

mRNAによるMRDの3本立てで行う。その他に、Interfant グループが行っている特異的 *MLL* fusion 配列を標的にした PCR-MRD の導入を検討している。これらの結果により、次々期プロトコールでの MRD による層別化の可能性を探る。MLL-10 での *MLL* 遺伝子再構成の診断は各施設または各施設が契約している検査機関において FISH 法により行われるが、形態(東京医科歯科大学)と細胞表面マーカー(三重大学)については中央検査および診断、キメラ遺伝子解析(SRL)については中央検査が予定されている。

(6) AML-05(横澤敏也委員)

AML-05 では 6 月 20 日時点で 362 例のキメラ解析を行い 134 例(44.4%)でキメラを検出した。*AML1-ETO* が 82 例(27.2%)を占め、*CBF-MYH11* が 19 例(6.3%)、*MLL-AF9* が 23 例、*MLL-ELL* が 4 例であった。P05 では 25 例中 *PML-RAR α* が 22 例であった。*FLT3-ITD* は 296 例の解析で 34 例(11.5%)が陽性であった。附随研究のキメラ遺伝子を用いた MRD は AML-05 では 53 例で 182 検体、P05 では 147 例で 38 検体の登録があった。

(7) 分子中央診断(滝智彦委員)

AML-05 登録症例の形態、マーカー、染色体とキメラなどが不一致であった症例についてメールで検討を行っている。データセンターから形態中央診断、マーカー中央検査、キメラ遺伝子スクリーニング、*FLT3-ITD*、染色体検査の結果が担当委員宛に全例送付されている。必要な場合には FISH 解析、キメラ遺伝子解析などの追加検査が行われている。*MLL* の関与が疑われるケースについては診断のためのフローチャートを作成し、それによってどのような時にどの検査を追加すればよいか明確になった。一方で、5q-や monosomy 7 などの高リスクとなる異常の中に診断が非常に難しいケースが存在すること

がわかり、このようなケースをどのように取り扱うかが今後の課題となった。

D. 考察

AML の AML-05 プロトコールの中央診断が順調に行われ、診断の精度が高まり、臨床試験のレベルの向上に貢献している。

ALL においては、FCM-MRD 解析は費用が安価である利点があるが、実際にやっていくなかでいくつかの問題を検討中である。プロトコールが開始された再発 ALL では MRD の検討を行っており、抗体の統一も含め標準化を 3 施設で検討している。T-ALL と B 前駆型 ALL については検討中である。

遺伝子を用いた ALL の分子 MRD は再発 ALL で開始され、T-ALL と B 前駆型 ALL では準備中である。検索を行う人員、費用の問題があり、特に B 前駆型 ALL の分子 MRD を行うにはもう一施設検索できる施設を立ち上げる必要がある。

E. 結論

今年度は AML の中央診断が順調に行われている。また再発 ALL の MRD を開始し、T-ALL と B 前駆型 ALL の MRD の実用化について検討を行い準備している。

F. 健康危険情報

該当なし。

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, 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
 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 myelogeneous 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. 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
5. 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
6. 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-myoclonus 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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

11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 佐野弘純, 久保田知里, 朴明子, 嶋田明, 外松学, 滝智彦, 田渕健, 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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
 24. 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
 25. 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
 26. 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
 27. 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
 28. 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
 29. 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ス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
 30. 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
 31. 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
 32. 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
 33. 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
 34. 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
 35. 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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)

分担研究報告書

小児固形腫瘍の病理中央診断システムの確立と病理診断の標準化に関する研究

研究分担者 堀江 弘 千葉県こども病院検査部病理科 検査部長

研究要旨

本研究の目的は希少腫瘍、あるいは臨床研究非登録例を含む全ての固形腫瘍を対象とした新しい中央病理診断システムを確立し、そのアウトカム等を研究しうる基盤を構築し、併せてその診断精度の向上のため病理診断業務の標準化に向けた取り組みを行うことにより、小児固形腫瘍の治療成績の向上に寄与することである。本年度は中央病理診断システムのアウトラインを策定し、小児固形腫瘍共通検体取扱い手順書を作成した。また、診断担当医の整備を行い、各種の臨床研究グループにその概要を提示し、ほぼコンセンサスを得る段階にいたっている。本年度の中央病理診断の実績については、神経芽腫 55 例、腎腫瘍 43 例、肝腫瘍 35 例、横紋筋肉腫 30 例の計 163 症例で、全臨床研究登録症例(179 例)の 91.1%を占めている。臨床研究グループ非参加症例は現在コンサルテーション扱いとなっているため、正確な症例数は把握されていないが、小児腫瘍組織分類委員会委員関連諸施設への依頼状況からみて、年間 50 例ほどに及ぶと推測される。

各種の固形腫瘍の中央診断の基準となる診断の手引の作成にも取り組んでおり、その素案が出来上がりつつあるので、そのアウトラインを提示した。

研究協力者(小児腫瘍組織分類委員会委員)

石田 剛 国立国際医療センター国府台病院
井上 健 大阪市立総合医療センター
大喜多 肇 国立成育医療センター研究所
小林庸次 大阪市立総合医療センター
田中祐吉 神奈川県立こども医療センター
恒吉正澄 九州大学
中川温子 国立成育医療センター病院
中山雅弘 大阪母子総合保健医療センター
秦 順一 前国立成育医療センター長
浜崎 豊 静岡県立こども病院
平戸純子 群馬大学病院病理部
藤本純一郎 国立成育医療センター研究所
北條 洋 福島県立医科大学
宮内 潤 東京歯科大学市川病院
森川征彦 都立清瀬小児病院
横山繁昭 北海道子ども総合医療療育センター

A.研究目的

小児固形腫瘍の治療あるいは臨床研究においては、精度の高い中央病理診断システムの確立が不可欠である。本研究においては臨床研究グループ症例のみでなく、他の希少な小児固形腫瘍の治療の向上にも寄与しうる中央病理診断システムを確立することをめざしている。また、中央病理診断の対象となった症例の臨床データを蓄積し、それらの観察研究などに資することを目指している。また、診断の精度の向上のため、小児固形腫瘍の診断の手引きを作成する。

B.研究方法

1. 国立成育医療センター内に小児腫瘍中央診断委員会事務局を設置し、その病理診断には小児腫瘍組織分類委員会のメンバーが主体的に関わる。
2. 診断精度の向上のため、診断の手引の作成、診断チームの充実、コンセンサス診断の確立を

図る。

3. 観察研究を含めた新診断システムの実施に当たっては、各医療施設のコンセンサスあるいは患者サイドの同意などが必要であるため、段階的な新システムへの移行を模索する。

C. 研究結果

今年度における病理中央診断システムの立ち上げに向けての決定事項ならびに中央病理診断の実績は以下のとおりである。

1. 診断対象のデータ集積によるアウトカム研究を目指すという基本方針のもと、新中央診断システム案が作成され、臨床サイドの基本的なコンセンサスが得られ、小児固形腫瘍共通検体取扱い手順書作成などにより、依頼者の利便性をも考慮している。

2. 国立成育センター内に小児腫瘍中央診断委員会事務局が設置され、肝腫瘍を除く共同研究グループ症例の受付、診断作業、標本管理等の業務がスタートした。来年度からは肝腫瘍症例もこのルートに集約される見込みである。

3. 2009年の小児固形腫瘍の中央診断症例は、神経芽腫 55 例、腎腫瘍 43 例、肝腫瘍 35 例、横紋筋肉腫 30 例の計 163 症例で、全臨床研究登録例 (179 例) の 91.1% を占めている。臨床研究非参加症例は現在コンサルテーションとして実施されており、全国的なその数は把握しがたいが、当分類委員会委員の関連する諸施設での依頼状況からみると、年間 50 例ほどに及ぶと推測される。なお、小児固形腫瘍の病理中央診断の現状についての詳細は、平成 22 年 2 月 6 日成育医療研究委託事業・中川班と当委員会との共催で実施された小児腫瘍セミナーにおいて報告した。

4. 全国の小児医療施設における固形腫瘍診断に対する理解を広め、小児固形腫瘍治療の均てん化に資するため、診断の手引を作成中であるが、その概要は以下のとおりである。

肝腫瘍においては国際的な組織分類に準拠して、小児腫瘍組織分類委員会が作成した新組織分類を中央診断の基準とすること、Ewing 腫瘍

においては各種のキメラ遺伝子検索を含めた診断を標準とすることなどを明記している。さらに神経芽腫、横紋筋細胞肉腫、小児腎腫瘍などの手引、分子遺伝学的な検索などに供する検体の提出法などを加えた冊子作成を目指している。

D. 考察

新しい小児固形腫瘍中央診断の基本となる小児固形腫瘍観察研究実施計画書が作成されたが、データベース構築のためには、各臨床研究グループの合意が不可欠で、患者サイドの同意も必要となる。この点に関しては現実的にはかなり難しい問題を含んでおり、過渡期的な方策を考え段階的に実行していくことが現実的であると考えている。

E. 結論

小児固形腫瘍の治療の均てん化を図るためには、中央病理診断システムの構築は不可欠で、その対象についても全ての腫瘍種を包括したものであることが望まれる。また、その診断精度向上のためには、各種の腫瘍に対する理解や適切な診断材料をうることが重要であるので、固形腫瘍診断の手引の作成に努めたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 堀江 弘: 胚細胞腫瘍. 小児内科、小児外科編集委員会編: 小児疾患診療のための病態生理 2. 小児内科 41 (増刊号): 1236-1239, 2009

2) Oue T, Fukuzawa M, Okita H, Mugishima H, Horie H, Hata J, Saito M, Nozaki M, Chin M, Nakadate H, Hinotsu S, Koshinaga T, Kaneko Y, Kitano Y, Tanaka Y, Japan Wilms Tumor Study Group: Outcome of pediatric renal tumor treated using the Japan Wilms Tumor Study-1 (JWiTS-1) protocol: A report from the JWITS Group. *Pediatr Surg Int* 25: 923-929, 2009

3) 大植孝治、福澤正洋、大喜多 肇、金子安比古、北野良博、越永従道、齋藤正博、田中祐吉、陳 基明、中館尚也、野崎美和子、秦 順一、樋之津史郎、堀江 弘、麦島秀雄: 日本ウィルムス腫瘍スタディグループ-1 (JWiTS-1) 登録症例の追跡調査報告. 小児がん 46: 349-358, 2009

4) 日本小児病理学会小児腫瘍組織分類委員会: 2008 年小児腫瘍症例検討会抄録. 小児がん 46: 219-245, 2008

5) Ohshima J, Haruta M, Arai Y, Kasai F, Fujiwara Y, Ariga T, Okita H, Fukuzawa M, Hata J, Horie H, Kaneko Y: Two candidate Tumor Suppressor genes, MEOX2 and SOSTDC1, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor. Genes Chromosomes Cancer 48: 1037-1050, 2009

6) 永井雄一郎、赤羽久昌、小林 純、堀江 弘: 肝腫瘍の一例. 小児がん 46: 226, 2009

7) 梶 幸子、永井雄一郎、堀江 弘: Infantile myofibromatosis の一例. 小児がん 46: 240, 2009

8) 堀江 弘: 新疾患概念であることが確認された Nested stromal epithelial tumor of the liver の1例. 小児がん 46: 244, 2009

9) 堀江 弘: 小児の肝腫瘍: 肝芽腫の組織分類の改訂にあたって. 日病会誌 98: 205, 2009

2. 学会発表

1) 肝芽腫の組織分類の改訂にあたって 堀江 弘 第 98 回日本病理学会総会、コンパニオンミーティング 京都 2009.5.2

2) 小児期固形腫瘍 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— 北條 洋、堀江 弘、藤本純一郎、他 第 98 回日本病理学会総会 京都 2009.5.1

3) XP11.2 転座/TFE3 遺伝子融合に関連した腎細胞癌の一例. 梶 幸子、杉山孝弘、池部 大、堀江 弘、他 第 98 回日本病理学会総会 京都

2009.5.2

4) 門脈血流異常症に伴う肝細胞性結節性病変の一例. 近藤福雄、堀江 弘、福里利夫、他 第 98 回日本病理学会総会 京都 2009.5.3

5) 成人女性に発生した胎児性(未分化)肉腫の一例. 永井雄一郎、赤羽久昌、堀江 弘、他 第 98 回日本病理学会総会 京都 2009.5.3

6) 小児がんに対する標準治療・診断確立のための研究 —小児腫瘍組織分類委員会の取り組み— . 堀江 弘 厚生省科研堀部班会議 名古屋 2009.6.21

7) 横紋筋細胞への分化を示した大脳膠腫症の 1 例. 2009 年小児腫瘍症例検討会 東京 2009.9.4

8) 教育講演: 小児肝胆膵腫瘍組織分類の改訂について. 2009 年小児腫瘍症例検討会 東京 2009.9.4

9) 特異な血管拡張性病変を伴った骨髄移植関連腸管微小血管障害—2 剖検例の病理組織学的検討を中心に— 堀江 弘、古舘和季、角田 治美、他 第 25 回日本小児がん学会総会 千葉 2009.11.27

10) 小児固形腫瘍の生物学的特異性の解明と新たな病理組織分類アトラスの作成. 堀江 弘、秦 順一、恒吉正澄、他 第 25 回日本小児がん学会総会 千葉 2009.11.29

11) 小児腫瘍組織分類委員会の活動. 堀江 弘 第1回小児腫瘍児セミナー 東京 2010.2.6

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

小児固形腫瘍の分子・細胞遺伝学的中央診断システム確立のための研究

研究分担者 大喜多 肇 国立成育医療センター 室長

研究要旨 小児固形腫瘍の分子・細胞遺伝学的診断として RT-PCR を用いて腫瘍特異的融合遺伝子を検出する際の問題点を抽出して、その原因と対策について考察し、内部精度管理手順書(案)を作成した。問題点は、検体送付施設側に起因するものと、検体解析施設側に起因するものがあげられるが、送付側に起因する問題は、検体処理法を周知・徹底する必要があると考えられた。検体解析施設側に起因する問題点は、内部精度管理手順書のもとで適切に管理することにより、制御可能と考えられた。信頼性の担保された遺伝子解析を行うことにより、小児腫瘍診断の更なる質の向上が期待される。

A. 研究目的

小児固形腫瘍の頻度は低い、多様ながん種、組織型が含まれるため、しばしば病理診断が困難である。一方で、成人の固形腫瘍と比較すると分子遺伝学的な異常が明確なケースが多く、分子診断が行われる例も少なくない。とくに骨軟部肉腫などの一部の腫瘍では、腫瘍特異的な染色体転座とそれに由来する融合遺伝子の発現が知られている。小児の骨軟部腫瘍や一部の腎腫瘍では、染色体転座に由来する融合遺伝子が腫瘍に特徴的に存在する。Ewing 肉腫ファミリー腫瘍に対する EWS/FLI1、EWS/ERG、胞巣型横紋筋肉腫に対する PAX3/FKHR、PAX7/FKHR が良く知られているが、よりまれな滑膜肉腫や線維形成性小細胞腫瘍、先天性線維肉腫・先天性間葉芽腎腫においても融合遺伝子の存在が知られている。それらの検出は腫瘍の確定診断を下す上で重要であるが、多くの場合、頻度が低いためにコマーシャルベースの検査は行われない。染色体転座や融合遺伝子の検出法としては、凍結検体を用いた RT-PCR 法や、FISH 法によるゲノムレベルでの切

断の検出が一般的である。RT-PCR 法は、ごく微量サンプルから DNA を増幅することができるため、感度に勝るが、指数関数的にサンプルが増幅するためにサンプル混入等の影響を強くうける。また、遺伝子解析の腫瘍診断における意義を考えると、その信頼性担保は重要な問題である。そのため、本年度は RT-PCR 法によるキメラ遺伝子解析法に共通する問題点を明らかにし、内部精度管理の精度向上を目的とした。

B. 研究方法

過去に行った Ewing 肉腫ファミリー腫瘍、横紋筋肉腫の遺伝子解析 60 例の経験より、腫瘍診断上および検体取扱い上の問題点を抽出した。その原因を考察し、対策をまとめた。それらの問題点を考慮に入れ、内部精度管理の手順書(案)を作成した。遺伝子解析方法は、凍結検体を用いた RT-PCR 法であり、凍結された腫瘍組織より、RNA を抽出し、Molony Mouse Leukemia Virus 由来の逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。融合遺伝子の 5' 側の遺伝子にセンスプライマーを、3' 側の

遺伝子にアンチセンスプライマーを設計し、RT-PCRを行ない、増幅したDNAを電気泳動、エチジウム・ブロマイドで可視化しPCR産物の有無を判定した。

(倫理面への配慮)

患者あるいは代諾者のインフォームド・コンセントが得られた腫瘍検体を使用した。また、研究実施にあたっては国立成育医療センターの倫理委員会に申請し承認を得た。

C. 研究結果

過去の腫瘍診断を目的としたRT-PCR法による遺伝子解析における問題点を抽出し、その原因を考察し対策をまとめた。問題点は主に検体採取から受領までの問題点と検体受領後の遺伝子解析における問題点に大別された。

検体採取から受領までの問題点としては、(1)検体受領時における凍結検体の融解、不適切な検体処理(ホルマリン等による固定、液体とともに凍結)、送付票が付されていない等、基本的な事項も挙げられた。多くの場合、検体の品質の多少の低下はあると推定されるものの、融合遺伝子検出という点では大きな問題とはならなかったが、ホルマリン固定されたケースなど、検体不良となり通常の方法では解析できないケースもあった。一方、検体受領から解析、結果報告までの問題点としては、検体送付施設による不適切な検体処理に起因するものと、検体解析施設側の問題が挙げられた。検体解析施設側の問題としては、cDNA合成の不良、PCR時のコンタミネーション、非特異的なPCR産物の増幅などが挙げられた。これらは、解析毎に適切な対照サンプル(標準サンプル)を置くことにより判明するものであり、引き続き、これらの問題点によって誤判定とならないよう適切な解析を行う必要性が確認された。

抽出された問題点を考慮したうえで、内部精度管理手順書(案)を作成した。遺伝子解析結果の

信頼性を担保するための項目を広く対象とすることとし、検体採取後の保管、搬送等も含めた。

内容は、(1)検体受領までの精度管理、(2)検体受領とその記録、(3)検体の処理と診断、(4)解析結果の判定方法、(5)解析結果の報告方法を含むものとした。(1)検体受領までの精度管理として、検体採取後の検体の取り扱いや保管、搬送方法などの注意事項について各施設に対し具体的に周知・徹底することをあげた。具体的には、検体を可能な限り速やかに凍結すること、凍結前にホルマリンで固定しないこと、凍結検体はディープフリーザーで保管すること、搬送時には、十分量のドライアイスとともに梱包すること、などがあげられた。(2)検体受領とその記録に関しては、既に行われていることであるが、台帳による検体受付記録(受領日、検体番号、年齢、性別、施設名、担当部署、担当医、受領した検体の種類と数量、備考情報、検体取り扱いの適正度)の管理を行うことが挙げられた。(3)検体の処理と診断としては、既に解析手順書に記載されている項目もあるが、精度管理として必要な項目を抽出した。具体的には、各症例の解析ごとに、陽性コントロールとして、原則として検査する融合遺伝子を発現する細胞株に由来するcDNA、陰性コントロールとしては、検査する融合遺伝子を発現しない細胞株に由来するcDNAをおくこと、また、作業中の混入の可能性を否定するために逆転写反応時に逆転写酵素を入れないサンプルを用意することがあげられた。また、検体の品質、cDNA合成の品質確認のために、 β アクチン等のハウス・キーピング遺伝子を利用したPCR法を行うことがあげられた。検体の解析・処理内容については、専用のノートに記載し、検体を管理するために、保管場所と残量、種類を専用のノートに記載する。(4)診断結果については、作業担当者が判断したのち、解析責任者が、確認、最終決定する。(5)診断結果は、最終的に病理学的な所見と矛盾するところがないか確認し、矛盾する

場合、病理診断担当者と連絡を取った上で、Fluorescence in situ hybridization 法等による検査結果の確認が必要かどうか検討することとした。

D. 考察

過去の遺伝子解析における問題点を抽出し、内部精度管理手順書(案)を作成した。検体搬送までの問題点の多くは、検体送付施設に、具体的な情報提供を行い、周知・徹底することによって解決可能と考えられた。しかしながら、臨床試験の計画書や検体取扱い手順書に、検体の取り扱い方法は記載されており、各施設における担当者の変更や、担当者が検体を取り扱いに慣れていないこと、人手不足が根底にある可能性もあると考えられた。直ちに実行可能な対策として、地道な啓蒙活動が必要と考えられた。

現時点では、腫瘍の診断は病理組織診断が標準であり、一部の腫瘍で、遺伝子診断の重要性が認識されつつあるが、病理学的な診断と遺伝子解析結果が1:1で対応するか否か、治療法決定の上で何を拠り所とすべきか、さらに検討していく必要がある。今後、病理診断と提携した形で、分子中央診断システムを確立することでより精度の高い診断法が確率できると期待される。

精度管理上の将来的な課題として、RNA濃度が低い場合の判断基準の設定、コントロールサンプルの品質の担保(基準)に対する検討、検査担当者に対する定期的な技能確認を行うかどうか、などがあげられる。

E. 結論

小児固形腫瘍の分子・細胞遺伝学的診断としてRT-PCRを用いて腫瘍特異的融合遺伝子を検出する際の問題点を抽出して、その原因と対策について考察し、内部精度管理手順書(案)を作成した。問題点は、検体送付施設側に起因するものと、検体解析施設側に起因するものがあげられるが、

送付側に起因する問題に対しては検体処理法を周知・徹底する必要性が考えられた。検体解析施設側に起因する問題点は、内部精度管理手順書のもとで適切に管理することにより、制御可能と考えられた。信頼性の担保された遺伝子解析を行うことにより、小児腫瘍診断の更なる質の向上が期待される。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 大喜多 肇, 秦 順一. ウイルムス腫瘍(特集: 小児疾患における臨床遺伝学の進歩). 小児科 2009;50(7):1115-1120

2. 学会発表

なし

H. 知的財産件の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)

分担研究報告書

小児固形腫瘍の中央診断システムに基づく分子遺伝学的予後因子の探索と生物学
的リスク分類に関する研究

研究分担者 千葉県がんセンター 中川原 章

研究要旨

わが国における小児固形腫瘍の中央組織保存および標準化された遺伝子診断のモデルとして、全国規模の神経芽腫組織バンクおよび遺伝子診断システムの構築を行って来た。平成7年の開始以来、検体数は2800に達しており、国際的にも最も多数の精度の高い保存検体となっている。現在の通常検査は、DNA ploidy (FACScan)とMYCN増幅有無のFISH法と定量的PCR法による測定であるが、on-line systemでその結果を主治医に返送する体制は完全に定常化し、これまでのところ全く問題は生じていない。日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)登録検体数も徐々に増え、160件に達した。個々の症例について問い合わせや要望がある検体については、必要に応じて、アレイCGH検査、発現ミニチップ検査、Alk等遺伝子変異解析を行った。システムは整い、よく機能しているが、それを支える恒常的かつ安定的な資金獲得が問題である。

A. 研究目的

小児固形腫瘍の治癒率は向上したものの、未だ難治性の小児固形腫瘍は、社会的・医学的に極めて重要な問題となっている。なかでも進行症例が60%以上を占める神経芽腫の予後は悪く、早急に新しいリスク分類と治療治癒率向上のための診断・治療法を開発することが待たれている。そこで、我々は、本班研究において、わが国に相応しい中央病理診断と中央分子遺伝学診断のあり方と残存検体の保存法について検討し、その体制確立をとおして、さらに新しいリスク分類の確立を図る。

B. 研究方法

日本全国の日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)登録施設および非登録施設から送られてくる神経芽腫サンプル(凍結組織、新鮮生

組織、末梢血)と匿名化された必要最小限の臨床情報を収集した。DNA ploidy (FACScan)とMYCN増幅をFISH法と定量的PCR法によって測定し、7-10日以内にon-line systemでその結果を主治医に返した。

C. 研究結果

千葉県がんセンター研究局における神経芽腫・腫瘍バンクは順調に展開し、開設以来14年を経て、全国から約2800検体が収集された。この中には、600検体にのぼるマスキングで発見された神経芽腫検体が含まれ、世界的にも有数の検体センターとなっている。平成21年度は、過去の検体約1600例(JNBSG登録症例は除外)に関してフォローアップ調査を行い約90%の回収率を得た。この結果、長期にわたる8年生存率の算定が可能となり、わが

国で唯一の最近の症例の長期生存率が出つつある。手術摘出検体(凍結組織、冷蔵生組織、末梢血)は、原則として手術日またはその翌日に当センターであらかじめ用意された搬送用ボックスに入れて発送され、翌日到着後、一週間以内にDNA ploidy、MYCN copy number(FISH法とreal time PCR法)の結果がオンライン(パスワード付き)で主治医に報告される体制が完全に確立された。また、診断や予後判定が困難なため主治医から依頼のあった検査については個別に協議し、必要な追加検査を行うシステムも確立した。それらには、アレイ CGH、選ばれた200遺伝子を搭載したミニチップ検査(TrkAを含む)、ALK 遺伝子変異解析などが含まれ、すべて国際的な標準化された検査および診断体制となっている。また、国立生育医療センター病理部と連携した診断困難な個々の症例の詳細な heterogeneity に関する検討体制、および、国立がんセンター生化学部と連携した網羅的なDNAメチル化検査体制も確立した。したがって、神経芽腫の検体センターおよび国際標準に則った遺伝子診断体制とその他施設連携がほぼ完全に整い、世界的にも最先端のシステムが確立した。現在、わが国の神経芽腫検体の約7割以上が当センターに送られて来ると推測される。

D. 考察

小児がんのみならず、現在もなお難治性のがんを克服するためには、新たなリスク分類が開発される必要がある。神経芽腫は、小児悪性固形腫瘍の中でも発生頻度が高いうえに治癒率が低く、臨床的に最も問題となっているがんである。そのために、系統的な中央診断体制の確立と標準化された診断法、さらには、新規診断法の開発が必要とされているが、それを行うためには系統的な検体保存体制が整備されなければならない。我々は13年前より独自の神経芽腫検体センターを立ち上げ、これまでに約 2800 検体の保存を行った。これは、世界的にも有数のものであり、精度の高さを考えると世界で最もクオリティの高い保存検体と言える。平成21年度は、JNBSGで検体保存および利用のための体制整備が進められ、いよいよ新たなステップに進める段階となった。したがって、JNBSG としての診断と検体保存体制はほぼ確

立されたので、新しい治療プロトコルの作製と臨床試験の推進が待たれる。

E. 結論

わが国における神経芽腫の、中央病理診断と中央遺伝子診断体制がほぼ確立し、検体の保存および利用システムも動き始めた。今後は、JNBSG によるグループスタディの体制確立と臨床プロトコルの作成が早急に行われ、一刻も早い新しいリスク分類の開発研究に繋がることを期待する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y, Ozaki T, Isogai E, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, Nakagawara A. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Int. J. Oncol.* 34:931-938, 2009.
2. Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Sakai R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 28:662-673, 2009.
3. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson ADJ, Maris JM. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: Report from the international neuroblastoma risk group (INRG) biology committee. *Br. J. Cancer* 100:1471-1482, 2009.
4. Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin MA, Stupack D, Nakagawara A, Rousseau R, Combaret V, Puisieux A, Valteau-Couanet D, Bénard J, Bernet A, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J. Exp. Med.* 206:833-847, 2009.

5. Komatsu S, Takenobu H, Ozaki T, Ando K, Koida N, Suenaga Y, Ichikawa T, Hishiki T, Chiba T, Iwama A, Yoshida H, Ohnuma N, Nakagawara A, Kamijo T. Plk1 regulates liver tumor cell death by phosphorylation of TAp63. *Oncogene* 28:3631–3641, 2009.
6. Ozaki T, Okoshi R, Sang M, Kubo N, Nakagawara A. Acetylation status of E2F-1 has an important role in the regulation of E2F-1-mediated transactivation of tumor suppressor p73. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386:207–211, 2009.
7. Ozaki T, Okoshi R, Ono S, Kubo N, Nakagawara A. Deregulated expression of E2F1 promotes proteolytic degradation of tumor suppressor p73 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387:143–148, 2009.
8. Sang M, Ando K, Okoshi R, Koida N, Li Y, Zhu Y, Shimozato O, Geng C, Shan B, Nakagawara A, Ozaki T. Plk3 inhibits pro-apoptotic activity of p73 through physical interaction and phosphorylation. *Genes Cells* 14:775–788, 2009.
9. Haraguchi S, Nakagawara A. A simple PCR method for rapid genotype analysis of the TH-MYCN transgenic mouse. *PLoS ONE* 4:e6902, 2009.
10. Suenaga Y, Kaneko Y, Matsumoto D, Hossain MS, Ozaki T, Nakagawara A. Positive auto-regulation of MYCN in human neuroblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390:21–26, 2009.
11. Wetterskog D, Moshiri A, Ozaki T, Uramoto H, Nakagawara A, Funo K. Dysregulation of platelet-derived growth factor β -receptor expression by Δ Np73 in neuroblastoma. *Mol. Cancer Res.* 7:2031–2039, 2009.
12. Koshikawa N, Hayashi J-I, Nakagawara A*, Takenaga K*. Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1 gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J. Biol. Chem.* 284:33185–33194, 2009.
13. Okoshi R, Ando K, Suenaga Y, Sang M, Kubo N, Kizaki H, Nakagawara A, Ozaki T. Transcriptional regulation of tumor suppressor p53 by cAMP-responsive element-binding protein/AMP-activated protein kinase complex in response to glucose deprivation. *Genes Cells.* 14:1429–1440, 2009.
14. Suenaga Y, Ozaki T, Tanaka Y, Bu Y, Kamijo T, Tokuhisa T, Nakagawara A*, Tamura T*. TATA-binding protein (TBP)-like protein is engaged in etoposide-induced apoptosis through transcriptional activation of human TAp63 gene. *J. Biol. Chem.* 284:35433–35440, 2009.
15. Kojima S, Hyakutake A, Koshikawa N, Nakagawara A, Takenaga K. MCL-IV, a novel mouse antiapoptotic MCL-I variant, generated by RNA splicing at a non-canonical splicing pair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:492–497, 2010.
16. Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A. LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392:252–257, 2010.
17. De Katleen P, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris JM, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A, Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schulte JH, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. Accurate Outcome Prediction in Neuroblastoma across Independent Data Sets Using a Multigene Signature. *Clin. Cancer Res.* 16:1532–1541, 2010.
18. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Westerhout E, Lakeman A, Hoebeeck J, Van Maerken T, Laureys G, Schulte JH, Noguera R, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Kogner P, Martínsson T, Nakagawara A,

- Ohira M, Caron H, Eggert A, Versteeg R, Speleman F. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutations spectrum in tumors with MYCN amplification. *J. Clin. Oncol.* (Accepted)
19. Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamiyo T. Bmi1 is a MYCN target gene and regulates tumorigenesis via repression of KIF1B β and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene* 2010. (Accepted)
20. Yamada C, Ozaki T, Ando K, Suenaga Y, Inoue KI, Ito Y, Okoshi R, Kageyama H, Kimura H, Miyazaki M, Nakagawara A. RUNX3 modulates DNA damage-mediated phosphorylation of tumor suppressor p53 at Ser-15 and acts as a Co-activator for p53. *J. Biol. Chem.* 2010. (Accepted)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

小児がん患者の臨床検体の保存と研究利用システム確立のための研究

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

昨年度に作成した日本小児白血病・リンパ腫研究グループ(JPLSG)における余剰検体の分譲に係る手順書を本年度改訂し、手順が明瞭となるよう図示した。この手順に基づいて現在、2件の研究用分譲依頼について検討が進んでいる。内1件はすでに分譲可能な保存検体リストを研究者に送付済みである。残り1件については該当する治療委員会に予備的な情報提供を行ったが、現在は手順に基づいてJPLSG運営委員会へ研究申請を実施中である。また、余剰検体の保存と分譲に係る経費確保について、米国 Children's Oncology Group(COG)での基準を調査した。

A. 研究目的

日本小児白血病・リンパ腫研究グループ(JPLSG)への症例登録と中央診断への同意の下に提出され、かつ、研究への使用について同意された余剰検体の保存と分譲を行い、トランスレーショナルリサーチを推進することを目的とする。

B. 研究方法

1) 余剰検体の分譲に係る手順書の作成

昨年度、分譲の手順書を作成したが、本年度は見直しを行い、手順が明瞭となるよう図示した。また、一部具体的な様式も作成した。この作業は、JPLSG データセンター(DC)ならびに JPLSG 運営委員長と協議しながら進めた。

2) 余剰検体の分譲に係る手順書の活用

完成した手順を2件の提案研究へ活用した。具体的内容は研究結果に記す。

3) 米国 Children's Oncology Group(COG)における検体の保存と分譲に係るルール

米国 COG における余剰検体の保存と分譲に係る手順の中で特に経費に係る部分について、過去に COG の検体センターを訪問した際のインタビュー内容ならびにホームページ情報により今回の報告書を作成した。また、米国全土で展開中のがん検体提供システムである Cooperative Human Tissue Network

(CHTN)における経費についても検討した。

C. 研究結果

1) 保存中の余剰検体の分譲に係る手順書の作成

昨年度、「余剰検体の分譲に係る手順書 Ver1」を作成したが、実情に合わせるため本年度改訂を行った。図1にその概要を示す。今回の改訂では、余剰検体を使用した研究の承認までの手順(図の上段)と研究が承認された後の手順(図の下段)とに分け、各々の手順を概説した。これによって、研究者、担当する各委員会、データセンターおよび保存センターの役割がより明瞭になった。

2) 余剰検体の分譲に係る手順書の活用

今年度改訂した手順に従って、JPLSG が実施する臨床試験において中央診断のために提出され、かつ、余剰分が保存されている検体に係る具体的な分譲作業を開始した。JPLSG 内規に従って余剰検体の研究への使用が承認された研究計画について実施した。対象となる試験は急性骨髄性白血病を対象としたAML05研究である。今回は、手順図下段の承認された後のケースである。運営委員会の指示に従って、DCと連携しながら作業を開始した。

作業上の重要な点は、研究への使用に係る同意の有無の確認作業である。DCからは研究者に対して定期的に確認の作業を実施しているため、今回は比

較的順調に情報が入手できた。

同意の有無を確認した上で、保存センターで管理している余剰検体リストから、同意ありの検体、すなわち、分譲可能な検体のリストを作成し、研究者(今回は治療委員会が個々の研究を中央管理しているため AML 委員会)へ送付した。現在、担当者レベルで分譲を希望する検体にチェックをつける作業を実施中である。

もう一件の事例は、すでに登録が終了し観察期間中となっている試験に係る検体の分譲である。今回の問い合わせは治療委員会からのもので、委員会として研究を計画しているとのことであった。手順図を示し、未だ、上段の承認前の段階であることを相互に確認し、運営委員会への申請手続きから行うことを決めた。

3) 米国 Children's Oncology Group(COG)における検体の保存と分譲に係るルール

米国 COG はあらゆる小児がん種に対する臨床試験を実施する研究グループであり、政府資金のみならず民間資金や寄付金により運営されている。そこで、COG における余剰検体の保存ならびに分譲に係るシステムについて特に経費面での仕組みを調査研究した。

COG では、検体のほとんどが米国全土からオハイオ州コロンバス市の Nationwide Children's Hospital (旧称、コロンバス小児病院)に設置されている Biopathology Center に一旦送付される。ここの受付ならびに総責任は病理部門が担当しているが届けられた検体は目的に応じて、分配、処理、検査ならびに多施設への送付等の作業が行われる。これらの作業の後に余った検体が保存される。保存された検体は、COG が承認した研究に対して分譲される、という仕組みである。経費については、善意に基づいて提供された検体に対して価格を設定することはできないが、搬送、検査、保存、分配等に費やした研究者等の時間と努力については請求できる、としている。実際の経費は、詳細に決められている(表1を参照)。また、上記 Biopathology Center も小児がん検体部門として参加している CHTN と呼ばれるがん検体のバーチャルバンキングシステムにおいても検体の経費

についての考え方とルールが明記されている(表2)。

COG Biopathology Center

<http://www.biopathologycenter.org/Researcher.aspx?Page=FS>

CHTN ・Frequently Asked Questions

<http://www.chtn.nci.nih.gov/faq.html#cost>

D. 考察

昨年度作成した余剰検体の分譲に係る手順書を見直し、実際の使用に耐えるものとした。検体分譲については、研究実施者、治療委員会、運営委員会、DC、検体センター等が関与するため、情報伝達が複雑になる。そこで、それらの関係が容易となるように手順を図示し、理解が容易となるように努めた。

本年度からこの手順に従って、分譲作業を開始している。研究者側に分譲可能な検体リストを送付済みであり、要望が届き次第、検体送付作業を開始できる。今後、さらに経験を積み、より良いものに改訂する。

小児血液腫瘍の臨床研究の実施には多大な経費が必要だが、現状では十分な資金は確保されていない。今年度、米国 COG における検体の分譲に係る経費に対する考え方を調査した結果、研究者負担にしている部分があることが判明した。わが国での研究環境を考慮する必要もあるが、受益者負担に近い考え方の導入を検討する時期がきているのかも知れない。

E. 結論

JPLSG における保存中の余剰検体の分譲に係る手順を見直し、手順がより明瞭となるよう改訂した。また、改訂した手順に従って分譲に係る作業を開始した。

余剰検体の保存と分譲に係る経費について、米国 COG における同様の経費に関する考え方やルールを調査した。

F. 健康危険情報

該当なし

Ann Oncol, in press.

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyagawa Y, Okita H, Itagaki M, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. EWS/ETS regulates the expression of the Dickkopf family in Ewing family tumor cells. *PLoS One*. 2009;4(2):e4634.

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

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.

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.

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, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology*. 2009 Nov;128(3):405-19.

Yang L, Fujimoto J, Qiu D, Sakamoto N. Trends in cancer mortality in the elderly in Japan, 1970-2007.

Akahane K, Inukai T, Inaba T, Kurosawa H, Look AT, Kiyokawa N, Fujimoto J, Goto H, Endo M, Zhang X, Hirose K, Kuroda I, Honna H, Kagami K, Goi K, Nakazawa S, Sugita K. Specific induction of CD33 expression by E2A-HLF: the first evidence for aberrant myeloid antigen expression in ALL by a fusion transcription factor. *Leukemia*, in press.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

JPLSG余剩検体を使用する研究の手順
研究申請から検体分譲まで

研究者

治療研究委員会

運営委員会

研究審査委員会

データセンター

検体保存施設

個人情報管理者

研究計画書の
素案を作成

申請

審査結果
受領

研究素案
受領

依頼

予備審査
報告

検討結果
受領

通知

申請

審査結果
受領

検討結果
の審議

通知

研究計画書
審査

研究承認まで

分譲依頼

1-(1)

承認

1-(3)

承認

1-(5)

承認通知および分譲作業開始指示

3-(3)

臨床情報
ファイル

4-(3)

分譲検体
リスト

5-(1)

同意確認

5-(2)

研究承認後

検体受領

4-(5)

検体搬送

4-(4)

分譲検体
リスト

検体分注

4-(4)

検体情報
ファイル

5-(3)

分譲検体情報
ファイル作成

5-(4)

参照表
JPLSG番号・保存番号
・分譲番号・臨床情報

受領書

4-(5)

受領書

4-(6)

通知受領

3-(4)

分譲作業
完了通知

5-(5)

通知受領

2-(3)

図1. 余剩検体の分譲に係る手順 (図示)