.11.27-29
- 45) 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 今野友貴, 伊藤悦朗, 林泰秀. 新規のリボソームタンパク遺伝子変異を認めた Diamond-Blackfan 貧血の一例. 第51回日本小児血液学会、第25回日本小児がん学会、千葉、2009.11.27-29
- 46) 朴明子, 石関梨華, 原田育江, 渡辺美緒, 佐野弘純, 都丸八重子, 外松学, 林泰秀. アンケート調査結果に基づく小児在宅緩和ケアの可能性. 第51回日本小児血液学会、第25回日本小児がん学会、千葉、2009.11.27-29
- 47) 若井公子, 竹内紗耶香, 西明, 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 鈴木則夫, 黒岩実, 平戸純子, 林泰秀. 術後4ヵ月で再発をきたした上腹部腹壁デスマイト腫瘍の一例. 第51回日本小児血液学会、第25回日本小児がん学会、千葉、2009.11.27-29
- 48) 朴明子, 外松学, 佐野弘純, 黒岩実, 林泰秀. CITA 無効例に対する ITEC の有効性と治療関連毒性について一肝芽腫5症例の検討. 日本小児肝癌スタディグループ (JPLT) 研究会 2010, 東京, 2010.1.23
- 49) 一之宮健二, 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 林泰秀, 木本富士, 井上雅美, 河敬世. 診断及び治療に難渋した慢性活動性EBウイルス感染症の一例. 第20回群馬小児がん研究会, 前橋, 2010.2.26
- 50) 朴明子, 外松学, 佐野弘純, 林泰秀, 黒岩実, 鈴木則夫. CITA 無効例に対する肝芽腫の治療についての検討. 第20回群馬小児がん研究会, 前橋, 2010.2.26
- 51) 大竹紗耶香, 黒岩実, 西明, 山本英輝, 畑中政博, 鈴木則夫, 朴明子, 佐野弘純, 外松学, 林泰秀. 早期化学療法にて肝腫大縮小を得たIVs 神経芽腫. 第20回群馬小児がん研究会, 前橋, 2010.2.26
- 52) Kawahata R, Kato M, Matsubara A, Sanada M, Takita J, Kawamata N, Zimmermann M, Claus R Bartram, H Phillip Koeffler & S, O.: Down syndrome in phenotypically normal children with acute lymphoblastic leukemia. 第71回日本血液学会総会 2009
- 53) Matsubara A, Muto S, Kato M, Sanada M, Tamura A, Chen Y, Takita J, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Yamada Y, Oshima K, Watanabe T & S, O.: Genome-wide analysis of adult T-cell leukemia/lymphoma. 第71回日本血液学会総会 2009
- 54) Nakazaki K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Yamamoto G, Hangaishi A, Takita J, Chiba S, Kurokawa M & S, O.: Genome-wide analysis of acute myeloid leukemia using high-density oligonucleotide arrays. 第71回日本血液学会総会 2009
- 55) 加藤元博, 真田昌, 加藤格, 佐藤康晴, 竹内賢吾, 丹羽明, 野本順子, 中釜斉, 石川雄一, 中畑龍俊, 吉野正, 小林幸夫 & 小川誠司: Genome-wide analysis identifies frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. 第68回日本癌学会学術総会 2009
- 56) 大平美紀, 小島俊男, 丹羽崇史, 大羽成征, 石井信, 滝田順子, 加藤元博, 小川誠司, 中村洋子, 上条岳彦 & 中川原明: Clinical application of genomic signature including ALK mutation for the new tumor risk classification of neuroblastoma. 第68回日本癌学会学術総会 2009
- 57) 川幡亮一郎, 加藤元博, 真田昌, 加藤格, 佐藤康晴, 竹内賢吾, 滝田順子, 野本順子, 朝倉義崇, 渡邊俊樹, 吉野正, 小林幸夫 & 小川誠司: Mutation analysis of genes regulating NFkappaB pathway in malignant lymphoma. 第68回日本癌学会学術総会 2009
- 58) 西村力, 加藤元博, 滝田順子, 高橋寛, 三牧正和, 岡明, 井田孔明, 菊池陽, 真田昌, 小川誠司, 水口雅 & 五十嵐隆: 肝芽腫を発症した Sotos 症候群の1症例. 第54回日本人類遺伝学会 2009
- 59) Ohira M, Meng Y, Li Y, Niizuma H, Zhu Y, Ozaki T, Isogai E, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Nakagawara A.: High expression of ncRAN, a long non-coding RNA mapped to 17q25, is associated with aggressiveness and poor prognosis of neuroblastoma. American Association for Cancer Research 100th Annual Meeting (AACR) 2009, Denver, USA. April 18-22, 2009.
- 60) 大平美紀, 大羽成征, 中村洋子, 好田忠行, 瀨岡美佐, 吉田安子, 上條岳彦, 石井信, 中川原章. 遺伝子発現プロファイルに基づく神経芽腫の予後予測ミニチップシステム. 日本人類遺伝学会第54回大会, 品川, 9月24日-26日, 2009.
- 61) Ohira M, Kojima T, Niwa T, Oba S, Takita J, Ogawa S, Nakamura Y, Kamijo T, Nakagawara A.: Clinical application of genomic signature including ALK mutation to the new tumor risk classification system for neuroblastoma.

第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 10 月 1 日-3 日, 2009.

62) 1) Nakagawa A, Ohshima K, Yoshino T, Nakamine H, Nakamura S, Fujimoto J, Tamaru J, Hojo H, Matsuno H, Sunami A, Tsurusawa M, Mori T. Pediatric non-Hodgkin lymphoma in Japan: WHO classification and diagnostic problems. 3rd International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin's Lymphoma 2009 年 6 月 12 日 Frankfurt, Germany

63) Lamant L, McCarthy K, d' Amore ESG, Klapper W, Nakagawa A, Fraga M, Maldyk J, Simonitsch I, Oschlies I, Delsol G, Mauguen A, Brugieres L, Le Deley MC. Prognostic impact of morphologic and phenotypic features of childhood ALK-positive anaplastic large cell lymphoma (ALCL): Results of ALCL99 Study. 3rd International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin's Lymphoma 2009 年 6 月 12 日 Frankfurt, Germany

64) 中川温子、松岡健太郎、大喜多肇 「ヒト造血幹細胞移植マウスを用いた EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患の検討」 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 1 日 京都

65) 北條洋、堀江弘、藤本純一郎、浜崎豊、秦順一、石田剛、小林庸次、宮内潤、森川征彦、中川温子、中山雅弘、田中祐吉、恒吉正澄、横山繁昭 「小児固形腫瘍 2053 例における種類別頻度の解析—日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会報告—」 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 1 日 京都

66) 中川温子 「小児がんの遺伝子病理診断」 第 82 回京滋小児悪性腫瘍懇話会 2009 年 5 月 29 日 京都

67) 入江理恵、中川温子、笠原群生、阪本靖介、福田晃也、重田孝信、松井陽 「小児特発性劇症肝不全例における病理組織学的検討」 第 27 回小児肝移植研究会 2009 年 7 月 11 日 三島

68) 坊野渚、野中裕子、吉村稔、木澤洋恵、山下敦、堀川玲子、森鉄也、笠原群生、中川温子 「糖尿病 IIb における造血能評価」 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会 2009 年 8 月 29 日 札幌

69) 中川温子、大島孝一、吉野正、中峯寛和、中村栄男、藤本純一郎、田丸淳一、北條洋、松野宏、角南勝介、鶴澤正仁、森鉄也 「小児 NHL の病理組織型と WHO 分類における問題点—JPLSG 病理中央診断報告—」 第 25 回日本小児がん学会 2009 年 11 月 27 日 千葉

70) Imoto N, Yokozawa T, Suzuki Y, Kihara R, Aoki E, Kato C, Ohashi H, Hamaguchi M, Hotta T, Nagai H. Clinical outcome of Hyperleukocytosis in adult acute myeloid leukemia: Single institute experience. 第 71 回

日本血液学会総会, 京都, 10 月 23 日~10 月 25 日, 2009.

71) Ishokawa Y, Kiyoi H, Miyamura K, Nakano Y, Kitamura K, Kohno A, Sugiura I, Yokozawa T, Hnamura A, Yamamoto K, Iida H, Emi N, Suzuki R, Ohnishi K, Naoe T. Imatinib trough level reflects BCR/ABL inhibitory activity and is associated with clinical response. 第 71 回日本血液学会総会, 京都, 10 月 23 日~10 月 25 日, 2009.

72) Kihara R, Aoki E, Imoto N, Suzuki Y, Kato C, Yokozawa T, Ohashi H, Hamaguchi M, Hotta T, Nagai H. Bloodstream infections in patients with lymphoid malignancy. 第 71 回日本血液学会総会, 京都, 10 月 23 日~10 月 25 日, 2009.

73) Ohashi H, Arita K, Oguri K, Yokozawa T, Nagai H, Hamaguchi M, Hanada S, Hotta T. Mutation analysis of the MPL gene in patients with essential thrombocythemia. 第 71 回日本血液学会総会, 京都, 10 月 23 日~10 月 25 日, 2009.

74) Suzuki Y, Moritani S, Imoto N, Kihara R, Aoki E, Kato C, Yokozawa T, Ohashi H, Hamaguchi M, Ichihara S, Hotta T, Nagai H. The difference of clinical outcome between Burkitt lymphoma and intermediate BL/DLBCL. 第 71 回日本血液学会総会, 京都, 10 月 23 日~10 月 25 日, 2009.

75) 木原里香、井本直人、鈴木康裕、青木恵津子、加藤千明、横澤敏也、大橋春彦、濱口元洋、堀田知光、永井宏和、マントル細胞リンパ腫の治療成績の後方視的解析. 第 49 回日本リンパ網内系学会総会, 兵庫, 7 月 9 日~7 月 11 日, 2009.

76) 蓮尾隆博、井本直人、鈴木康裕、木原里香、青木恵津子、加藤千明、横澤敏也、大橋春彦、森谷鈴子、市原周、濱口元洋、堀田知光、永井宏和. 濾胞性リンパ腫病変を伴った intermediate BL/DLBCL の一例. 第 49 回日本リンパ網内系学会総会, 兵庫, 7 月 9 日~7 月 11 日, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

難治性小児がんの網羅的糖鎖・ゲノム解析とその臨床応用

研究代表者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部長

研究要旨： 小児急性リンパ芽球性白血病（ALL）の臨床検体を用いて、マイクロアレイによる網羅的発現遺伝子解析し、新規標的因子の候補となる遺伝子の探索を行った。今後さらに解析を進め、各分子解析結果の意義や生物学的特性との関係について明らかにし、診断や治療における標的因子探索への応用を目指す。フローサイトメトリーによる小児 ALL の体系的表面抗原解析を行い、10 カラー解析による新たな診断システムの確立や、遺伝子異常を有する亜群の検出に有用な解析抗体のパネルを決定した。今後、その中央診断への応用を目指す。

A. 研究目的

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

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

そこで本研究では、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫、Wilms 腫瘍、難治例や再発例を含む小児白血病等の臨床検体に対し、包括的・体系的な生体分子情報解析(オミックス)を行い、難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報を網羅的に明らかにし、その知見に基づいた新規診断・治療法開発を行う。特に、急速な進展や再発を繰り返す亜型の分子特性を明らかにし、QOL 改善を目標とした予後予知法確立や新規治療モデルの提示を目指す。

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

B. 研究方法

1. 小児がんの網羅的発現遺伝子解析：

白血病細胞検体から total RNA を RNeasy Plus kit (Qiagen 社) で抽出し、各 50 ng を用いて WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NyGen 社) により cDNA を合成、増幅し、Biotin 標識した後、マイクロアレイ (Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) により網羅的発現遺伝子解析を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring (Agilent 社) を用いて解析した。

2. 小児 ALL のマーカー解析：

骨髄液あるいは末梢血液について、FITC、PE、ECD、PC5.5、PC7、APC、Alexa-700、APC-Alexa-750、Pacific-Blue、Cascade-Yellow、の 10 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる全血法の蛍光染色を行った。溶血後、Digital flow cytometry Galios (Beckman-Coulter 社) を用いて 3 レザー10 カラー解析を行った。lineage 決定・病型診断に必要な項目に加え、様々な機能分子に対する抗体についても解析を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 小児がんの発現遺伝子解析：

B-cell precursor (BCP) ALL 8 例、T-ALL 6 例

の網羅的発現遺伝子解析を行い、対象としての成熟 B-ALL を加えた 3 者間での、発現遺伝子を比較し、各亜群に特徴的な発現遺伝子を選択した。この結果、BCP-ALL に特徴的な発現遺伝子として、*CDH2*, *PPP1R1C*, *ALDH1A2*, *DATA-3*, *ELOVL4*, *HHIP* 等が、また T-ALL に特徴的に発現する遺伝子として *AKAP12*, *TCL1BLARGE*, *CIITA*, *IRF4* 等が、さらに BCP-ALL と T-ALL に共通に発現するが成熟 B-ALL には発現しない遺伝子として、*SPRY2*, *LILRA2*, *ERG*, *ANXA3*, *PROK2*, *MS4A3*, *TCFL2*, *RAB32*, *CXCL1*, *RHOA*, *GNAQ*, *CHRD1*, *PARD3*, *RHOA* 等、多数の遺伝子が同定された。そこで、上記遺伝子のうちの一部について、マイクロアレイ解析に用いたものと同一症例およびそれぞれの病型の ALL に対応する細胞株の cDNA を用いて RT-PCR を行ない、その発現の特異性を確認した。現在、さらに症例を増やして解析を進めるとともに、選択された各遺伝子について、ゲノム解析の結果との関連性、予後や治療反応性との関係、細胞株を用いた機能解析などの生物学的意義について解析を行っており、診断・治療の標的因子としての可能性について検討を進めている。

2. 小児 ALL のマーカー解析：

2009 年には、東京小児がん研究グループ (TCCSG) の ALL 治療プロトコール登録症例を中心として小児-ALL 209 例の表面マーカー解析を行った。このうち、30 例について、現行の 5 カラー解析と並行して、10 カラー解析を試験的に実施し、後者の有用性について検討した。Multi-color 解析でもっとも問題となるのは、相互の蛍光干渉が複雑になるために蛍光補正が非常に困難になる点であったが、最新の Digital flow cytometry では、自動的に至適な蛍光補正の Matirix 値を計算してくれることに加え、一端取得した List mode data に対して PC 上で蛍光補正を修正し直すことが可能であり、これを使用することによって、従来非常に困難であった 10 カラー解析を簡便に実施することが可能であった。実際の症例の解析結果は、5 カラー解析の結果とよく一致しており、診断に用いるのに充分の信頼性があると考えられた。さらに、同時に多数の抗原を測定することにより、白血病細胞の表面抗原の発現の相互関係が詳細に解析可能であり、同一症例に含まれる異なった抗原発現様式を示す白血病細胞の亜群検出に有用であった。

小児 ALL の診断に有用な新規マーカーについて検討を行なった。7.1(NG2)は、本邦の ALL 患児においても、MLL 遺伝子関連のキメラ遺伝子、特に MLL-AF4 を有する亜群に特異的に発現していることが明らかとなった。さらに、CD65(+), CD10(-), CD24(-)と組み合わせることにより、同亜群をほぼ完全に検出可能であることが qPCR の結果との照合によって確認された。上述の 10 カラー解析を用いて、これらの抗原と CD19, CD20, kappa, lamda 等の抗原を同時に測定することによって、BCP-ALL の診断と同時に MLL 関連のキメラ遺伝子を有する亜群の同定が、一挙に解析可能であった。

D. 考察

1. 小児がんの発現遺伝子解析：

小児 ALL の各亜群に特徴的な発現遺伝子が明らかとなった。今後さらに症例を増やし、これまでに行なってきたゲノム構造解析の結果や、治療反応性や臨床予後等との相関解析を行なうことにより、診断・治療に有用な標的因子の同定に結びつくことが期待される。

2. 小児 ALL のマーカー解析：

今回の検討の結果、小児 ALL の診断における Multi-Color 解析の有用性が明らかとなり、10 カラー解析の実用化が充分可能であることが示された。今後、特定の生物学的な特徴を有する ALL 亜群の検出に有用なマーカーを組み合わせて 10 カラー解析を小児 ALL の中央診断に実用化して行くことにより、マーカー検査のみでも、初期診断や治療の層別化に必要なより多くの情報が得られることが期待される。さらに、検査時間の短縮のみならず、使用検体を減らすことが可能であり、約 2×10^7 個の細胞を将来の基礎研究に向けた検体保存に回すことが可能となる。特に、現在では 50ng の RNA で網羅的発現解析が、また 500ng の DNA で網羅的ゲノム解析が実施可能であり、Multi-Color 解析によって節約される細胞によって、これらの解析に必要な検体を確保することが充分可能である。

E. 結論

小児 ALL の臨床検体を用いて、マイクロアレイによる網羅的発現遺伝子解析を実施した。今後ゲノム構造解析の結果と合わせて、さらに詳細な解析を進めることにより、小児白血病の診断や治療に有用な新規標的因子の同定に結びつくことが期待される。また、体

系的表面抗原解析について、10 カラー解析の小児 ALL 診断への実用化を検討した。今後新規マーカーの組み合わせによる小児白血病治療により有用なマーカー検査確立や、少しでも多くの残余検体を将来的な小児 ALL の治療改善に役立つ基礎研究のために保存することが可能となることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 2009 Jul;33(7):908-12. Epub 2009 Feb 24.
- 2) Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyokawa N. Kinetics and Effect of Integrin Expression on Human CD34(+) Cells during Murine Leukemia Virus-Derived Retroviral Transduction with Recombinant Fibronectin for Stem Cell Gene Therapy. *Hum Gene Ther.* 2009 Jul;20(7):777-83.
- 3) Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology.* 2009 Nov;128(3):405-19.
- 4) Onda K, Iijima K, Katagiri YU, Okita H, Saito M, Shimizu T, Kiyokawa N. Differential effects of BAFF on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. *Int J Hematol.* (in press).

2. 学会発表

- 1) 宮川世志幸, 大喜多肇, 佐藤伴, 片桐洋子, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 清河信敬. Wnt シグナル拮抗因子 DKK の Ewing 肉腫ファミリー腫瘍発生における機能. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 5月1日-3日, 2009.
- 2) 恩田恵子, 齋藤正博, 森鉄也, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 清河信敬. TCCSG-L1602 治療研究/Day8 末梢血-芽球数のフローサイトメトリー測定. 第 19 回日本サイトメトリー学会学術集会, 松江, 6月20日-21日, 2009.
- 3) 清河信敬, 恩田恵子, 高野邦彦, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 9 color フローサイトメトリーによる小児白血病のマーカー解析. 第 19 回日本サイトメトリー学会学術集会, 松江, 6月20日-21日, 2009.
- 4) 大喜多肇, 宮川世志幸, 佐藤伴, 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 family tumor 特異的融合遺伝子

EWS/ETS による Dickkopf1/2 の発現制御. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月1日~3日, 横浜.

- 5) 恩田恵子, 齊藤洋平, 飯島一智, 齋藤正博, 清河信敬. B 細胞性腫瘍に対する BAFF の効果. 第 71 回日本血液学会学術集会, 京都, 10月23日-25日, 2009.
- 6) 清河信敬, 恩田恵子, 飯島一智, 長谷川大輔, 加藤元博, 大喜多肇, 齋藤正博, 森鉄也, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏, 中川温子, 小川誠司, 藤本純一郎. 小児 B 細胞性リンパ腫のマイクロアレイを用いた molecular karyotyping と網羅的発現遺伝子解析. 第 71 回日本血液学会学術集会, 京都, 10月23日-25日, 2009.
- 7) 恩田恵子, 平林真介, 清河信敬, 齋藤正博, 森鉄也, 福島敬, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. TCCSG-L1602 治療研究における Day8 末梢血-芽球数のフローサイトメトリー測定についての評価. 第 51 回日本小児血液学会, 東京, 11月27日-29日, 2009.
- 8) 恩田恵子, 齊藤洋平, 飯島一智, 齋藤正博, 清河信敬. BAFF の B 細胞性腫瘍に対する効果の検討. 第 51 回日本小児血液学会, 東京, 11月27日-29日, 2009.
- 9) 清河信敬, 恩田恵子, 平林真介, 飯島一智, 福島敬, 齋藤正博, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 熊谷昌明, 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急性リンパ性白血病第 16 次治療研究におけるマーカー中央診断. 第 51 回日本小児血液学会, 東京, 11月27日-29日, 2009.
- 10) 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, 小児がん教育プログラムの整備 (公開系統講義・診断実習の構築), 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 11月27日~29日, 2009.
- 10) 恩田恵子, 片桐洋子, 清河信敬. Distinct effects of BAFF on human B cell neoplasms/B 細胞腫瘍に対する BAFF の効果. 第 39 回日本免疫学会学術集会, 大阪, 12月2日-4日, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

小児がんの中央診断と保存検体を活用したトランスレーショナルリサーチ

研究分担者 藤本 純一郎 国立成育医療センター研究所 副所長

研究要旨： 小児がんのトランスレーショナルリサーチ推進を支えるためのバイオリソース形成を目的として、小児固形腫瘍の検体保存、急性リンパ性白血病 (ALL) のマーカー中央診断および検体保存、急性骨髄性白血病の検体保存を継続した。デジタル4カラーフローサイトメトリー (FCM) を用いた自動測定システムを用いて、同一プロトコールで治療された小児 ALL 120 症例の治療8日目の末梢血残存白血病細胞絶対数を測定し、その結果を従来からの目算方での結果と比較解析した。両者の間には一定の相関性が認められたが、FCM 法の方がより低い値となる傾向が認められ、後者では染色過程で、治療によってダメージを受けた細胞が除去されてしまう可能性が示唆された。この検査は、小児 ALL の新たな治療層別化法として期待される。

A. 研究目的

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

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

小児がんは、成人のがんと比較した場合、発生頻度としては非常に低く、症例数も少ない希少疾患であり、上記目的を達成するためには、全国的規模の臨床共同研究の枠組みの中で中央診断および検体保存を行い、保存された臨床検体を有効に基礎研究に活用することが不可欠で

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

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

B. 研究方法

1. 小児がんの中央診断と検体保存：

成育医療センターでは、各小児がん治療研究グループと連携し、病理診断、キメラ遺伝子検出、マーカー等、中央診断の多くを担当している。本研究では、これらの活動を支えるための基盤研究として、中央診断および検体保存を効率的に行うための登録、データおよび余剰検体試料の保管、匿名化管理、等の体制の整備を行ってきた。本年は、上記のシステムを実際に運用し、小児白血病の検体保存を行なった。

2. 末梢血残存白血病細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

末梢血液を正確に 200 μ l 分取し、FITC、PE、PC5、PC7 の4種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる全血法の蛍光染色を行った。溶血後、

細胞を正確に 200 μ l のシース液に浮遊させ、正確に 200 μ l 分取した検定済の蛍光標識ビーズ(Flow-Count)と混和後、Digital flow cytometry (FC-500, Beckman Coulter 社)を用いて 1 レーザー4 カラー解析を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 小児がんの中央診断と検体保存：

引き続き、小児がんのトランスレーショナルリサーチ推進を支えるためのバイオリソース形成を目的として、小児腫瘍の中央診断と検体保存を行った。固形腫瘍に関しては、横紋筋肉腫 14 例、小児腎腫瘍 17 例の検体保存を行った。血液腫瘍等に関しては、急性リンパ性白血病(ALL) 新患 209 例、リンパ腫新患 70 例の中央マーカー診断と検体保存を行い、急性骨髄性白血病(AML) 新患 88 例の検体保存を行った。

また、本年度は、昨年度までに整備したシステムによって、実際に匿名化した保存検体の研究者への配分を行なった。

2. 末梢血残存白血病細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

昨年度までに治療 8 日目の末梢血残存白血病細胞絶対数を解析した小児 ALL 120 症例のうち、30 例について、従来から行なっている検鏡による目算法での値と照合を行なった結果、一定の相関を認めしたが、フローサイトメトリー(FCM)を用いた測定値の方が一般に低値となる傾向が認められた。特に、値が低い症例では、より高い相関を認めしたが、値の高い症例では相関が悪く、FCM による測定値が著しく低い症例も認められた。その原因についてさらに検討した結果、FCM による測定値が著しく低い症例では、単に芽球の絶対数のみでなく、白血球全体に対する芽球の割合が著しく低くなっている場合が多く、洗浄操作(洗浄液添加後、遠心、吸引)を行なわなくても同様の傾向が認められたことから、染色過程における溶血操作によって、芽球が選択的に破壊され

ている可能性が考えられた。

考察

1. 小児がんの中央診断と検体保存：

小児がんの病理・分子診断と検体保存、ならびにその分配の実施するシステムについては、昨年度までにほぼその整備が完了した。今回は、上記で整備した方法が実際に有用であることが確認された。残された課題として、各小児がん治療研究グループに登録されない症例(非参加施設の患者や、治療参加非同意例)や、希少腫瘍の症例について、どのように全国登録し、中央診断、検体保存を行うかという点について検討が必要であるが、これも含めて、今後、中央診断や検体保存(バイオリソース形成)は、本研究費とは別の資金的援助によって運営していく方向で検討を行なっている。

2. 末梢血残存白血病細胞数のフローサイトメトリーを用いた測定：

近年、小児 ALL の新たな治療層別化因子としてステロイド反応性が着目されており、現行の ALL の治療では、診断確定後 7 日間ステロイドを単独投与し、8 日目(Day-8)の末梢血中の白血病細胞絶対数を測定して、残存数が $\geq 1000/\mu$ l の場合は危険度が 1 段階上がる仕組みになっている。これまでの見当により、FCM を用いた測定方法が、Day-8 末梢血中芽球算定の客観性の高い方法として有用であることが示されているが、今回の検討により、その結果が従来用いられてきた目算法と一定の相関をもつことが明らかになった。また、一部に、FCM 法の方が著しく低い値になる症例が認められたが、これらの症例は、末梢血中に芽球が残存していても、ステロイドがある程度有効で、残存芽球が相当のダメージを受けており、染色の操作の過程でこれらの芽球が容易に破壊されてしまう可能性が考えられた。従って、目算法で Day-8 末梢血中芽球数が高かった症例の中で、FCM 法による測定値との相関が認められなかった症例については、さらに予後の上で区別できる可能性が考えられる。

E. 結論

これまでに整備してきたシステムを用いて、小児固形腫瘍・白血病の検体保存