

Figure 4. TLC immunostaining of ganglioside GD2 and Ac-GD2. (A) The lipids extracted from  $1 \times 10^5$  cells were separated on HPTLC plates and immunostained with mAb 14.G2a. (B) The lipids of  $1 \times 10^5$  CHP134 cells separated on an HPTLC plate was treated with alkali and immunostained with mAb 14.G2a.

NB1, NB16 and CHP126, were strongly or significantly stained (lanes 6-11). These results are essentially consistent with those obtained with LC-MS.

As shown in Fig. 4B, when the TLC plate was treated with alkali after TLC development to remove acetyl group from sialic acid residues, the band newly produced by the conversion of Ac-GD2 to GD2 was detected at a position with a higher Rf value than GD2. Taken together with the results of the LC-MS analysis, these findings show that Ac-GD2 is expressed in NB cells.

#### Clustering analysis of gangliosides expressed in NB cells.

The above results imply that the NB cell lines have distinct glycolipid expression profiles that allow them to be classified in several groups. As shown in Tables IV, V and Fig. 5, the profiles of glycosphingolipid GD1a, GD2 and acetylated GD2 expression varied from cell line to cell line. We therefore performed a clustering analysis centered on these three glycosphingolipids, and the results showed that the NB cell lines could be classified into three groups based on their expression of these three gangliosides (Fig. 5B). The NB9, NB69, SK-N-SH, SK-N-RA and GOTO cells were characterized by high expression of GD1a and low expression of GD2/acetylated GD2 and classified as type A here, whereas CHP126, IMR32, NB1 and NB16 cells were characterized by

low expression of GD1a and high expression of GD2/acetylated GD2 and classified as type B. CHP134 and KP-N-NS cells, on the other hand, were characterized by expression of both GD1a and GD2/acetylated GD2 and classified as type AB. Interestingly, all three *MYCN* non-amplified cell lines were classified as type A.

**Expression of ganglioside synthase mRNA detected by RT-PCR in NB cell lines.** To investigate the relationship between ganglioside expression and the level of expression of enzymes involved in ganglioside biosynthesis, RT-PCR analysis was used to investigate the NB cell lines for mRNA expression of two ganglioside synthases. As shown in Fig. 6A, the results showed a high level of GD3 synthase mRNA expression (*ST8SIA1*) (Fig. 1) in the types B and AB cell lines, whereas mRNA expression of *B4GALNT1*, which is responsible for catalyzing the synthesis of both GM2 and GD2 (Fig. 1), was detected in all of the cell lines.

**RNA expression of neural differentiation markers detected by RT-PCR in NB cell lines.** To investigate the biological significance of the classification of NB cell lines based on their ganglioside expression profile, we investigated expression of neural-differentiation-related genes by RT-PCR and assessed the relation between their expression and glycolipid expression. As shown in Fig. 6B and C, RT-PCR analysis revealed that mRNA expression of the neural-differentiation-related genes *Phox2a* and *b*, *TrkC*, neurofilament, and *N-CAM* was positively correlated with GD2 and acetylated GD2 expression in the NB cell lines. By contrast, mRNA expression of pleiotrophin (*PTN*) tended to be high in cell lines with a low level of GD2 expression. All *MYCN* non-amplified cells show low *MYCN* expression by RT-PCR (Fig. 6D).

## Discussion

In this study we used an LC-MS analysis system to detect glycosphingolipid expression in NB cells and clearly demonstrated its great potential as a tool for glycosphingolipid research. As shown above, the LC-MS analysis was highly sensitive and enabled detection of a number of glycolipids expressed in NB cells that were not detected by HPTLC analysis. This approach allows determination of even low percentages of lipids of each molecular species and showed clear differences between the glycosphingolipid profiles of a series of NB cell lines. The method described in this report should be useful and easily adaptable to glycosphingolipid analysis of various types of tumor cells.

In this study we also demonstrated the presence of acetylated forms of gangliosides in NB cells. As described above, we detected acetylated forms of GD1a, GD3, GD2, GD1b and GT1b in NB cells by LC-MS analysis and expression of acetylated GD2 was found to be high. For example, Ac-GD2 accounted for >10% of the total ganglioside in NB1 and NB16 cells. The presence of acetylated GD2 was correlated with expression of GD2. Ye and Cheung demonstrated that O-acetylated GD2 is a naturally occurring ganglioside derivative in human tumors, including in NB, by using mAb 3F8, which specifically recognizes GD213, and our data are consistent with their findings.

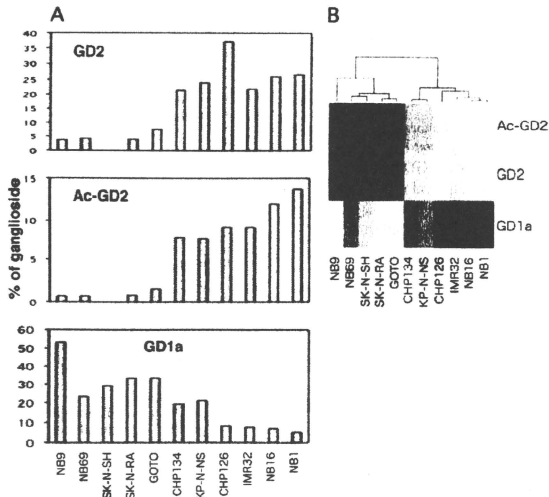


Figure 5. Hierarchical clustering of differentially expressed gangliosides. (A) The percentage of Ac-GD2, GD2 and GD1a to the total gangliosides of NB cell lines. (B) The clustering tree shows the expression pattern and similarity in cell lines. The strength of the ganglioside expression was gradually increased on the heat map.

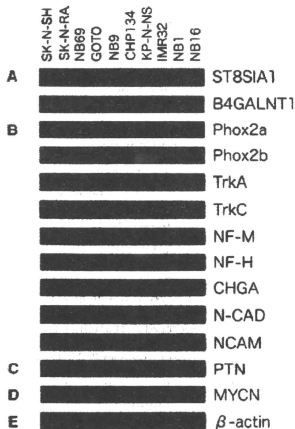


Figure 6. Analysis of expression of neural-differentiation-related genes and glycosyltransferase genes by RT-PCR. (A) Glycosyltransferase genes (Fig. 1). (B) *Phox2a*, paired-like (aristaleless) homeobox 2a; *Phox2b*, paired-like homeobox 2b; *TrkA*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1, also known as *NTRK1*; *TrkC*, neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3, also known as *NTRK3*; *NF-M*, neurofilament 160 kDa subunit; *NF-H*, neurofilament 200 kDa subunit; *CHGA*, chromogranin A; *N-CAD*, N-cadherin and *NCAM*, neural cell adhesion molecule, (C) *PTN*, pleiotrophin, (D) *MYCN*, v-myc myelocytomatosis viral related oncogene. (E)  $\beta$ -actin was used as an internal control.

The biological significance of ganglioside acetylation has not been fully elucidated, but it is thought to modulate cell function by regulating the ability of gangliosides to bind cell adhesion molecules. For example, CD22B (also called Siglec-2) is a B-cell-restricted phosphoprotein that mediates interactions with other cells via binding with  $\alpha$ 2-6-linked sialic acids on glycoconjugates, and the fact that the binding can be inhibited by 9-O-acetylation of sialic acids suggests that CD22B adhesion events are regulated by ganglioside acetylation (14,15). In childhood acute lymphoblastic leukemia, on the other hand, administration of exogenous GD3 induces apoptosis, whereas O-acetylated GD3 fails to induce similar effects, suggesting that O-acetylation of GD3 promotes leukemia cell survival by preventing apoptosis (16,17). Although the significance of acetylated GD2 in NB cells still remains largely unknown, further investigation should shed light on the functional role of gangliosides in the biological behavior of NB cells.

The NB cell lines were classified into three types based on their ganglioside expression profiles determined by LC-MS analysis, namely, type A, with a high level of expression of GD1a but low level or no expression of GD2/acetylated GD2, and consisting of SK-N-SH, SK-N-R4, NB69, GOTO and NB9 cells, type B, with a high level of expression of GD2/acetylated GD2 but low level or no expression of GD1a, and consisting of IMR32, NB1, NB16 and CHP126 cells, and type AB, which express both GD1a and GD2/acetylated GD2, and consisting of CHP134 and KP-N-NS cells. The results of the RT-PCR analyses indicated that the ganglioside expression profiles of NBs correlated with their ganglioside

synthase expression pattern. As shown in Fig. 6, ST8sia1, which catalyzes the synthesis of GD3 from GM3, was expressed only in the types B and AB NB cell lines and not in any of the type A NB cell lines, whereas B4galnt1, which catalyzes the synthesis of both GM2 and GD2, was expressed in all the NB cell lines tested in this study.

Expression of GD2 ganglioside is characteristic of cells of neuroectodermal origin, and a high level of expression has been reported in NB cells, whereas the GD2 distribution in humans is limited to neurons and peripheral nerve fibers (18). Thus, GD2 appears to be useful as a target for the treatment of NB. However, our findings in this study indicated that the level of GD2 expression in NB cells is variable and that NB cells can be classified based on their pattern of expression of ganglio-series gangliosides, including GD2. Since increased shedding of GD2 ganglioside and *MYCN* amplification jointly characterize the aggressive type of NB cells (19), classification of NBs based on their ganglioside expression profile may have prognostic value. Our observation that the ganglioside expression profiles are closely related to the expression of neural-differentiation-related genes appears to further support this notion.

In conclusion, we have demonstrated the usefulness of the LC-MS analysis system as a tool for glycosphingolipid research. Eighteen species of glycosphingolipids containing gangliosides of a and b pathways and their acetylated forms were detected. The expression ratios of the glycosphingolipids were determined, and were compared among 11 of NB cell lines. Based on the results, it was indicated that these NB cell lines could be classified into three categories. Although more detailed experiments are clearly needed, further investigations using the new method should provide a new approach to determining the biological significance of glycosphingolipids in NBs and identifying novel biomarkers for predicting the outcome of NB.

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr P. Reynolds for providing the SK-N-SH and SK-N-RA cells. We thank Ms. H. Kiyokawa for her assistance to prepare the manuscript. This work was supported by a grant from the Japan Health Sciences Foundation for Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices (KHA1004), Health and Labour Sciences Research Grants (Research on Human Genome Tailor made and Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices H18-005, the 3rd-term Comprehensive 10-year strategy for Cancer Control H19-010), a Grant for Child Health and Development from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and by CREST, JST. This work was supported in part by the Grant-in-Aid for Cancer Research (16-16) from the Ministry of Health, Labor and Welfare.

#### References

- Leden RW and Yu RK: Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol* 83: 139-191, 1982
- Van Echten G and Sandhoff K: Ganglioside metabolism. Enzymology, topology, and regulation. *J Biol Chem* 268: 5341-5344, 1993.
- Hakomori S: Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and spingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* 56: 5309-5318, 1996.
- Weinstein JL, Katzenstein HM and Cohn SL: Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist* 8: 278-292, 2003.
- Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S and Nakagawara A: A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett* 228: 5-11, 2005.
- Schengrund CL, Repman MA and Shochat SJ: Ganglioside composition of human neuroblastomas. Correlation with prognosis. *A Pediatric Oncology Group Study. Cancer* 56: 2640-2646, 1985.
- Schengrund CL and Shochat SJ: Gangliosides in neuroblastomas. *Neurochem Pathol* 8: 189-202, 1988.
- Kaucic K, Etue N, LaFleur B, Woods W and Ladisch S: Neuroblastomas of infancy exhibit a characteristic ganglioside pattern. *Cancer* 91: 785-793, 2001.
- Hettner M, Malott C, Woods W, Ladisch S and Kaucic K: Biological stratification of human neuroblastoma by complex B pathway ganglioside expression. *Cancer Res* 63: 7270-7276, 2003.
- Wu ZL, Schwartz E, Seeger R and Ladisch S: Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res* 46: 440-443, 1986.
- Nakamura K, Suzuki M, Taya C, Inagaki F, Yamakawa T and Suzuki A: A sialidase-susceptible ganglioside, IV3 alpha (NeuGc alpha 2-8NeuGc)-Gg4Cer, is a major disialoganglioside in WHT/Ht mouse thymoma and thymocytes. *J Biochem* 110: 832-841, 1991.
- Kushi Y, Ogura K, Rokukawa C and Handa S: Blood group A-active glycosphingolipids analysis by the combination of TLC-immunostaining assay and TLC/SIMS mass spectrometry. *J Biochem* 107: 685-688, 1990.
- Ye JN and Cheung NK: A novel O-acetylated ganglioside detected by anti-GD2 monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 50: 197-201, 1992.
- Sjoberg ER, Powell LD, Klein A and Varki A: Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta can be masked by 9-O-acetylation of sialic acids. *J Cell Biol* 126: 549-562, 1994.
- Kelm S, Schauer R, Manuguerra JC, Gross HJ and Crocker PR: Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22. *Glycoconj J* 11: 576-585, 1994.
- Malisan F, Franchi L, Tomassini B, *et al*: Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. *J Exp Med* 196: 1535-1541, 2002.
- Mukherjee K, Chava AK, Mandal C, Dey SN, Kniep B, Chandra S and Mandal C: O-acetylation of GD3 prevents its apoptotic effect and promotes survival of lymphoblasts in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Cell Biochem* 105: 724-734, 2008.
- Varki A: Glycosylation changes in cancer. In: *Essentials of Glycobiology*. Varki A and Cummings R (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999.
- Valentino L, Moss T, Olson E, Wang HJ, Elashoff R and Ladisch S: Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. *Blood* 75: 1564-1567, 1990.
- Seiguchi M, Oota T, Sakakibara K, Inui N and Fujii G: Establishment and characterization of a human neuroblastoma cell line in tissue culture. *Jpn J Exp Med* 49: 67-83, 1979.
- Miyake S, Shimo T, Kitamura Y, Nojyo T, Nakamura S, Imashuku S and Abe T: Characteristics of continuous and functional cell line NB-1, derived from a human neuroblastoma. *Autonomic Nervous System* 10: 115-120, 1973.
- Gilbert F, Balaban G, Moorhead P, Bianchi D and Schlesinger H: Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 7: 33-42, 1982.
- Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ and Greene AE: Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res* 30: 2110-2118, 1970.
- Schlesinger HR, Gerson JM, Moorhead PS, Maguire H and Hummeler K: Establishment and characterization of human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 36: 3094-3100, 1976.
- Yoshihara T, Kushima S, Hibi S, Misawa S and Imashuku S: Establishment and characterization of a human neuroblastoma cell line derived from a brain metastatic lesion. *Hum Cell* 6: 210-217, 1993.
- Biedler JL, Helson L and Spengler BA: Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33: 2643-2652, 1973.

## シンポジウム 骨・軟部腫瘍の病理診断の問題点

### Ewing 肉腫の病理診断上の問題点\*

石田 剛<sup>†</sup> 大喜多 肇<sup>‡</sup> 長谷川 匡<sup>§</sup> 秦 順<sup>-†, ¶</sup>

#### I. はじめに

1921年にEwingにより骨に発生する小円形細胞腫瘍として“diffuse endothelioma of bone”の名称で報告されたことに始まるEwing肉腫(Ewing sarcoma)は、小児や若年者の骨、ときに軟部組織に好発する小円形細胞肉腫である<sup>1)2)</sup>。その後、Ewing肉腫に類似した特徴を有する原始神経外胚葉性腫瘍(primitive neuroectodermal tumor; PNET)、神経上皮腫(neuroepithelioma)、あるいはAskin腫瘍の存在が報告された<sup>3)</sup>。従来からこれらの腫瘍とEwing肉腫との異同が議論されてきたが、両者にt(11; 22)(q24; q12)などの共通の染色体転座、それに由来する*EWS-FLI1*などの共通の融合遺伝子の発現を有することが明らかとなり、同一の腫瘍と考えられるようになった。最近では、Ewing肉腫ファミリー腫瘍(Ewing sarcoma family of tumors: ESFT)という名称でこれらの腫瘍を包括し、単一の疾患として扱われるようになった<sup>4)7)</sup>。

ここでは、日本ユウイング肉腫研究グループ(JESS)の中央病理診断に供された症例の解析からESFTの病理診断上の問題点を明らかにし、さらに

ESFTを中心とした病理診断のアルゴリズムを示して、小円形細胞腫瘍における日常病理診断の一助としたい。

#### II. 対象と方法

JESSによる限局性ESFTに対する集学的治療法の第II相臨床試験(JESS04と略記)に登録された53例(登録は2004年12月から2008年5月)のうち、中央病理診断のために検体が送付された50例を対象とした。なお、本稿の著者4人はJESSの中央病理診断委員ならびに前中央病理診断委員(J.H.)である。

検体は、パラフィン切片を用いてヘマトキシリンエオジン(HE)染色とCD99(MIC2)の免疫染色を行い、これに加えて適宜、Periodic acid Schiff反応、desmin, muscle specific actin (HHF35), myogenin,  $\alpha$ -smooth muscle actin, cytokeratin (AE1/AE3), S-100 protein, CD45 (leukocyte common antigen), TdT, neuron specific enolase (NSE), neurofilament protein (NFP), vimentin, epithelial membrane antigen (EMA)の免疫染色を行った。凍結検体が送付された場合には、RT-PCR法により、*EWS-FLI1*および*EWS-ERG*の融合遺伝子の発現を検討した。

組織学的、免疫組織化学的所見から腫瘍の病理組織学的診断を行った。融合遺伝子の発現を検討した症例についてはその結果も合わせて総合的に判断した。診断に関しては、病理診断の確からしさの段階から腫瘍を、カテゴリ-1: ESFT 確診例、カテゴリ-2: ESFT 疑い例、カテゴリ-3: Small round cell tumor, not otherwise specified (SRCT, NOS)、カテゴリ-4: ESFT 否定例、の4つのカテゴリに分け、各カテゴリに分類される要件について検討した。SRCT, NOSはESFTを否定することはできないが積極的に肯定することもできない小円形細胞腫瘍を意味している。この結果をもとにESFTの診断のため

**Key words:** Ewing sarcoma family of tumors, Primitive neuroectodermal tumor, Pathology, Diagnostic criteria

\*Pathological Diagnosis of Ewing sarcoma

<sup>†</sup>国立国際医療研究センター—国府台病院中央検査部。Tsuyoshi Ishida: Department of Pathology and Laboratory Medicine, Kohnodai Hospital, National Center for Global Health and Medicine

<sup>‡</sup>国立成育医療研究センター—研究所発生・分化研究部。Hajime Okita, Jun-ichi Hata: Department of Developmental Biology and Pathology, National Center of Child Health and Development

<sup>§</sup>札幌医科大学医学部病理診断学。Tadashi Hasegawa: Department of Surgical Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine

<sup>¶</sup>常盤大学人間科学部。Jun-ichi Hata: College of Human Science, Tokiwa University

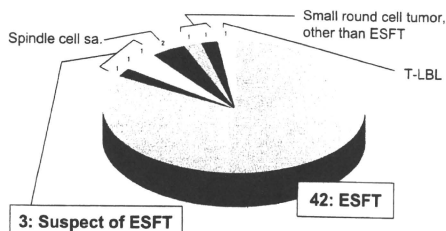


図1 対象50例の中央病理診断内訳

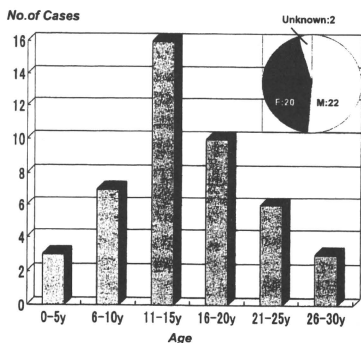


図2 ESFT例およびESFT疑い例の年齢分布と性別

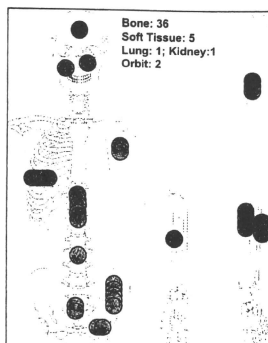


図3 ESFT例およびESFT疑い例の発生部位

のアルゴリズムを検討した。

### III. 結 果

検討した50例のうち、カテゴリー1 (ESFT 確診例) は42例、カテゴリー2 (ESFT 疑い例) は3例、カテゴリー3 (SRCT, NOS) は2例、カテゴリー4 (ESFT 否定例) は3例であった (図1)。カテゴリー1 および2の45例は、男性23例、女性20例、不明2例であった。登録の対象が30歳未満であるため、年齢は30歳未満に限られるが10歳前半半の症例がもっとも多かった (図2)。発生部位は、腸骨と胸椎が5例ともっとも多く、次いで胫骨および胸壁 (肋骨発生を含む) が4例であった (図3)。骨発生例は36例、軟部組織発生例は5例、その他臓器などの発生例は4例であ

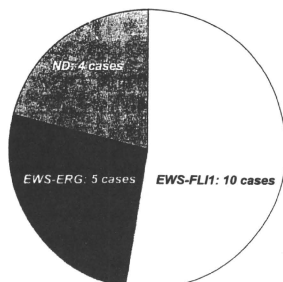


図4 融合遺伝子解析結果

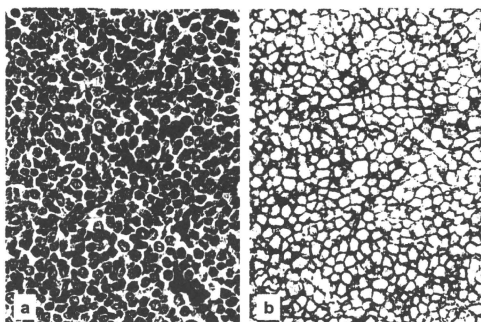


図5 (a)典型的ESFTの組織像(HE染色)。(b)CD99免疫染色像。びまん性に細胞膜に強く陽性である。

表1 Ewing肉腫ファミリー腫瘍の組織学的所見

典型的所見	Diffuse monotonous proliferation Uniform small round tumor cells Uniform round nuclei containing fine chromatin Inconspicuous nucleoli Fibrillary cytoplasm Indistinct cytoplasmic membrane No ground substance Cytoplasmic glycogen [PAS stain(+)]
時に見られる所見	Homer Wright rosettes Large tumor cell
稀に見られる所見	Spindle cell Clear cytoplasm with distinct cell membrane

った。

融合遺伝子が検索できた症例は19例で、*EWS-FLI1*の発現を認めた症例が10例、*EWS-ERG*の融合遺伝子の発現を認めた症例は5例であった(図4)。4例はこれらの融合遺伝子の発現を認めなかった。なお、この4例の内訳はSRCT、NOSが2例、ESFT否定例が2例で、組織学的に積極的にESFTを疑った症例ではなかった。

ESFTの典型的な組織像は、比較的均一な小円形細胞から成る腫瘍細胞の単調なびまん性増殖であり、その核クロマチンは繊細で、核小体は目立たない。細胞境界は不明瞭で、fibrillaryな細胞質を持ち、背景に基質は乏しい。また、細胞質にグリコーゲンを認め、

Homer Wright型ロゼットを認めることもある(図5-a, 表1)。通常のESFTよりも大型の細胞から成るいわゆる large cell Ewing sarcoma と呼ばれる例もある。稀に紡錘形細胞が出現したり、細胞境界明瞭な淡明な細胞からなる病変も見られるとされている。細胞質内のグリコーゲンは検索した16例中8例(50%)、Homer Wright型ロゼットは45例中3例(7%)、large cell Ewing sarcoma は45例中2例(4%)、紡錘形細胞の出現は45例中1例(2%)に認められた。細胞境界明瞭な淡明細胞の出現した症例は検索した45例中にはなかった。

免疫組織化学的結果のまとめを表2に示す。ESFTの診断に有用なマーカーとされているCD99は45例

表 2 免疫組織化学的結果のまとめ

Positive markers	Negative markers	Other markers
CD99: 44/45 (98%)	Desmin: 0/30 (0%)	CK-AE1/3: 3/22 (14%)
NSE: 11/18 (61%)	HHF-35: 0/17 (0%)	S-100 protein: 3/31 (10%)
NFP: 3/13 (23%)	Myogenin: 0/5 (0%)	
Vimentin: 4/6 (67%)	CD45: 0/15 (0%)	
	TdT: 0/20 (0%)	
	$\alpha$ -SMA: 0/2 (0%)	
	EMA: 0/2 (0%)	

中 44 例(98%)に、びまん性に細胞膜に陽性であった(図 5-b)。NSE は検索した 18 例中 11 例(61%), neurofilament は 13 例中 3 例(23%), vimentin は 6 例中 4 例(67%)に陽性であった。これらの免疫組織化学的マーカーは、ESFT で比較的高頻度に発現する、あるいは ESFT の neuroectodermal differentiation を示すもので、ESFT にとっても positive marker と捉えることができるが、NSE や vimentin は ESFT に全く特異的ではない。Cytokeratin や S-100 protein は ESFT でときに発現を認めることがあるマーカーであるが、cytokeratin (AE1/AE3) は検索した 22 例中 3 例(14%)に、S-100 protein は 31 例中 3 例(3%)に認められた。ESFT では通常陽性とならず、陽性であった場合は逆に ESFT ではなく他の小円形細胞腫瘍を示唆するものは、ESFT にとっての negative marker と考えられるが、表 2 に示すようにこれらはすべて陰性であった。これら negative marker に相当するものとして、desmin, muscle specific actin, myogenin,  $\alpha$ -smooth muscle actin, CD45, TdT, EMA などが挙げられる。

#### IV. 考 察

検討した 50 例のうち、カテゴリ 3 の症例は 2 例、カテゴリ 4 の症例は 3 例と少ないのは、CD99 陽性という ESFT の免疫組織化学的特徴と *EWS-FLI1* をはじめとする特異的な融合遺伝子の存在が明らかとなり、PNET などの類縁疾患を含めて ESFT の疾患概念が整理され、小児の他の小円形細胞腫瘍との鑑別点がかかり明かにされたことによると思われる。カテゴリ 3, 4 を含めて中央病理診断に標本が送付された 50 例のうち 48 例(96%)は CD99 陽性であった。また、HE 像がいわゆる小円形細胞腫瘍の範疇に入るものは 50 例のうち 48 例(96%)であった。したがって、

小円形細胞という腫瘍細胞の形態と CD99 陽性所見とで、大部分の ESFT の病理診断がなされていると推測される。

カテゴリ 4 に分類した 3 例のうち、2 例は紡錘形細胞肉腫に分類したものであったが、1 例は CD99 陽性、1 例は CD99 陰性であった。融合遺伝子は *EWS-FLI1*, *EWS-ERG* ともに発現を認めなかった。滑膜肉腫の可能性を考慮して *SYT-SSX* 融合遺伝子も検索したが、この 2 例は陰性であり、最終的な確定診断には至っていない。残りの 1 例は前縦隔発生例で、CD99 陽性であるが、TdT 陽性、CD3 陽性であり T 細胞性のリンパ芽球性白血病/リンパ腫であった。CD99 陽性の小円形細胞腫瘍であっても ESFT ではない症例があり、実際の診断に際しては注意する必要がある。

カテゴリ 3 に分類した 2 例のうち 1 例は、脱灰のためと思われる HE 標本の形態像の保存が悪く CD99 も陰性であり、また融合遺伝子検索でも *EWS-FLI1* と *EWS-ERG* ともに発現を認めないものであった。もう 1 例は、CD99 陽性の小円形細胞腫瘍であったが、HE 形態像が ESFT の典型的所見と異なり、*EWS-FLI1*, *EWS-ERG* ともに陰性であったため、SRCT, NOS と診断した。後に検体送付もとの施設で行われた融合遺伝子検索で *TLS-CHOP* 融合遺伝子が検出され、最終的には送付もとの施設で小児(16 歳、男性例)では稀な円形細胞型脂肪肉腫と診断された。

カテゴリ 2 とした 3 例のうち 1 例は、HE 形態像は ESFT に合致するものの壊死が強く認められ、CD99 が陰性であった。また、融合遺伝子は検索できていないため、ESFT との確定診断にいたらず ESFT の疑いとされたものであった。別の 1 例は CD99 陽性、遺伝子検索未施行で、HE 標本の減色が強いため診断を ESFT 疑いにとどめた例であった。残りの 1 例は、小円形細胞に加えて一部に紡錘形細胞の増生があり、

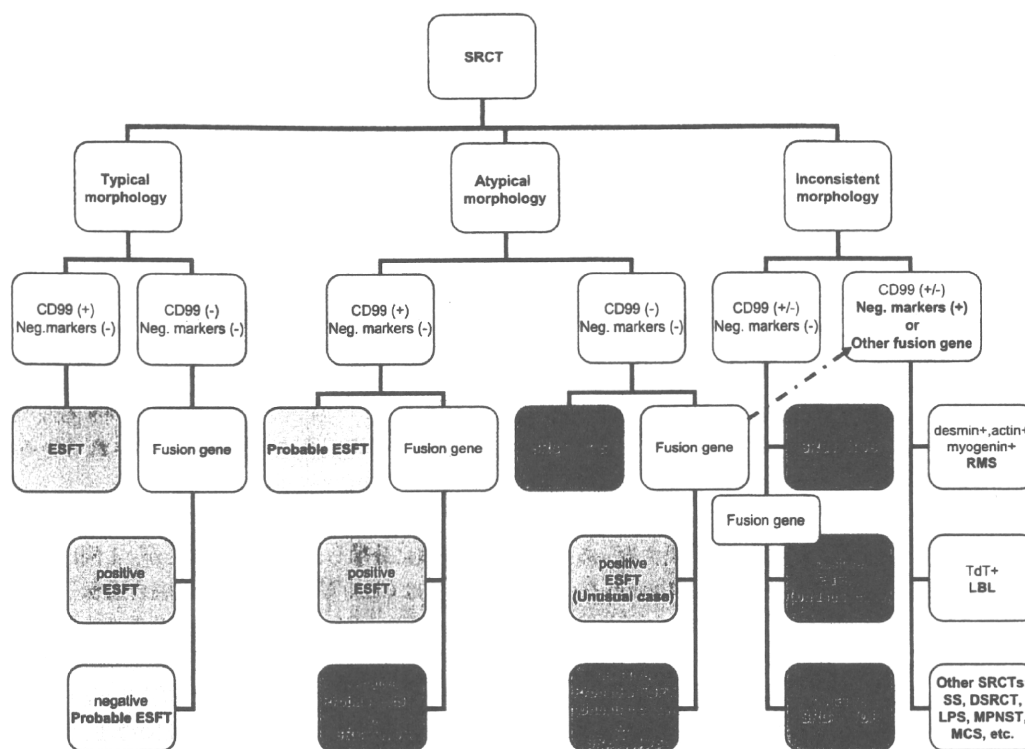


図6 ESFT 病理診断のアルゴリズム。SRCT: small round cell tumor, ESFT: Ewing sarcoma family of tumors, NOS: not otherwise specified, RMS: Rhabdomyosarcoma, LBL: Lymphoblastic leukemia/lymphoma, SS: Synovial sarcoma, DSRCT: Desmoplastic small round cell tumor, LPS: Liposarcoma, MPNST: Malignant peripheral nerve sheath tumor, MCS: mesenchymal chondrosarcoma

HE 形態像が ESFT に合致しないわけではないが非典型的であり、CD99 は陽性であるが、融合遺伝子の検索が未施行であり、やはり ESFT と確定診断することのできなかつたものである。

以上の検討から、HE 形態像が ESFT に合致するものであれば、Homer Wright 型ロゼットがあっても、large cell Ewing sarcoma の範疇に入るやや大型の細胞からなるものであっても、CD99 が陽性であり、かつ、ESFT では陰性となるべき筋系マーカーや TdT や CD45 などの造血器腫瘍・リンパ腫系マーカーなどの negative marker の陰性が確認できれば、融合遺伝子検索を行わなくても、ESFT と確定診断をしている。現状では遺伝子診断のできる施設が限られていることや、たとえ遺伝子診断ができる施設であっても必ずしも全例で行われているわけではないので、日常病理診断の多くの症例はこのようなレベルでの診断となっているものと考えられる。逆に CD99 が陰性の場合には、HE 形態像が合致していても ESFT と確定診断

することがためらわれ、遺伝子検索によって特異的な融合遺伝子の発現を確認することが確定診断のためには必要と考えられる。遺伝子診断未施行の CD99 陰性例では、たとえ HE 像が合致していても現段階では ESFT 疑いとせざるを得ない。カテゴリー 2 やカテゴリー 3 の範疇の腫瘍では、融合遺伝子を検索することにより診断が確定されることが期待される。したがって、このカテゴリーに属する腫瘍では融合遺伝子の検索を積極的に行うことが推奨される。融合遺伝子の検索はパラフィン切片からも可能ではあるが<sup>9)</sup>、可能な限り新鮮凍結検体を用いて行うことが望まれるので、遺伝子検用の検体の保存に留意することが大切である。このような症例についての検討を蓄積することにより形態像と遺伝子変異との関係が明確になり、今後さらに診断精度が向上するものと期待される。カテゴリー 4 では、CD99 陽性の所見のみから誤って ESFT と診断されたものが多いと思われる。したがって、HE の形態像をよく把握することと CD99 に加えて他



の小円形細胞腫瘍を除外するための negative marker をパネルで染色することが重要であり、これが正確な診断につながるものと考えられる。逆に言えば、CD99 陽性所見のみから ESFT の診断に飛びつかないようにしなければならない。これらの結果をふまえた ESFT 診断のためのアルゴリズムを図 6 に示す。

本研究は JESS04 研究の一部であり、JESS04 研究に参加されている施設の関係の諸先生と以下に示す JESS 運営委員の各先生方に深謝致します(敬称略)。

日本大学医学部小児科：麦島秀雄，陳基明  
 九州がんセンター整形外科：横山良平  
 国立がんセンター中央病院小児科：牧本 敦  
 国立がんセンター中央病院整形外科：川井 章  
 国立がんセンター中央病院放射線治療部：角美奈子  
 新潟県立がんセンター小児科：浅見恵子  
 千葉県がんセンター整形外科：石井 猛  
 岡山大学大学院生体機能再生・再建学：尾崎敬文

#### 文 献

- 1) Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. Proc NY Pathol Soc 1921; 21: 17-42.
- 2) 大喜多肇，秦順一. Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の臨床病理. 病理と臨床 2009; 27: 151-5.
- 3) Askin FB, Rosai J, Sibley RK, et al. Malignant small round cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. Cancer 1979; 43: 2438-51.
- 4) Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, et al. Chromosomal translocation in Ewing's sarcoma. N Engl J Med 1983; 309: 496-7.
- 5) Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T, et al. Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma. N Engl J Med 1984; 311: 584-5.
- 6) Delattre O, Zucman J, Melot T, et al. The Ewing family of tumors: a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. N Engl J Med. 1994; 331: 294-9.
- 7) Folpe AL, Goldblum JR, Rubin BP, et al. Morphologic and immunophenotypic diversity of in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. Am J Surg Pathol 2005; 29: 1025-33.
- 8) Hisaoka M, Tsuji S, Morimitsu Y, et al. Molecular detection of EWS-FLI1 chimeric transcripts in Ewing family tumors by nested reverse transcription-polymerase chain reaction: application to archival paraffin-embedded tumor tissues. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 1999; 107: 577-84.

主題関連  
遺伝子診療と倫理

福嶋 義光

胃 と 腸

第 45 卷 第 13 号 別刷  
2010 年 12 月 25 日 発行

*Stomach and Intestine (Tokyo) Vol. 45 No. 13 2010. IGAKU-SHOIN, Tokyo, Japan*

医学書院

<p>主題 関連</p>
------------------

## 遺伝子診療と倫理

福嶋 義光<sup>1) 2)</sup>

**要旨** ゲノム情報・遺伝情報は、① 生涯変化しない情報(不変性)、② 将来を予測しうる情報(予測性)、③ 血縁者も関与しうる情報(共有性)であるため、医療の世界に新たな倫理的問題が提起されており、診療の場において、遺伝情報を取り扱う場合には、遺伝カウンセリングの実施が求められる。遺伝性消化器疾患の場合、患者の確定診断は、他の血縁者の発症前診断、早期発見のためのスクリーニング検査の開始に結びつけられるものであり、積極的にその情報を血縁者に伝えるべきである。そのためには適切な遺伝カウンセリングを提供することが必要であり、遺伝子医療部門あるいは臨床遺伝専門医との連携が望まれる。

**Key words:** 遺伝カウンセリング 臨床遺伝専門医 認定遺伝カウンセラー  
全国遺伝子医療部門連絡会議 発症前診断

### はじめに

“遺伝子診療”は、遺伝子解析技術により得られた情報を診療に活かす取り組みである。消化器疾患においても、原因遺伝子が明らかにされた遺伝性消化管疾患が増加しており、これらの疾患においては、患者および血縁者の遺伝子を解析することにより、より適切な治療、予防に結びつけることができると期待される。

一方、ゲノム情報・遺伝情報は、① 生涯変化しない情報(不変性)、② 将来を予測しうる情報(予測性)、③ 血縁者も関与しうる情報(共有性)であるため、医療の世界に新たな倫理的問題が提起されており、診療の場において、遺伝情報を取り扱う場合には、遺伝カウンセリングの実施を考慮する必要があるとされている。

本稿では、遺伝子診療に関係するガイドラインを紹介し、遺伝子診療には必須の遺伝カウンセリングについてわが国の現状と展望について述べる。

### 各種ガイドラインの制定

わが国においては、個人情報保護法が2005年4月に全面施行されたことに伴い、厚生労働省では「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」を告示した。個人情報の中でも遺伝情報は特殊であることから、ガイドラインの10番目の項目に“遺伝情報を診療に活用する場合の取扱い”を設け、“医療機関等が、遺伝学的検査を行う場合には、臨床遺伝学の専門的知識をもつ者により、遺伝カウンセリングを実施する”必要があると記載されている(Table 1)。

### 遺伝子診療に必須の遺伝カウンセリング

遺伝カウンセリングとは、遺伝性疾患の患者・家族またはその可能性のある人(クライアント)に対して、生活設計上の選択を自らの意思で決定し、行動できるよう臨床遺伝学的診断を行い、遺伝医学的判断に基づき遺伝子後(再発危険率)などの適切な情報を提供し、支援する医療行為である。遺伝カウンセリングにおいては、クライアントと遺伝カウンセリング担当者との良好な信頼関

1) 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座  
(〒390-8621 松本市旭3丁目1-1)  
2) 同 附属病院遺伝子診療部

Table 1 遺伝情報を診療に活用する場合の取扱い

遺伝学的検査等により得られた遺伝情報については、本人の遺伝子・染色体の変化に基づく体質、疾病の発症等に関する情報が含まれるほか、その血縁者に関わる情報でもあり、その情報は生涯変化しないものであることから、これが漏えいした場合には、本人及び血縁者が被る被害及び苦痛は大きなものとなるおそれがある。したがって、遺伝学的検査等により得られた遺伝情報の取扱いについては、UNESCO 国際宣言及び関係団体等が定めるガイドラインを参考とし、特に留意する必要がある。

また、検査の実施に同意している場合においても、その検査結果が示す意味を正確に理解することが困難であったり、疾病の将来予測性に対してどのように対処すればよいかなど、本人及び家族等が大きな不安を持つ場合が多い。したがって、医療機関等が、遺伝学的検査を行う場合には、臨床遺伝学の専門的知識を持つ者により、遺伝カウンセリングを実施するなど、本人及び家族等の心理社会的支援を行う必要がある。

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/seisaku/kojin/dl/170805-11a.pdf> (2010年8月9日現在)。(医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン。平成22年9月17日改正 厚生労働省より一部改定して転載)。

係に基づき、様々なコミュニケーションが行われ、この過程で心理的・精神的援助がなされる(遺伝学的検査に関するガイドライン, <http://jshg.jp/resources/date/10academies.pdf>)。

適切な遺伝カウンセリングを実施することにより、多くの遺伝子診療に関係する倫理的問題が解消される。通常の診療行為の中で、鑑別診断、除外診断、あるいは確定診断を目的として、遺伝学的検査が行われる機会が増加してきている。このような場合、当然のことながら、検査前のインフォームドコンセントにおいて、遺伝学的検査の目的・意義や検査結果が及ぼす本人および家族・血縁者への影響についての説明なども行われるべきである。診療の一環として行われる遺伝学的検査であっても、遺伝学的に診断することは家系全体を診断するという意味を含んでいるので、遺伝学的検査を実施する医師は十分に遺伝カウンセリングの要点を理解し、必要に応じて、後述する臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラーらと連携をとり、適切な遺伝カウンセリングを提供することが望まれる。

## 遺伝子診療体制の整備

従来、わが国においては遺伝学的検査や遺伝カウンセリングを行う遺伝子診療のシステム作りが遅れていることが指摘されていたが、2000年4月に文部科学省に正式に認められた信州大学をはじめとして、これらの指針・ガイドラインが制定されたのを契機に、ほとんどの大学病院などの特定機能病院に遺伝子診療部(department of clinical genetics)が設立されるなど、全国的に遺伝子診療の基盤整備が進められている。

全国遺伝子医療部門連絡会議(<http://www.idenshiiryoubumon.org/>)は、全国の大学病院などの高度医療機関において遺伝子医療(遺伝学的検査・遺伝カウンセリングなど)を実践している部門の代表が集う会議であり、2003年から毎年開催されている。2010年10月現在、86医療施設(大学病院:74施設、その他:12施設)が登録し、遺伝子医療の抱える様々な問題について検討を重ねている。

## 遺伝子診療を支える人材の育成

日本人類遺伝学会と日本遺伝カウンセリング学会では、遺伝カウンセリング担当者を養成するために、医師を対象としたものとして、臨床遺伝専門医制度(<http://jbm.org/>)、非医師を対象としたものとして、認定遺伝カウンセラー制度(<http://plaza.umin.ac.jp/~GC/>)を運営しており、わが国の遺伝子診療を支える人材育成に努めている。消化器を専門とする医師が、遺伝性消化器疾患の患者・家族に遭遇した場合には、臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラーなどと連携をとり、適切な遺伝カウンセリングを提供することが望まれる。

## 遺伝学的検査・遺伝カウンセリングが 必要な患者・家族への対応

わが国では、発端者の診断・治療に当たっている主治医が様々な遺伝に関する情報提供を患者・家族に行っていると考えられるが、遺伝子診療で最も重要な遺伝カウンセリングは、単なる情報提供だけではなく心理的・精神的・社会的サポート

を行うことである。遺伝カウンセリングを行おうとする医師は専門分野だけの知識ではなく、幅広い遺伝医学の知識を身に付け、遺伝情報の特殊性と倫理的問題を理解し、患者の心理的・精神的・社会的サポートが可能となるような診療体制を構築したうえで遺伝カウンセリングを行う必要がある。

特に、遺伝性消化器疾患の場合、既に発症している患者の確定診断がなされると、その情報は同一家系内の血縁者の健康管理に役立てられることが多い。すなわち、まだ発症していない健康な人を対象に発症前診断を行い、もし陽性という結果が得られた場合には、早期診断のための定期的スクリーニングが開始される。患者の血縁者には積極的にその家系の遺伝情報を伝えるべきであるが、患者の主治医が血縁者にアプローチすることは容易なことではない。遺伝子医療部門、あるいは臨床遺伝専門医との連携が望まれるゆえである。

## Summary

### Clinical Genetics and Ethical Issues

Yoshimitsu Fukushima <sup>1)2)</sup>

We have to resolve several new ethical issues when we use genomic and genetic information about a patient, because ① it is unchangeable throughout the lifetime of the patient, ② possibly predictive, and ③ possibly shared with relatives. Genetic counselling should be provided when the genetic information is used in clinical practice.

If a patient receives definite diagnosis of hereditary GI (gastrointestinal) tract disease by genetic testing, the genetic information about the patient is useful for presymptomatic testing of relatives. Thus, the GI tract specialist should refer the relatives of such patients to the department of clinical genetics or clinical geneticists.

1) Department of Medical Genetics, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan

2) Division of Clinical and Molecular Genetics, Shinshu University Hospital, Matsumoto, Japan

## 「今月の症例」症例募集

「今月の症例」は毎月本誌の冒頭を飾っていますが、X線、内視鏡写真など形態学的所見が読めるようにきちんと撮影されている症例の掲載を目的としています。珍しい症例はもちろん、ありふれた疾患でも結構ですから、見ただけで日常診療の糧となるような症例をご投稿ください。

**投稿規定** 原則として1症例につき3頁以内におさめるように、症例のあらましとX線、内視鏡、超音波、CT、病理などの画像とその読影ポイントをまとめてください(写真10枚程度、文章1,000字程度)。

典型例では文献は必要ありませんが、比較的珍しい症例では2~3編の文献をつけてください。

要旨、英文抄録は不要です。

**送付先** ☎ 113-8719

東京都文京区本郷1丁目28-23

医学書院 「胃と腸」編集室

「今月の症例」係

**採否と論文掲載** 編集委員会にて採否を決定し、採用順に掲載します。

「胃と腸」編集委員会

日本臨牀 68巻 増刊号8 (2010年8月20日発行) 別刷

# 遺伝子診療学(第2版)

—遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望—

序 文

—遺伝子診療学とは—

福嶋義光

## 序 文

### —遺伝子診療学とは—

福嶋義光

‘遺伝子診療’を遺伝子解析技術により得られた情報を診療に活かす取り組みであると考え、と‘遺伝子診療学’は、遺伝子診療の基盤を構築し、これを開発・発展させる学問であると定義することができる。本誌の‘各論’を見ていただければ明らかなように、今や遺伝子診療はほとんどすべての医学・医療の領域に関係しており、今後更に広く深く浸透していくことは間違いない。各分野における遺伝子診療を真により良い医療の提供のためのものとするには、遺伝子診療を単なる技術とその分野への応用にとらえるのではなく、以下に述べる各分野の遺伝子診療に共通する‘総論’の部分をしっかり理解しておく必要がある。

#### 1. 遺伝医学の系統的理解

従来、遺伝学的知識が医療の場で利用されるのは、染色体異常症や先天代謝異常などの小児科領域、あるいは極めてまれで重篤な遺伝疾患に限られる傾向があった。しかし、ヒトゲノム解析研究の爆発的進展により、数多くの疾患の発症に関連する遺伝子が単離され、種々の遺伝学的検査が可能になってきたことから、遺伝医学はすべての医学・医療領域の‘共通言語’として理解しておく必要が生じている。

遺伝学的検査により明らかにされる遺伝情報(genetic data)は、

- (1) 生涯変化しない情報(不変性)、
- (2) 将来を予測しうる情報(予測性)、
- (3) 血縁者も関与しうる情報(共有性)、

であるため、その扱いは通常の臨床情報とは異なり、特別な配慮が求められる。我が国では特に遺伝情報を臨床の場でどのように扱うかについての教育、

---

Yoshimitsu Fukushima: Department of Medical Genetics, Shinshu University School of Medicine  
信州大学医学部 遺伝医学・予防医学講座

すなわち臨床遺伝学教育が不十分であるため、本誌では、‘総論’の最初に、‘遺伝子診療を理解するための遺伝医学の基礎’の項を設け、それぞれの分野の専門家に執筆していただくことにした。

## 2. 遺伝子解析の分類と定義

DNAやRNAを解析する検査は、我が国では一般に‘遺伝子検査’と呼ばれているが、この‘遺伝子検査’には、様々なものが含まれているため、遺伝子解析技術を用いた検査については、明確な分類と定義がなされる必要がある。

日本臨床検査標準協議会では、これまで用いられてきた‘遺伝子検査’の用語を(1)病原体遺伝子検査、(2)体細胞遺伝子検査、(3)遺伝学的検査の3つに分類し、(1)-(3)を‘遺伝子関連検査’として総称することを提唱している。

### (1) 病原体遺伝子検査(病原体核酸検査)

ヒトに感染症を引き起こす外来性の病原体(ウイルス、細菌など微生物)の核酸(DNAあるいはRNA)を検出・解析する検査。

### (2) 体細胞遺伝子検査

癌細胞特有の遺伝子の構造異常などを検出する遺伝子検査および遺伝子発現解析など、疾患病変部・組織に局限し、病状とともに変化しうる一時的な遺伝子情報を明らかにする検査。

### (3) 遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)

単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物などの効果・副作用・代謝、個人識別にかかわる遺伝学的検査など、ゲノムおよびミトコンドリア内の原則的に生涯変化しない、その個体が生来的に保有する遺伝学的情報(生殖細胞系列の遺伝子解析より明らかにされる情報)を明らかにする検査。

遺伝子診療の基盤を確立するためには、遺伝子解析技術をどのようなサンプルを用いて、何を目的として行うかを明確にしたうえで、議論を進める必要がある。遺伝子解析の分類と定義についての共通認識は極めて重要である。

## 3. 研究から診療への課題

ゲノム科学研究の進展により、種々の遺伝子解析技術が開発され、これらの技術を医学研究に応用することにより、新しい診断法、治療法、予防法が生まれており、あらゆる医学・医療の領域において、遺伝子関連技術の臨床応用が、



研究の時代から診療の時代に移り変わりつつある。

一方、新しい遺伝子解析技術を診療に応用する場合には、次に示すACCEの4点を考慮すべきであることがACCEモデルとして国際的に提唱されている。

A(analytical validity: 分析的妥当性): 検査法が確立し、再現性の高い結果が得られるなど精度管理が適切である。

C(clinical validity: 臨床的妥当性): 検査結果の意味付けが明確である。すなわち感度、特異度、陽性的中率などが明らかにされている。

C(clinical utility: 臨床的有用性): その検査結果により、今後の見通しについての情報が得られたり、適切な予防法や治療法に結びつけることができるなど臨床上のメリットがある。

E(ethical legal and social issues: 倫理的法的社会的問題): 遺伝情報が明らかにされたことにより、被検者が就職、結婚、保険加入など、その病気以外のことで差別を受けることがないかどうかなど倫理的法的社会的問題がないことを確認する。

このACCEモデルは、遺伝子関連技術を臨床応用する際には、検査の精度を確認し、検査の意義を明確にし、検査結果を適切に用いることが必要であることを表している。各臓器別の専門領域において、遺伝子関連技術の臨床応用は必須なものになることは間違いないが、上記ACCEモデルをそれぞれの専門領域ごとに設定することは困難である。

‘総論8. 研究から診療に向けた社会的基盤整備’の項に記載されているように、現在、日本臨床検査医学会、日本臨床検査標準協議会、日本衛生検査所協会などの臨床検査関連団体、および日本人類遺伝学会、日本遺伝カウンセリング学会、全国遺伝子医療部門連絡会議などの遺伝医学関連団体では、遺伝子診療の社会的基盤整備に関する取り組みを行っているので、その重要性について、多くの方々に理解していただきたいと考えている。

## Molecular and Clinical Analysis of *RAF1* in Noonan Syndrome and Related Disorders: Dephosphorylation of Serine 259 as the Essential Mechanism for Mutant Activation

Tomoko Kobayashi,<sup>1</sup> Yoko Aoki,<sup>1\*</sup> Tetsuya Niihori,<sup>1</sup> H el ene Cav e,<sup>2</sup> Alain Verloes,<sup>2</sup> Nobuhiko Okamoto,<sup>3</sup> Hiroshi Kawame,<sup>4,5</sup> Ikuma Fujiwara,<sup>6</sup> Fumio Takada,<sup>7</sup> Takako Ohata,<sup>7</sup> Satoru Sakazume,<sup>8</sup> Tatsuya Ando,<sup>9</sup> Noriko Nakagawa,<sup>10</sup> Pablo Lapunzina,<sup>11</sup> Antonio G. Meneses,<sup>11</sup> Gabriele Gillessen-Kaesbach,<sup>12</sup> Dagmar Wiczorek,<sup>13</sup> Kenji Kurosawa,<sup>14</sup> Seiji Mizuno,<sup>15</sup> Hirofumi Ohashi,<sup>16</sup> Albert David,<sup>17</sup> Nicole Philip,<sup>18</sup> Afag Guliyeva,<sup>1</sup> Yoko Narumi,<sup>1</sup> Shigeo Kure,<sup>18</sup> Shigeru Tsuchiya,<sup>6</sup> and Yoichi Matsubara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; <sup>2</sup>APHP, H opital Robert Debr e, D epartement de G en etique; Universit  Paris 7-Denis Diderot, Paris, France; <sup>3</sup>Department of Medical Genetics, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Izumi, Osaka, Japan; <sup>4</sup>Division of Medical Genetics, Nagano Children's Hospital, Nagano, Japan; <sup>5</sup>Department of Genetic Counseling, Ochanomizu University, Tokyo, Japan; <sup>6</sup>Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; <sup>7</sup>Department of Medical Genetics, Kitasato University Graduate School of Medical Sciences, Sagami, Japan; <sup>8</sup>Division of Medical Genetics, Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan; <sup>9</sup>Department of Pediatrics, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan; <sup>10</sup>Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan; <sup>11</sup>Servicio de Genetica Medica, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>12</sup>Institut f ur Humangenetik L ubeck, Universit tsklinikum Schleswig-Holstein, L ubeck, Germany; <sup>13</sup>Institut f ur Humangenetik, Universit tsklinikum Essen Universitaet Duisburg-Essen, Essen, Germany; <sup>14</sup>Division of Medical Genetics, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan; <sup>15</sup>Department of Pediatrics, Central Hospital, Aichi Human Service Center, Aichi, Japan; <sup>16</sup>Division of Medical Genetics, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan; <sup>17</sup>CHU Nantes, Nantes, France; <sup>18</sup>H opital de la Timone, Marseille, France

Communicated by Nancy B. Spinner

Received 20 July 2009; accepted revised manuscript 2 December 2009.

Published online 5 January 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/humu.21187

**ABSTRACT:** Noonan syndrome (NS) and related disorders are autosomal dominant disorders characterized by heart defects, facial dysmorphism, ectodermal abnormalities, and mental retardation. The dysregulation of the RAS/MAPK pathway appears to be a common molecular pathogenesis of these disorders: mutations in *PTPN11*, *KRAS*, and *SOS1* have been identified in patients with NS, those in *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, and *MAP2K2* in patients with CFC syndrome, and those in *HRAS* mutations in Costello syndrome patients. Recently, mutations in *RAF1* have been also identified in patients with NS and two patients with LEOPARD (multiple lentigenes, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth, and sensorineural deafness) syndrome. In the current study, we identified eight *RAF1* mutations in 18 of 119 patients with NS and related conditions without mutations in known genes. We summarized clinical manifestations in patients with *RAF1* mutations as well as those in NS patients with

*PTPN11*, *SOS1*, or *KRAS* mutations previously reported. Hypertrophic cardiomyopathy and short stature were found to be more frequently observed in patients with *RAF1* mutations. Mutations in *RAF1* were clustered in the conserved region 2 (CR2) domain, which carries an inhibitory phosphorylation site (serine at position 259; S259). Functional studies revealed that the *RAF1* mutants located in the CR2 domain resulted in the decreased phosphorylation of S259, and that mutant *RAF1* then dissociated from 14-3-3, leading to a partial ERK activation. Our results suggest that the dephosphorylation of S259 is the primary pathogenic mechanism in the activation of *RAF1* mutants located in the CR2 domain as well as of downstream ERK. Hum Mutat 31:284–294, 2010.   2010 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** RAS; MAPK; *RAF1*; Noonan syndrome; *PTPN11*; hypertrophic cardiomyopathy

### Introduction

Noonan syndrome (NS; MIM# 163950) is an autosomal dominant developmental disorder characterized by facial dysmorphism, including hypertelorism, low-set ears, ptosis, short stature, skeletal abnormalities, and heart defects [Allanson et al., 1985; Mendez and Opitz, 1985]. Frequently observed features in NS patients are pulmonary stenosis (PS), hypertrophic cardiomyopathy, chest deformities, a webbed/short neck, mental

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Present address of Yoko Narumi: Department of Medical Genetics, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan.

\*Correspondence to: Yoko Aoki, Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiry-machi, Sendai 980-8574, Japan.

E-mail: aokiy@mail.tains.tohoku.ac.jp

retardation, genitourinary defects including cryptorchidism in males, and bleeding diathesis due to factor XI deficiency. The incidence of this syndrome is estimated to be 1 in 1,000–2,500 live births. LEOPARD (multiple lentigenes, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth, and sensorineural deafness) syndrome (MIM# 151100) is known to be a NS-related disorder [Digilio et al., 2002]. The features of NS overlap with those of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome. Patients with Costello syndrome (MIM# 218040) show distinctive facial features, mental retardation, high birth weight, neonatal feeding problems, curly hair, nasal papillomata, deep skin creases at palms and soles, and hypertrophic cardiomyopathy [Hennekam, 2003]. CFC syndrome (MIM# 115150) is characterized by distinctive facial features, mental retardation, heart defects (PS, atrial septal defect [ASD], and hypertrophic cardiomyopathy), and ectodermal abnormalities such as sparse, friable hair, hyperkeratotic skin lesions, and a generalized ichthyosis-like condition [Reynolds et al., 1986].

The molecular pathogenesis of these syndromes has been investigated. Tartaglia et al. [2001] have identified missense mutations in *PTPN11*, a gene encoding protein tyrosine phosphatase (PTP) SHP-2, in 45% of clinically diagnosed NS patients. Specific mutations in *PTPN11* has been identified in patients with LEOPARD syndrome [Digilio et al., 2002]. In 2005, we identified *HRAS* germline mutations in patients with Costello syndrome [Aoki et al., 2005]. Mutations in *KRAS*, *BRAF*, and *MAP2K1/2* have been identified in those with CFC syndrome [Nihoori et al., 2006; Rodriguez-Viciana et al., 2006]. Mutations in *KRAS* and *SOS1* have also been identified in patients with NS [Roberts et al., 2007; Schubert et al., 2006; Tartaglia et al., 2007]. Mutations in *NF1* and *SPRED1* have been identified in patients with neurofibromatosis type I (MIM# 162200) [Brems et al., 2007]. These findings suggest that dysregulation of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway causes NS and related disorders, and thus it has been suggested that these syndromes be comprehensively termed the RAS/MAPK syndromes [Aoki et al., 2008] or the neuro-cardio-facio-cutaneous syndrome [Bentires-Alj et al., 2006].

In 2007, gain-of-function mutations in *RAF1* were identified in 3–17% of patients with NS and two patients with LEOPARD syndrome [Pandit et al., 2007; Razaque et al., 2007]. *RAF1* is a member of the RAF serine–threonine kinase family and transmits the upstream RAS signaling to downstream MEK and ERK. *RAF1*, *ARAF*, and *BRAF* share three conserved regions, CR1, CR2, and CR3 [Mercer and Pritchard, 2003]. Mutations in *BRAF* identified in patients with CFC syndrome are clustered in CR1 and CR3 domains [Aoki et al., 2008]. In contrast, reported *RAF1* mutations in NS and LEOPARD syndrome were located in the CR2 domain and some mutations were located in CR3 domain. These mutants had enhanced *RAF1* kinase activities and most mutations, but not all, showed enhanced phosphorylation of ERK1/2 [Pandit et al., 2007; Razaque et al., 2007]. Pandit et al. [2007] suggested that *RAF1* mutations might interfere with *RAF1* phosphorylation at serine 259 as well as with 14-3-3 interaction, and reported that p.261S did not bind to 14-3-3. However, the mechanisms of *RAF1* activation in mutants remain unexplained.

In the present study, we analyzed the *RAF1* gene in 119 patients with NS and related phenotypes without mutations in *PTPN11*, *HRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1/2*, and *SOS1*. Detailed clinical manifestations in our new patients with *RAF1* mutations were evaluated, and those in patients with *RAF1*, *KRAS*, *PTPN11*, and *SOS1* mutations previously reported by us and others were

examined. Furthermore, we explored the molecular mechanisms by which *RAF1* mutants are activated.

## Materials and Methods

### Patients

One hundred nineteen patients with NS or related phenotypes were recruited. The primary diagnoses made by clinical dysmorphologists and general pediatricians were as follows: 44 patients with NS, 46 patients with CFC syndrome, 25 patients with Costello syndrome, and 4 patients with atypical phenotypes. No mutations in *PTPN11*, *HRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, or *SOS1* were identified in these patients. Control DNA was obtained from 105 healthy Japanese individuals. Control DNA from 105 healthy Caucasian individuals was purchased from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ). This study was approved by the Ethics Committee of Tohoku University School of Medicine. We obtained informed consent from all subjects involved in the study and specific consent for photographs from six patients.

### Mutation Analysis in *RAF1*

Genomic DNA was isolated from the peripheral blood leukocytes of the patients. Each exon with flanking intronic sequences in *RAF1* was amplified with primers based on GenBank sequences (Supp. Table S1; GenBank accession no. NC\_000003.10). The M13 reverse or forward sequence was added to the 5' end of the polymerase chain reaction (PCR) primers for use as a sequencing primer. PCR was performed in 30  $\mu$ l of a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 10% (v/v) DMSO, 24 pmol of each primer, 100 ng genomic DNA, and 1.5 units of Taq DNA polymerase. The reaction conditions consisted of 35 cycles of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 55°C for 15 sec, and extension at 72°C for 40 sec. The products were gel-purified and sequenced on an ABI PRISM 310 or 3130 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### Determination of the *RAF1* Phosphorylation Status

The expression construct, including a *RAF1* cDNA (pUSEamp-*RAF1*), was purchased from Millipore (Billerica, MA). A Myc-tag was introduced at the 5' terminus of the cDNA by PCR and the PCR product was subcloned into pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). The entire cDNA was verified by sequencing. A single-base substitution resulting in p.H103Q, p.R191I, p.S257L, p.S259F, p.P261A, p.N262K, or p.S427G was introduced using a QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). All mutant constructs were verified by sequencing. The Myc-tagged wild-type *RAF1* cDNA and mutant cDNAs were digested with *EcoRI* and *EcoRV* and subcloned into the *EcoRI*–*EcoRV* site of the pUSEamp-*RAF1*.

COS7 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Cells were maintained in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS), 50 U/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. COS7 cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per 6-cm dish, and 24 hr later, 2.0  $\mu$ g of pUSE vectors encoding one of the wild-type (WT) or mutant *RAF1* cDNAs were transfected using 8  $\mu$ l of PLUS Reagent and 12  $\mu$ l of Lipofectamine Reagent (Invitrogen). After 3 hr, the medium was replaced to complete medium. After 48-hr culture, cells were scraped and collected by centrifugation after two washes with phosphate-buffered saline

(PBS). Lysates were prepared in 100- $\mu$ l lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1% SDS) and boiled for 3 min. The DNA was sheared with a syringe. The lysates were centrifuged at 14,000  $\times$  g for 15 min at 4°C and protein concentration was determined by Bradford assay. Thirty micrograms of protein was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (5–20% gradient gel) (ATTO, Tokyo, Japan), transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-Myc antibody and phospho-specific RAF1 antibodies (Cell Signaling, Danvers, MA). All the membranes were visualized using a Western Lightning ECL-Plus Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The following antibodies were used for Western blotting: anti-Myc (9E10, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), antiphospho-c-Raf (S259) (Cell Signaling), antiphospho-c-Raf (S338) (Millipore), antiphospho-c-Raf (S289/296/301) (Cell Signaling), antiphospho-c-Raf (S621) (Millipore), and antineomycin phosphotransferase II (Millipore).

For immunoprecipitation, lysates were prepared in 1 ml of ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1:100 protease inhibitor (Sigma, St. Louis, MO), 1:1000 phosphatase inhibitor (Sigma), and 1% Triton X) and incubated on ice for 15 min. Four hundred micrograms of protein was incubated with anti-Myc (9E10) antibody for 1 hr at 4°C. Immune complexes were collected by adding 50  $\mu$ l of 50% protein G-Sepharose bead slurry (GE Healthcare, Milwaukee, WI) for 1 hr at 4°C, washed three times with RIPA buffer, and then boiled in 2  $\times$  SDS buffer. The samples were resolved in 5–20% gradient polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes and probed with antiphospho-c-Raf (S259) and anti-Myc (9E10) antibodies.

### Reporter Assay

NIH 3T3 cells (ATCC) were maintained in DMEM containing 10% newborn calf serum, 50 U/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml of streptomycin. One day prior to the transfection, the NIH 3T3 cells were plated in 12-well plates with a density of  $1 \times 10^5$  cells per well. Cells were transiently transfected using Lipofectamine and PLUS Reagents with 700 ng of pFR-luc, 15 ng of pFA2-Elk1, 7 ng of pRLnull-luc, and 35 ng of WT or mutant expression constructs of RAF1. Eighteen hours after transfection, the cells were cultured in DMEM without serum for 24 hr. Cells were harvested in passive lysis buffer, and luciferase activity was assayed using a Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI). Renilla luciferase expressed by pRLnull-luc was used to normalize the transfection efficiency. The experiments were performed in triplicate. Data are shown as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using Excel.

### Binding of RAF1 with 14-3-3

An expression construct containing Myc- and Flag-tagged 14-3-3  $\zeta$  (pCMV6-14-3-3  $\zeta$ ) was purchased from Origene (Rockville, MD). In order to remove the Myc-tag from the construct, the 3' half of the cDNA and the Myc-tag were removed by digestion with EcoRV and the 3' half of cDNA was filled using PCR. An S621A mutation, which impairs phosphorylation of S621 to bind 14-3-3, was introduced into pUSE RAF1 harboring WT, p.S257L, or p.N262K cDNA by a Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit. HEK293 cells (ATCC) were transfected with 2  $\mu$ g RAF1 constructs and 2  $\mu$ g pCMV6-14-3-3  $\zeta$  construct using Lipofectamine and PLUS Reagents. After 48 hr, cells were scraped and collected by centrifugation after two washes with PBS. Lysates were prepared as described above. The Myc-tagged RAF1 was immunoprecipitated

with anti-Myc antibody (clone4A6, Millipore) for 1 hr at 4°C. Immune complexes were collected by adding 50  $\mu$ l of 50% protein G-Sepharose bead slurry (GE Healthcare) for 1 hr at 4°C, washed three times with RIPA buffer, and then boiled in 2  $\times$  SDS buffer. The samples were resolved in 5–20% gradient polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with anti-FLAG M2 (Sigma) and anti-Myc antibodies. For immunoprecipitation of 14-3-3, anti-FLAG M2 antibody was used and immunoblotting was performed using anti-FLAG M2 and anti-c-Raf (Cell Signaling) antibodies.

## Results

### Mutation Analysis in Patients

We identified eight amino acid changes in 18 patients (Table 1). A C-to-T nucleotide change, resulting in an amino acid change p.S257L, was identified in 11 patients. Novel p.R1911 (c.572G>T) and p.N262K (c.786T>A) were identified in one each patient. Previously reported mutations, including p.S259F (c.776C>T), p.P261A (c.781C>G), p.P261L (c.782C>T), p.S427G (c.1279A>G), and p.L613V (c.1837C>G), were identified in a single patient. Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in Genbank NM\_002880.3, according to journal guidelines ([www.hgvs.org/mutnomen](http://www.hgvs.org/mutnomen)). The initiation codon is codon 1. The mutation p.S427G, which has been reported in a patient with therapy-related acute myeloid leukemia [Zebisch et al., 2006], was identified in one patient. None of the newly identified mutations were observed in the control DNA of 105 ethnically matched healthy subjects. Parental samples were obtained from six patients (NS86, 92, 209, 210, 222, and 258). The analysis showed that p.S257L, p.P261A, and p.N262K occurred de novo. p.S427G was also identified as well in his 32-year-old mother, who also exhibited a Noonan phenotype with distinctive facial appearance, sparse hair in infancy, and multiple lentigenes. The p.H103Q (c.309C>G) was identified in patient NS86, in whom p.S257L was also identified. This amino acid change was identified in one of his parents without any clinical features, suggesting that this amino acid change was polymorphic.

### Clinical Manifestations of Patients with RAF1 Mutations

Initial diagnoses of patients with RAF1 mutations were as follows: NS in 11 patients, CFC syndrome in 4 patients, and Costello in 3 patients (Supp. Table S2). Four patients who were first diagnosed as having CFC syndrome were reclassified as NS because of facial features and normal mental development after identification of RAF1 mutations. Three patients were diagnosed as having Costello syndrome. One patient was redesignated as having NS (NS135) and the other patient died at 1 month (NS209). Detailed information on clinical manifestations of NS205 was not available.

Detailed clinical manifestations in 18 patients with RAF1 mutations were evaluated (Table 2 and Fig. 1). Nine of 15 patients had prenatal abnormality, including cystic hygroma, polyhydramnios, and asphyxia. Most patients had characteristic craniofacial abnormalities frequently observed in NS: relative macrocephaly (94%), hypertelorism (93%), downslanting palpebral fissures (63%), epicanthal folds (86%), and low-set ears (93%). Mental retardation was observed in 6 of 11 (55%) patients. Short stature (73%), short neck (93%), and webbing of neck (81%) were also observed. As for cardiac abnormalities, hypertrophic cardiomyopathy was observed in 10 of 16 patients (63%), followed by pulmonic stenosis (47%),