

と配分、中央診断を行った。今後さらに、小児がんのトランスレーショナルリサーチ推進を支えるためのバイオリソース形成を目指す。また、小児 ALL 30 例について、治療 8 日目の末梢血残存白血病細胞の絶対数を、FCM と法と目算法との間で比較し、一定の相関を認めた。今後さらに正確かつ詳細な治療層別化法への応用が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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;33(7):908-12.
- 3) 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 MLV-derived retroviral transduction with a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2009;20(7):777-83.
- 4) Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J and 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;128(3):405-19.

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) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 9) 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.
- 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.
- 11) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

小児がんの遺伝子変異解析

研究分担者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨： 近年の分子遺伝学の進歩による小児がん発症と進展の分子メカニズムの解明は、新規治療薬剤の開発につながる事が判明してきた。我々はこれまで小児の急性骨髄性白血病（AML）のAML99プロトコールにおける遺伝子解析結果と予後との関係を明らかにしてきた。今年度はAML99で治療された138例におけるWT1遺伝子と臨床像の関係を検討した。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。また、まれな11p15転座型（NUP98遺伝子再構成）小児白血病10例のFLT3-ITD、RAS、KIT、WT1、AML1、NPM1、CEBPA遺伝子の解析を行ない、KIT、FLT3-ITDとWT1遺伝子の変異が高頻度であり、11p15転座型白血病の予後不良の原因であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、小児急性骨髄性白血病（AML）はチロシンキナーゼに関連する遺伝子の活性化変異と予後との関連が報告されている。我々はこれまで小児AML共同治療研究会で行われたAML99プロトコールにより治療された138症例の遺伝子異常（FLT3、KIT、MLL、RAS、NPM1、CEBPA遺伝子変異と、WT1遺伝子の発現解析）と予後との関連を明らかにしてきた。近年、正常核型のAMLでWT1遺伝子変異が予後因子であることが報告された。今年度はAML138例のWT1遺伝子の変異解析を行ない、予後との関係を検討した。

さらに、まれな11p15転座型（NUP98遺伝子再構成）小児白血病10例のFLT3-ITD、RAS、KIT、WT1、AML1、NPM1、CEBPA遺伝子の解析を行ない、KIT、FLT3-ITDとWT1遺伝子の変異が高頻度であり、11p15転座型白血病の予後不良の原因であることが示唆された。

B. 研究方法

WT1遺伝子はWilms腫瘍の原因となる癌抑制遺伝子と考えられている。WT1遺伝子の変異の解析は、AML99プロトコールのAML臨床検体138例についてRNAを抽出し、変異の報告のあるWT1遺伝子のexon7-9について、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法と直接塩基決定法にて変異の有無を検討し、

予後との関連について検討した。

11p15に座位するNUP98遺伝子とHOX遺伝子等との融合によって生じる11p15転座型白血病は、AMLの約2%をしめるまれなタイプの白血病である。この転座は主にAMLでみられるが、まれにT細胞型急性リンパ性白血病でみられる。この転座型の小児10例の検討では、FLT3-ITD、RAS、KIT、AML1、NPM1、CEBPAとWT1遺伝子のプライマーを作成し、PCR法またはRT-PCR法にて変異の検索を行なった。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

AML99138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。

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。

D. 考察

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る。現在 AML-05 プロトコール 350 症例の解析を準備している。

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。

E. 結論

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

また **11p15** 転座型小児白血病における遺伝子変異の臨床的意義を検討した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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

3) 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.

4) Kurosawa H, Okuya M, Matsushita T, Kubota T, Endoh K, Kuwashima S, Hagsawa 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

5) 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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

11) 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

12) 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.

13) 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

2. 学会発表

- 1) Park MJ, Taki T, Oda M, Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y : FBW7 and NOTCH1 mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell non-Hodgkin's lymphoma ; a Japan association of childhood leukemia study group. 第 48 回イギリス血液学会, イギリス 2008.4.5-9
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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トロメ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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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-myooclonus 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
- 8) 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

9) 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

10) 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

11) 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

12) 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

13) 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

14) 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

15) 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

16) 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

17) 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

- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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, 京都, 2009.10.23-25
- 22) 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
- 23) 橋本浩平, 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
- 24) 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、第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 25) 恩田恵子, 平林真介, 清川信敬, 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、第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009.11.27-29
- 26) 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 PI3K-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
- 27) 加藤元博, 滝田順子, 朴明子, 真田昌, 川俣紀彦, Claus Bartrum, H Phillip Koeffler, 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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クニ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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 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

36) 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

37) 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 ヶ月で再発をきたした上腹部腹壁デスマイド腫瘍の一例. 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

38) 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—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

39) 一之宮健二, 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 林泰秀, 木本富子, 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

40) 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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

小児がんの網羅的ゲノム解析による治療標的分子の探索

研究分担者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院 特任准教授

研究要旨： 高密度オリゴヌクレオチドアレイおよび CNAG/AsCNAR による神経芽腫の網羅的ゲノム解析の結果、標的分子として ALK を同定した。そこで神経芽腫以外の小児固形腫瘍 204 例において、ALK 遺伝子とその発症および進展に関与しているか否かの検討を行った。その結果、横紋筋肉腫(RMS)と Ewing 肉腫(ESFT)の新鮮腫瘍 3 例で高度増幅と kinase domain の germline 変異を検出し、ALK は RMS や ESFT の発症にも関与していることを見出した。

ALK の異常が RMS や ESFT でも検出されたことは、これらの疾患の分子病態における知見を深めただけでなく、ALK 活性を抑制する分子標的治療薬が RMS や ESFT に対しても画期的な治療薬になりうることを示している。

A. 研究目的

研究分担者らは、神経芽腫の臨床検体において高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて網羅的なゲノム異常の解析を行い、ALK 遺伝子が神経芽腫において高頻度に増幅・変異を生じることによって活性化している標的分子であることを示した。

ALK は神経芽腫で増幅・変異を起こしている他、悪性リンパ腫や肺癌において転座を生じその病態に関与していることが報告されている。しかし、これら以外のがんにおける ALK 遺伝子の関与は明らかにされていない。

そこで本研究では、神経芽腫以外の小児固形腫瘍204例において ALK 遺伝子の異常がその発症・進展に関与しているか否かの検討を行った。

B. 研究方法

1. 高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた網羅的ゲノム解析;

解析には高密度オリゴヌクレオチドである Affymetrix 社の GeneChip 250K アレイを用い、解析アルゴリズムとして分担研究者らが独自に開発した CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いた。このアルゴリズムは、SNP アレイでの解析結果を、PCR の kinetics に基づいて補正することにより、より解像度の高い正確な解析を可能としている。具体的には、検体試料から抽出したゲノム DNA を適切な制限酵素で消化し、断端に共通のアダプターを付加した後、PCR により増幅する。PCR 産物の精製後に DNaseI 処理により断片化し、biotin ラベルをした後、GenChip 250K アレイ上でハイブリダイゼー

ションを行う。CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いてデータを分析し、平均解像度約 6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数やアレル不均衡の解析を行い、ALK 領域のゲノム異常の詳細について検討を行った。

2. ALK 遺伝子の変異解析;

ALK 遺伝子の機能において重要である kinase domain について、dHPLC 法を用いて変異のスクリーニングを行い、直接変異解析法を行って変異の確認を行った。

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

C. 研究結果

1. 横紋筋肉腫における 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。

2. Ewing 肉腫における ALK 遺伝子の異常;

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。

D. 考察

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。

本研究の成果は 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臨床的にも非常に有意義なものである。今後は、臨床応用に向けて ALK 阻害剤の有効性や安全性に関する研究を進展させると同時に、次世代シーケンサーといったハイスループットゲノム解析も導入し、ALK と同様に治療のターゲットとなりうる小児固形腫瘍の新規標的分子の同定を目指す。

E. 結論

本研究により、ALK の異常が神経芽腫のみならず、横紋筋肉腫や Ewing 肉腫などの他の小児固形腫瘍においてもその病態に関与していることが示された。この成果は、ALK を抑制する分子標的療法が小児固形腫瘍の治療成績を向上させる可能性を示している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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)

2) 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, Koeffler HP. Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. *Haematologica.* 94:1301-6, 2009.

3) Kawamata N, Ogawa S, Gueller S, Ross SH, Huynh T, Chen J, Chang A, Nabavi-Nouis S, Megrabian N, Siebert R, Martinez-Climent JA, Koeffler HP. Identified hidden genomic changes in mantle cell lymphoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic array. *Exp Hematol.* 37:937-946, 2009.

4) 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, Koeffler HP, Ogawa S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature.* 460:904-8, 2009.

5) 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, Koeffler HP. Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol.* 34:1603-1612, 2009.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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, Koeffler HP. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Mol Cancer Res.* 7:665-77, 2009.

10) Akagi T, Shih LY, Kato M, Kawamata N, Yamamoto G, Sanada M, Okamoto R, Miller CW, Liang DC, Ogawa S, Koeffler HP. Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17)

acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations. *Blood*. 113:1741-8, 2009.

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

12) 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 (JMDP). Biol Blood Marrow Transplant*. 15(1 Suppl):39-41, 2009.

13) Nowak D, Le Toriellec E, Stern MH, Kawamata N, Akagi T, Dyer MJ, Hofmann WK, Ogawa S, Koeffler 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.

14) 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.

2. 学会発表

1) Kato M, Sanada M, Koto I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinei K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y & S, O.: Frequent inactivation of A20 through gene mutation in B-cell lymphomas. 第 71 回日本血液学会総会 2009

2) 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

3) 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

4) 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

5) Okubo J, Kato M, Takita J, Sanada M, Ohki K, Nishimura R, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y & S, O.: Molecular allelo-karyotype of adult acute lymphoblastic leukemia(ALL)and pediatric ALL. 第 71 回日本血液学会総会 2009

6) 加藤元博, 滝田順子, 陳玉彦, 真田昌, 大木健太郎, 滝智彦, 菊池陽, 林泰秀, 小川誠司 & 五十嵐隆: 小児がんにおける網羅的な Loss of heterozygosity(LOH)解析. 第 112 回日本小児科学会学術集会 113:278, 2009

7) 加藤元博, 真田昌, 加藤格, 佐藤康晴, 滝田順子, 竹内賢吾, 丹羽明, 野本順子, 林康秀, 五十嵐隆, 黒川峰夫, 千葉滋, 石川雄一, 岡本康司, 飛内賢正, 中釜斉, 中畑龍俊, 吉野正, 小林幸夫 & 小川誠司: B細胞性リンパ腫における標的遺伝子 A20 の欠失. 第 54 回日本人類遺伝学会 2009

8) 加藤元博, 真田昌, 加藤格, 佐藤康晴, 滝田順子, 竹内賢吾, 丹羽明, 陳玉彦, 中崎久美, 野本順子, 朝倉義崇, 赤塚美樹, 林泰秀, 五十嵐隆, 黒川峰夫, 千葉滋, 森茂郎, 石川雄一, 岡本康司, 飛内賢正, 中釜斉, 中畑龍俊, 吉野正, 小林幸夫 & 小川誠司: 網羅的ゲノム解析による B 細胞性リンパ腫における標的遺伝子 A20 の同定. *日本リンパ網内系学会誌* 49:85, 2009

9) 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

10) 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

11) 大木健太郎, 滝田順子, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 林泰秀, 五十嵐隆 & 小川誠司: 超高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた小児横紋筋肉腫における網羅的ゲノム解析. 第 112 回日本小児科学会学術集会 113:345, 2009

12) 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

13) 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, 菊池陽, 五十嵐隆, 林泰秀 & 小川誠司: Effects of selective ALK inhibitor to pediatric solid tumors. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009

14) 朴明子, 加藤元博, 清川信敬, 真田昌, 滝田順子, 小川誠司 & 林泰秀: Genome-wide analysis of pediatric T-cell leukemia/lymphoma. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009

15) 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: Genome-wide analysis using high-density SNP microarrays in

various types of cancer. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009

16) 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 54 回日本人類遺伝学会 2009

17) 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, 菊池陽, 五十嵐隆, 林泰秀 & 小川誠司: Mutations and amplification of ALK gene in pediatric solid tumors. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009

18) 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 陳玉彦, 加藤元博, 金兼弘和, 大喜多肇, 藤本純一郎, 真田昌, 菊池陽, 五十嵐隆, 林泰秀 & 小川誠司: 小児固形腫瘍における ALK 遺伝子の解析. 第 54 回日本人類遺伝学会 2009

19) 滝田順子, 陳玉彦, 加藤元博, 大平美紀, 菊池陽, 中川原章, 間野博行, 林泰秀, 五十嵐隆 & 小川誠司: 神経芽腫における ALK 遺伝子の解析. 第 112 回日本小児科学会学術集会 113:278, 2009

20) 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

21) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊池陽, 五十嵐隆, 林泰秀 & 小川誠司: Genome-wide copy number analysis of Ewing sarcoma family of tumour using high-density SNP-genotyping microarrays. 第 68 回日本癌学会学術総会 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

ゲノム・遺伝子発現情報からみた小児がんの臨床的特性の解明

研究分担者 大平 美紀 千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室 室長

研究要旨： 難治性小児がんの臨床的特性に強く関わる分子的特徴を明らかにし、新規治療法の開発および腫瘍層別化システムの構築に応用するため、Wilms 腫瘍、肝芽腫、神経芽腫を対象にこれらの腫瘍由来遺伝子を搭載した小児がん特化 DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析とゲノムコピー数異常の解析を行った。これまでに肝芽腫について両者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。今年度はゲノムパターンによるリスクグループ分類の再現性を検証するため、追加症例の肝芽腫のアレイ CGH 解析を行い、その有用性を確認した。

A. 研究目的

近年の化学療法の進展により、小児がんの予後は飛躍的に向上したものの、一部の小児がんについては依然として予後不良であり、早期層別化と新たな治療法の開発が望まれる。また、小児がんの臨床においては、治療後の生活の質を重視した治療戦略の選択は特に重要であり、その観点からも精度の高い腫瘍リスク分類システムの構築が急務である。

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

B. 研究方法

遺伝子発現解析： 3 種の小児がん（Wilms 腫瘍、肝芽腫、神経芽腫）から得た約 13,000 種類の独立遺伝子を搭載した小児がん特化型 DNA チップを独自に作製し、使用した。解析対象の凍結腫瘍組織から調製した total RNA 10 μ g を Cy3 色素で、コントロールとして常時用いる複数のがん細胞株由来 RNA の混合物を

Cy5 色素で蛍光標識してプローブを作製し、DNA チップへのハイブリダイゼーションを行った。発現レベルが患者予後に強く相関する遺伝子を統計解析により抽出したのち、独立サンプルを用いた再現性の確認を行った。

ゲノムコピー数異常解析： 500ng のゲノム DNA を対象とし、ヒトオリゴアレイ（アジレント社）あるいは BAC アレイ（UCSF 製）を用いてアレイ CGH 解析を行った。

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

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

肝芽腫についてはこれまでに 60 症例についてアレイ CGH 解析を行い、ゲノムコピー数異常のパターンと予後との比較から、コピー数変化が染色体の長腕あるいは短腕全体に高頻度に起こっているパターンの症例に予後不良症例が多数含まれることが示された。また、同サンプルセットを対象とした小児がん DNA チップを用いた遺伝子発現解析からも遺伝

子発現プロファイルが肝芽腫の予後と強く相関することを示した。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、予後と相関するゲノム異常の指標として染色体内の breakpoint 数をカウントするとともに各染色体の平均対数蛍光比の絶対値を合計し、それぞれ中央値を境界に二値化したところ、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。染色体内 breakpoint 数による分類においても同様の結果が得られたが、層別化の性能は前者の染色体腕レベルによる判定の方が優っていた。統計解析により診断時年齢、病期、病理診断、AFP タンパク質のレベルなど既知の臨床マーカーや β カテニン遺伝子変異の有無とともに、ゲノム異常パターンによる分類の予後因子としての評価を行うと、予後と特に有意に相関を示す因子は病期 ($p < 0.01$, Hazard ratio: 9.0) とゲノム異常パターン ($p < 0.01$, Hazard ratio: 10.6) であった。また、多変量解析による独立性の検討では、病期とゲノム異常パターンはそれぞれ予後に関して独立の因子であり ($p < 0.05$)、病期に優る新規予後マーカーとしての性能が示された。予後不良パターンで特徴的なゲノム異常は 2、6、8、12、20 番染色体全体の増加と 4q の欠失であり、1p の欠失と 1q の増加は予後良好タイプを含む肝芽腫全体に高頻度に見られる異常であった。

Kaplan-Meier 解析では、ゲノム異常パターンによる分類で予後良好パターンに分類された症例群は 5 年生存率が 95% 以上であるのに対し、予後不良パターンに分類された症例群は約 70% であることから、後者の症例群に対してはアレイ CGH による分類に加え、他のマーカーを用いたさらなる予後分類が必要である。これ

までに我々は DNA チップによる遺伝子発現データが予後と強く相関することを見いだしており、今回相関の強い上位ランキングの遺伝子 100 遺伝子を独立した 16 例を用いた半定量 RT-PCR 法を行うことにより再現性の検証を進めた。その結果、特に良好な再現性を示した遺伝子は約 20 遺伝子であった。これらの遺伝子の発現パターンとゲノムコピー数異常パターンを組み合わせることで、新しいリスク分類の構築に応用できると考えられる。今後さらに各ステージの症例に対して検証を進め、より精度の高い分類法の構築を目指す。

D. 考察

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。

E. 結論

小児がん DNA チップによる遺伝子発現解析とアレイ CGH 法によるゲノムコピー数異常パターンは肝芽腫においてそれぞれ独立な新規予後マーカーであり、2 つを組み合わせることにより、診断後早期に効率よく進行がんを見分け、適切な治療戦略の選択に寄与できる可能性が示された。今後は各腫瘍について進行中の臨床試験に付随した前方視的研究としての体制を整備し、遺伝子発現およびゲノム異常データを導入した早期腫瘍リスク分類の構築を目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Microarrays. *Cancer Informatics* 7: 141-57, 2009.

2) 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.

3) 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.

2. 学会発表

1) 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.

2) 太平美紀、大羽成征、中村洋子、好田忠行、淵岡美佐、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.

3) 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.

4) 太平美紀、大羽成征、小島俊男、丹羽崇史、滝田順子、加藤元博、小川誠司、中村洋子、上條岳彦、石井信、中川原章. ゲノム異常パターンに基づく神経芽腫の新規リスク分類の構築- ALK 遺伝子異常とゲノムコピー数異常の統合解析. 第 51 回日本小児血液学会総会・第 25 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 舞浜, 11月27日-29日, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

難治性小児がんの悪性度診断

分担研究者 中川 温子 国立成育医療センター 臨床検査部 病理診断科 医長

研究要旨： 難治性小児がんにおける腫瘍生物学的特性を指標とした悪性度診断を確立するために、悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫などの小児がんにおける中央診断システムを確立し、診断法の標準化を試みた。さらに発がんに重要な **cyclin kinase inhibitor (CKI)** 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および分子標的療法の開発に向けた基礎データを得た。

A. 研究目的

小児がんは近年の集学的治療法の進歩により、適切な治療が行われれば生存率は平均 70 % に達するようになった。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、悪性度に応じて QOL を考慮した治療層別化を体系的に行っていくことが今後の課題となっている。

この課題を達成するためには、各小児がん疾患あるいは各症例の生物学的特性を分子レベルで明らかにしていくことが必要である。本研究では、包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）を通じて、難治性小児がんの臨床的特性に関する分子情報を明らかにし、その知見に基づいた新規診断・治療法の開発を行う。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の確立や新規治療モデルの提示を目指す。これを支える基盤整備として中央診断と検体保存システムを確立して診断法の標準化や、臨床・基礎研究の推進を図る。また、従来の組織学的診断を補填するべく、難治性小児がんにおける腫瘍生物学的特性を指標とした悪性度診断の確立し、分子標的療法の開発に向けた基礎データを集積する。

B. 研究方法

治療を効率的に開始するために、中央病理診断の迅速化を目的とした、Rapid Review（2週間以内に報告）と Group Review（複数の専門病理医によるコンセンサス診断による最終診断）による中央病理診断システムにより、悪性リンパ腫、

横紋筋肉腫、神経芽腫の病理診断を行った。それぞれの小児がんの組織型に応じた免疫組織化学染色パネルを作成した。Epstein-Barr virus 関連リンパ増殖性疾患のなかで、本邦では特に T 細胞性リンパ増殖性疾患が問題となるため、悪性リンパ腫の免疫染色パネルに peripheral T-cell lymphoma を追加した。

悪性リンパ腫の悪性度診断について、従来の組織学的分類に従わない、細胞周期制御の異常をもとにした新分類が提案された（Blood 2003;101:1220-35）。この分類によると小児悪性リンパ腫も Low-growth fraction lymphomas、High-growth fraction lymphomas、Highly aggressive lymphomas の3つに分けられる。Highly aggressive lymphomas はサイクリンキナーゼインヒビターの不活化を背景にしており、p16^{INK4a}-cyclinD-CDK4-Rb、p14^{ARF}-MDM2-p53-p21^{CIP1}、p27^{KIP1}-cyclin E-CDK2 といった G1 期制御機構の異常を背景にしている。悪性リンパ腫（Burkitt リンパ腫 7 株；Ramos, Daudi, EB-3, Raji, Balm18, Namalwa, Balm24）、Anaplastic large cell lymphoma 4 株；SR-786, DEL, Su-DHL1, Karpas299）、神経芽腫（7 株；SK-N-RA, SK-N-SH, LA-N-5, SK-N-BE(2), NB39nu, SMA-KAN, SMS-KCNR）の細胞株について、western blot 法にて、細胞周期関連分子（Rb, phospho-Rb, p16, p21, p27）の発現について検討した。さらに p16^{INK4a}-cyclinD-CDK4-Rb の異常を確認した Anaplastic large cell lymphoma 細胞株（DEL, Su-DHL1）を用いて Transporter peptide を用いた p16^{INK4a} 細胞内分子標的療法の基礎的検討を行った。まず、ALCL 細胞 2 株（DEL, Su-DHL1）を 96 穴プレ

ートに 5000/well の濃度で蒔き、輸送体ペプチドと p16^{INK4a} 機能性ペプチドを混合して複合体を形成させ、培養液中へ添加後、37°Cで 3 日間培養し、WST アッセイにて生細胞数を計測し、増殖抑制効果を検討した。次に p16^{INK4a} ペプチド添加による phospho-Rb 蛋白発現の変化を western blot 法にて比較した。また 6 週齢 SCID マウスに ALCL 細胞株(DEL)を皮下接種し、p16^{INK4a} ペプチド 8μM 皮下注による抗腫瘍効果について検討した。p16^{INK4a} ペプチド皮下注後 24 時間の腫瘍面積を 1 として比較した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 悪性リンパ腫中央病理診断システム (JPLSG)

悪性リンパ腫として登録された症例 368 例について Rapid Review による中央病理診断を行った(2004 年より通算)。Group Review が終了し、コンセンサス診断ができた症例は、323 例であった。下記のごとく、免疫組織化学染色を全例に施行した。組織型は、Diffuse large B-cell lymphoma 53 例、Burkitt lymphoma 71 例、Mature B-cell lymphoma 11 例、B-ALL 6 例、Precursor B lymphoblastic lymphoma 22 例、Precursor T lymphoblastic lymphoma 60 例、nonT nonB lymphoblastic lymphoma 3 例、Anaplastic large cell lymphoma (systemic) 78 例、Cutaneous anaplastic large cell lymphoma 7 例、Hodgkin lymphoma 6 例、Peripheral T cell lymphoma 1 例、EBV related lymphoproliferative disorders 2 例、Myeloid sarcoma 1 例、Biphenotypic leukemia 1 例で、検体不良で組織診断できなかった症例が 1 例あった。2008 年は WHO 分類第 4 版が発行され、いくつかの新項目が策定されたが、この中の B-cell lymphoma, unclassifiable, with features inter mediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma に分類された症例が

Mature B-cell lymphoma 11 例中 6 例あった。これらの症例の鑑別については、捺印標本およびパラフィン切片を用いた FISH 法による c-myc 転座の検討も加えた。

鑑別診断のための免疫染色項目 (悪性リンパ腫)

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

2. 神経芽腫中央病理診断システム (JNBGS)

2009 年は前年の約 2 倍の 62 例 (2006 年より通算 129 例) について中央病理診断システムにより、病理診断 (INPC 病理国際分類) を行った。内訳は、外科療法を大量化学療法に遅延させて行う局所遅延療法 (11 例) においては、Favorable Histology 2 例、Unfavorable Histology 9 例、高リスク群に対する標準的化学療法 (44 例) では、Favorable Histology 1 例、Unfavorable Histology 41 例、検体不良で Neuroblastoma, NOS と診断された例が 2 例であった。組織型別では、Neuroblastoma 39 例(undifferentiated, high MKI 2, poorly differentiated, low MKI 18, poorly differentiated intermediate MKI 5, poorly differentiated, high MKI 12, poorly

differentiated, NOS 1, Neuroblastoma, NOS 1)、Ganglioneuroblastoma, nodular 4 例、その他 1 例であった。試験登録されない症例 68 例についても中央病理診断を行い、Favorable Histology 28 例、Unfavorable Histology 32 例、評価不能 6 例、治療後 2 例であった。

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

3. 横紋筋肉腫中央病理診断システム (JRSG)

2009 年登録症例 30 例 (2004 年より通算 178 例) について中央病理診断システムにより、病理診断を行った。HE 染色に加え、鍍銀染色、免疫組織化学染色 (desmin, MyoD1, myogenin) を全例に施行した。組織型別では、Embryonal rhabdomyosarcoma 12 例、alveolar rhabdomyosarcoma 9 例、Mixed alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma 2 例、Non-rhabdomyosarcoma 7 例であった。

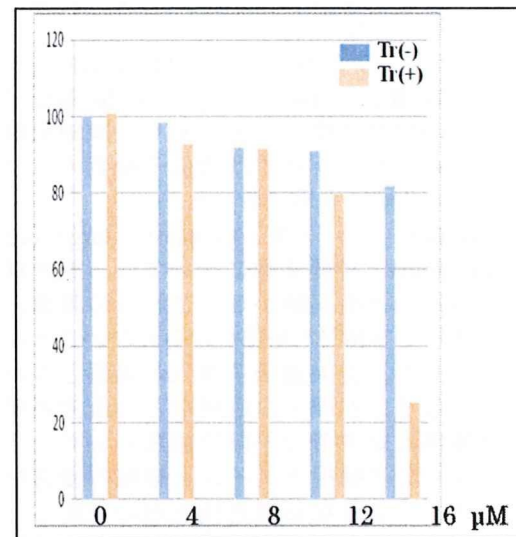
FKHR 遺伝子増幅については、パラフィン切片上でも一部の固定条件などが不良な切片を除いては、良好なシグナルが得られ、FKHR 遺伝子転座についての判定を行うことができた。

4. 細胞周期関連分子の発現と p16^{INK4a} 細胞内分子標的療法の基礎的検討について

Burkitt リンパ腫 7 株においては、全て p16^{INK4a} 発現がなく、Rb/phospho-Rb は過剰発現の傾向がみられた。P21, p27 発現については細胞株の間でばらつきがあり、一定の傾向を示さなかった。ALCL4 株においては、1 株 (Su-DHL1) を除いて p16^{INK4a} 発現がなく、Rb/phospho-Rb, p27 は全株で発現していた。神経芽腫 7 株においては、1 株 (SMS-KCNR) を除いて p16^{INK4a} 発現がなく、p27 は全株で発現が認められた。

	Rb	pRb	p16	p21	p27
SR-786	+	+	-	+	+
DEL	+	+	-	+	+
Su-DHL1	+	+	+	+	+
Karpas299	++	++	-	-	+

ALCL 細胞 2 株 (DEL, Su-DHL1) に p16^{INK4a} 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。



細胞株 DEL における p16^{INK4a} ペプチド導入後の増殖抑制率

p16^{INK4a} ペプチド添加 48 時間後の phospho-Rb 蛋白発現は、p16^{INK4a} の発現がない細胞株(DEL)では 8 μ M 添加で 30 %、16 μ M 添加で 45 %低下したが、p16^{INK4a} が発現している細胞株(Su-DHL1)では 8 μ M 添加で 5 %しか低下せず、16 μ M 添加ではむしろ 15 %増加した。

p16^{INK4a} 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 日目まで対照 (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。

D. 考察

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

横紋筋肉腫の中央病理診断では、Non-rhabdomyosarcoma とされた症例（診断違い）が 23%あり、rhabdomyosarcoma の診断の難しさと病理診断均てん化の必要性が明らかとなった。

パラフィン切片を用いた FISH 法による MYCN 遺伝子増幅や c-myc, FKHR 遺伝子転座の判定は概ね可能であり、凍結組織が得られない症例では遺伝子検索の方法として非常に有用であった。

Burkitt リンパ腫、anaplastic large cell lymphoma、神経芽腫については、細胞株における予備実験から、これらの腫瘍に共通して p16^{INK4a} 発現がみられないことが判明した。従来遺伝子導入が困難とされているリンパ腫・白血病などの血液系悪性腫瘍に対する分子標的療法として、たんぱく分子捕捉ドメインと細胞内浸透性ドメインよりなる輸送体を用いた新しいペプチド・タンパクの細胞内導入システムが開発されており、今回このシステムを用いた p16^{INK4a} ペプチド導入実験を行った。ALCL 細胞株において、輸送体ペプチドと p16^{INK4a} 機能性ペプチドの複合体を添加後 72 時間で、有意な増殖抑制効果が認められた。p16^{INK4a} が発現していない細胞株（DEL）においては、p16^{INK4a} 複合体ペプチド導入により Rb のリン酸化が抑制され、p16^{INK4a} の機能が補填されることが確認された。マウス ALCL xenograft への p16^{INK4a} 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、p16^{INK4a} 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。

さらにそれぞれの症例での細胞周期関連分子の発現解析により、予後因子とし

ての意義や分子標的療法の可能性を追求していく予定である。

E. 結論

小児がん（悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫）の中央病理診断システムおよび免疫組織化学染色、遺伝子検索を駆使した標準的診断法を確立した。今後さらに分子レベルでの生物学的特性について解析を進め、悪性度診断に有用な特性を明らかにし、分子標的療法など治療開発に向けた検討を試みる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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

2. 学会発表

- 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

5) 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

6) 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

7) 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 「糖原病 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

8) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他

難治性小児がんの薬物代謝関連遺伝子多型解析とその臨床応用

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

研究要旨： 小児急性リンパ性白血病（ALL）に対する前方視的多施設共同治療研究である東京小児がん研究グループ（TCCSG）ALL L07-16-02 登録例を対象として、ALL に対する薬物治療の効果、毒性の個体差と薬物代謝関連分子の遺伝子多型の関連を検証する研究計画を立案した。小児 ALL において治療反応性との関連が報告されている *TS*、および *GST* 遺伝子多型のスクリーニング解析系を準備し、各種細胞株を用いて予備解析を行った。本研究は、TCCSG ALL L07-16-02 研究担当者と事前に詳細な打ち合わせを行い計画されたが、その後の手続に、多くの議論、多くの時間を要し、本報告書作成時点までに TCCSG 研究審査委員会による本研究の実行の承認は得られなかった。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

1) 対象

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

2) 試料

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

3) 解析対象遺伝子

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

glutathione S-transferase (GST), *solute carrier (SLC)*, *dihydrofolate reductase (DHFR)*, *thymidylate synthase (TS)*, *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)*, *thiopurine S-methyltransferase (TPMT)*, *ABC transporters*, *CYP*, *aldehyde oxidase*, *xanthine oxidase (XO)*, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)*, *CR*, *AKR*,

NR3C1, FPGS, GGH, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFRD1), methionine synthase (MS), serine hydroxymethyltransferase (SHMT), transcobalamin2 (Tc2), cystathionase, cystathionine-β-synthase, cyclin D1 (CCND1), inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase), VDR, NQO1.

4) 解析方法

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

(倫理面への配慮)

TCCSG ALL07-16-02 研究への参加者の中から、自由意思により本研究に参加する者のみを研究対象とする。本研究の対象である患者は未成年者であるため、担当医は代諾者からインフォームドコンセントを取得する。また、患者が研究参加の決定等の意志を表すことができる場合は、法的な資格のある代諾者からの同意の他、さらに未成年者である患者の意志を確認する。TCCSG ALL07-16-02 研究登録患者には TCCSG データセンターから登録番号が付与され、登録患者の個人情報患者診療施設から外部に知られることはない。対象患者から採取された検体、臨床情報を示すフローシートには登録番号のみが添付される。したがって、本研究の担当者・関係者が対象患者の個人情報を知り得る機会はない。検体提供患者の診療施設において、TCCSG ALL07-16-02 研究、および本研究の倫理審査が行われ、承認されていることを必須とする。本研究に提供される検体は末梢血 5ml のみである。本研究の遺伝子解析の結果は、現時点で対象患者の治療を変更するため

の明確な根拠にはなり得ず、対象患者の治療に介入するものではない。したがって本研究が対象患者の治療に危険を及ぼすことはない。

C. 研究結果

1) TCCSG ALL L07-16-02 付随研究手続き

「小児急性リンパ性白血病に対する寛解導入療法と早期強化療法の有効性・安全性に関する検討試験 (TCCSG ALL L04-16, 改訂第 2 版 L07-16-02) 付随研究 小児急性リンパ性白血病における治療反応性、毒性の個体差と薬物代謝関連遺伝子多型の検討」研究計画書を作成し、多施設共同研究における検体受領、処理、保存体制の整備・確認を行った。2007 年 11 月に本遺伝子解析研究、12 月に TCCSG ALL L07-16-02 臨床研究の実行について、国立成育医療センター倫理審査委員会の承認を得た。研究計画書は TCCSG L07-16-02 研究の付随研究としての審査のために 2008 年 3 月に TCCSG 研究審査委員会に提出された。2008 年 8 月に初回の審査結果が届き、多型解析対象遺伝子の特定、遺伝子多型解析結果の開示などの事項について議論が生じた。報告書作成時点まで TCCSG 研究審査委員会による審査結果は未着で臨床研究の開始には至っていない。

2) *TS*、および *GST* 遺伝子多型のスクリーニング解析の整備

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

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