

201019028A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

難治性小児がんに対する組織的・包括的取り組みに基づく
臨床的特性に関する分子情報の体系的解析と、その知見を
活用した診断・治療法の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清河 信敬

平成23(2011)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 難治性小児がんに対する組織的・包括的取り組みに基づく臨床的特性に関する
分子情報の体系的解析と、その知見を活用した診断・治療法の開発 ----- 1
清河信敬

II. 分担研究報告

1. 臨床応用を目的とした難治性小児がんの発症・治療モデルの構築 ----- 11
清河信敬
2. 小児がんの分子病理所見に基づく悪性度の判定とその治療への応用 ----- 15
中川温子
3. 難治性小児リンパ系腫瘍の分子プロファイリングとその臨床応用 ----- 18
森鉄也
4. 難治性小児固形がんのエピゲノムを中心とした生物学的特性解析と
新規診断・治療法開発への応用 ----- 21
大喜多肇
5. 小児がんの臨床特性にかかわる遺伝子変異解析とその診断治療への応用 ----- 24
林泰秀
6. 難治性小児リンパ系腫瘍に対する分子 MRD 量に基づく治療法の開発研究 ----- 29
鶴澤正仁
7. 難治性小児腫瘍のゲノムプロファイリングによる臨床病態・予後指標の探索 ----- 31
小川誠司
8. 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と治療への応用 ----- 36
大平美紀
9. 腫瘍細胞特異的遺伝子発現の経時的変化と治療の有効性についての研究 ----- 39
福島敬

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 43

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 47

難治性小児がんに対する組織的・包括的取り組みに基づく臨床的特性に
関する分子情報の体系的解析と、その知見を活用した診断・治療法の開発

研究代表者 清河 信敬 (独)国立成育医療研究センター研究所 小児血液・腫瘍研究部 部長

研究要旨： 難治性小児がんの治療予後向上を目的に、臨床的特性に関する分子情報の網羅的体系的解析を組織的・包括的に実施し、その成果の臨床応用を目指した。1) 難治性小児がんの分子プロファイリングと標的因子探索：小児がん臨床検体の網羅的な発現遺伝子/ゲノム構造/エピゲノム解析を行ない各疾患の分子特性を明らかにした。造血器腫瘍では、Burkit リンパ腫特異的標的因子候補として ZNF385B を同定、小児白血病と MDS の一部で CBL 遺伝子変異がその発症・進展に関与する可能性を示し、悪性リンパ腫の組織的・包括的な網羅的分子解析研究に着手した。固形腫瘍では、骨肉腫で予後に強く関連すると期待される染色体領域を複数同定、クエン酸回路関連酵素をコードする IDH1 および IDH2 遺伝子の異常が一部の腫瘍の発症・進展に関与する可能性を示し、小児腎腫瘍のエピゲノムプロファイルを明らかにした。2) 小児がん発症、治療モデルの構築と解析：先行研究の成果に基づく、発症、治療モデル構築を行った。免疫不全マウスへの細胞株移植系を用いて p16 機能性ペプチドの *in vivo* における異型大細胞性リンパ腫細胞への抗腫瘍効果を確認、テトラサイクリン依存的発現系を用いて ZNF385B が B 細胞のアポトーシス制御に関与することを明らかにした。3) 分子情報に基づく治療層別化法の臨床応用：先行研究の成果をもとに構築された難治性小児がんの治療層別化法の臨床応用を目指した。肝芽腫のゲノムコピー数異常パターンの数値化閾値設定による簡便な予後層別化モデルの暫定版を構築した。小児 ALL で新たな予後因子として注目される MRD 検出に様々な方法で取り組み、再発 ALL で Ig/TCR 遺伝子再構成を利用した qPCR による「分子 MRD 法」が 95%以上の症例に適応可能であり、キメラ遺伝子の qPCR により MRD 検出が可能であることを示し、10 カラー-FCM を用いた細胞マーカーによる MRD 検出法を構築した。T-ALL の予後不良な亜群として注目される Early T-cell precursor (ETP) ALL の本邦における発症実態を明らかにしその分子特性を解析した。小児がん中央診断システムを確立し、免疫組織学的、分子病理学的解析を加えた病理診断による治療の層別化を实践、分子特性所見に基づく悪性度診断について検討を行った。

研究分担者

中澤温子
・(独)国立成育医療研究センター 部長
森鉄也
・(独)国立成育医療研究センター 医長
大喜多肇
・(独)国立成育医療研究センター 室長
林泰秀
・群馬県立小児医療センター 院長
鶴澤正仁
・愛知医科大学 教授
小川誠司
・東京大学特任准教授
大平美紀
・千葉県がんセンター 室長
福島敬
・筑波大学大学院 講師

小児がんは小児死亡の主要な原因の一つであり、成育医療分野では非常に重要な疾患である。近年小児がんの治療成績は著しく向上し、多くの症例で治癒が望める状況にある。しかし、一部に依然として治療抵抗性で再発を繰り返す亜群が存在し、分子標的療法などのより有効な治療法の開発が望まれている。逆に、治療反応例については、高い治療効果を維持しつつも、晩期障害の軽減と QOL 向上を目指した、治療の軽減が重要な課題となっている。その克服には、全ゲノム構造やエピゲノム異常、遺伝子・蛋白発現等の網羅的解析による包括的な分子異常解明を行って、難治性症例や治療反応例を事前に鑑別可能な層別化法の確立や、

A. 研究目的

新規治療法の標的となる病因分子の探索が必須である。また、小児がんは種類が多いため、病型ごとの症例数は非常に少ないものもあり、上記目的達成のためには、組織的・包括的な取り組みが不可欠である。

そこで本研究では、全国規模の研究グループと連携し、Ewing 肉腫、横紋筋肉腫、Wilms 腫瘍、神経芽腫、難治例や再発例を含む小児白血病等について、臨床検体に対する包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）手法を用いて、その臨床的特性に関する分子情報プロファイルを網羅的に明らかにし、得られた知見に基づいて培養細胞やモデル動物を用いた小児がんの発症・治療モデルを構築、解析して、層別化を含む新規診断法や、新規治療法開発を行い、臨床応用することを目的とする。特に、これまでに解析が遅れている疾患について集中的に網羅的分子特性解析を進めるとともに、先行研究の成果を治療研究に反映させることに重点をおく。

本研究の実施によって、難治性小児がんの臨床特性に関連する分子情報が明らかになり、その成果が新たな分子標的の同定に結びついて、新規治療戦略を提案することが可能となり、難治性小児がんの治療成績向上や QOL 改善に寄与することが期待され、その結果として、健全な次世代を育む環境整備を通じて、厚生労働行政に貢献することを目指す。

B. 研究方法

1. DNA 異常の解析：腫瘍試料から抽出したゲノム DNA につき、GenChip 50K/250K Array、(Affimetrix 社)、ヒトオリゴアレイ (Agilent 社) あるいは BAC アレイ (UCSF 製) を用いて網羅的ゲノムコピー数解析を行った。IDH1, IDH2 については dHPLC 法を用いて変異のスクリーニングを行った。特定の遺伝子の塩基配列異常は DNA-PCR と直接塩基配列決定により、染色体転座によるキメラ遺伝子については FISH により、それぞれ解析した。
2. 網羅的遺伝子発現解析と RNA 異常の解析：小児腫瘍細胞検体から total RNA を抽出し、WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NuGen 社) により cDNA を合成、増幅し、マイクロアレイ (Affimetrix 社

GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) により網羅的遺伝子発現を行った。得られたデータは GeneSpring (Agilent 社) を用いて解析した。

キメラ遺伝子については、定量 PCR あるいは reverse transcriptase (RT)-PCR と直接塩基配列決定により解析した。

3. 分子 MRD 量解析：初発時の ALL 細胞から抽出した DNA に Ig/TCR の multiplex PCR によって MRD ターゲットを検出し、直接塩基配列によりプライマーを設定して、定量 PCR を行った。
4. 小児 ALL のマーカー解析：10 カラー全血法の蛍光染色を行いフローサイトメトリーにより解析した。
5. 小児がんの検体保存中央診断：パラフィン切片 HE 染色標本の病理診断に加え、各病型や組織型に応じた免疫組織化学染色および RT-PCR, FISH 法による分子病理学的解析をおこなった。
6. 標的遺伝子の機能解析：テトラサイクリン依存的な発現誘導系を用いて、培養細胞に標的遺伝子を発現させ、その機能解析を行なった。免疫不全マウスに培養細胞を移植し、p16 機能ペプチドを投与して抗腫瘍効果を検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 難治性小児がんの分子プロファイリングと標的因子探索：小児リンパ性腫瘍 77 例、小児肉腫 26 例、骨肉腫 16 例を始めとする小児腫瘍の発現遺伝子、ゲノム構造、エピゲノム等の網羅的な分子解析を行った。

造血器腫瘍では、リンパ性腫瘍の亜群ごとの遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにし、成熟 B リンパ腫の中の、Burkit リンパ腫に特異的に発現するジンクフィンガー型蛋白 ZNF385B を同定した。この分子は同じ成熟 B リンパ腫である瀰漫大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) には発現を認めない。種々の分化段階の B

リンパ性腫瘍細胞株について、RT-PCR で検討した結果、ZNF385B の Burkitt リンパ腫特異的発現が確認された(清河)。全国規模での組織的、包括的な、小児リンパ腫の網羅的分子解析研究に着手した(森)。また、小児白血病 149 例と MDS 65 例における CBL 遺伝子と臨床像の関係を検討し、MDS のうち JMML 40 例中 3 例(いずれも 11 番長腕-acquired uniparental disomy)に、AML 81 例中急性巨核芽球性白血病 1 例に、また治療関連白血病 20 例中 MLL 再構成のある 1 例に、それぞれ CBL 遺伝子の変異がみられたが、ALL 28 例では変異はみられなかった(林)。

固形腫瘍では、均一な背景を持つ小児骨肉腫の予後良好例 8 例(2 年以上無病生存)と予後不良例 8 例(転帰死亡)を対象としてゲノム解析を行い、予後良好群における 1q22 と予後不良群における 12q13 の 2 領域でそれぞれ特異的に増幅を認め、特に 12q13 の gain は化学療法奏効群 8 例(予後良好群中 8 例)と化学療法不奏効群(予後不良群中 6 例)との比較においても、有意に不奏効群で高頻度であった(大平)。IDH1 D143X(G435 1bp deletion による frameshift mutation)、IDH1 I154V を神経芽腫の新鮮腫瘍 2 例と IDH1 S389C を Ewing 肉腫新鮮腫瘍 1 例に検出し、IDH2 V8G を神経膠腫細胞株 1 株、IDH2 L160X(V121 1bp insertion による frameshift mutation)を横紋筋肉腫細胞株 1 株、IDH2 P23R を神経芽腫新鮮腫瘍 1 例および IDH2 I142L を Ewing 肉腫新鮮腫瘍 1 例に検出(IDH1 変異を計 3 検体、IDH2 変異を計 4 検体)したが、いずれもこれまでに報告のないものであった。Mutation testing の結果、IDH2 V8G を除きすべて disease causing であり、IDH2 I142L は機能喪失型の変異であることが判明した(小川)。また、小児の小円形肉腫の、病型ごとの遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにし、発現遺伝子のパターンに基づいた鑑別法開発に着手している(大喜多、清河)。

2. 小児がん発症、治療モデルの構築と解析：先行研究の成果に基づく、発症、治療モデル構築を行った。p16INK4a 機能性ペプチドは、異型大細胞性リンパ腫細胞(ALCL)細胞に対して増殖抑制とアポトーシス誘導を示すが、健常者末梢血単核球に対しては細胞傷害効果を認めなかつ

た。p16 非発現株では、p16 機能性ペプチド導入による Rb 蛋白のリン酸化の低下を認めた。免疫不全マウス xenograft を用いた検討では、p16 機能性ペプチド皮下注 4 日後に腫瘍が 43 %に縮小した(p=0.007)(中澤)。ZNF385B の機能解析を目的に、同分子を発現しない DLBCL 細胞株にテトラサイクリン依存的発現系を用いて ZNF385B を強制発現させたところ、アポトーシスが誘導され、同分子がアポトーシス制御に関与することが判明した。さらに、その分子機構の詳細を解析中である(清河)。

3. 分子情報に基づく治療層別化法の臨床応用：先行研究の成果をもとに構築された難治性小児がんの治療層別化法の臨床応用を目指した。

先行研究から、肝芽腫の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 の欠失であった。検討の結果、予後と特に有意に相関を示す因子は上記ゲノム異常マーカー(p<0.01, Hazard ratio:10.6)と病期(p<0.01, Hazard ratio:9.0)で、これらは予後に関して独立のマーカーであり、診断時年齢、病理診断、AFP タンパク質のレベルなど、その他の既知の臨床マーカーやβカテニン遺伝子変異は予後との強い相関は見られなかった(大平)。

ALL を代表とする小児リンパ系腫瘍の再発・難治例は極めて予後不良であるが、治療反応性と予後は腫瘍クロンの生物学的特徴や骨髄の MRD 量と関連が深い。そこで、本研究では様々な方法でリンパ系腫瘍の MRD 量検出を試み、その臨床応用を目指している。小児 ALL39 例(再発 16 例を含む)に対して Ig/TCR 遺伝子再構成を利用した RQ-PCR による「分子 MRD 法」を実施し、22 例について MRD スクリーニングが既に終了して 21 例(95%)で MRD ターゲット(再構成)検出に成功した。特に再発例では、検体不足例を除き全例で検出可能であり、骨髄のみでなく、中枢神経単独再発、精巣単独再発でも MRD ターゲット検出にも成功した(鶴澤)。ALL の初診時のスクリーニングで検出された TEL-AML1=17 症例、BCR-ABL=8 症例、E2A-PBX1=8 症例、SIL-TAL1=2 症例、MLL 再構成=3 症例のそれぞれのキメラ遺伝子について、day15、day29、day43 (寛

解導入療法後)の骨髄で定量 PCR を行い、MRD の状況を追跡することが可能であることが確認された(福島)。また、10 カラーFCM を用いた細胞マーカーによる MRD 検出法を構築し、臨床検体を用いて実際に MRD 検出に有用であることを確認した(清河)。

最近、ETP-ALL という疾患概念が海外で提唱され、T-ALL の予後不良な亜群として注目される。そこで、本邦の T-ALL=161 例における細胞マーカーをについて検討した結果、33 例(20.5%)が ETP-ALL の基準を満たしており、海外の報告(St. Jude+AIEOP の 12.6%)より高い頻度であることが明らかとなった(清河)。

リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫について中央診断を行い、従来の免疫組織学的染色に加えて FISH 法による染色体転座・MYCN 遺伝子増幅が鑑別診断、予後因子の検討に有用であることを示した(中澤)。

D. 考察

1. 難治性小児がんの分子プロファイリングと標的因子探索：小児腫瘍の分子プロファイリングが進捗した。造血器腫瘍では、リンパ性腫瘍の亜群ごとに特徴的な発現遺伝子が複数同定されており、その解析を進めている。ZNF385B は Burkitt リンパ腫に特異的に発現することから、鑑別診断への応用が期待される(清河)。今後さらに全国規模での組織的、包括的な、小児リンパ腫の網羅的分子解析研究が進捗することによって、本邦のリンパ腫の分子特性が体系的に解明されることが期待される(森)。CBL 遺伝子は JMML の原因遺伝子の 1 つであると思われた。今後小児 AML における CBL 遺伝子変異の臨床的意義を検討するためには、より多数例での解析が必要であり、現在 AML-05 プロトコール 350 症例の解析を準備している(林)。

ゲノムプロファイリングによる骨肉腫の化学療法感受性予測については、今後症例を追加し検証が必要であるが、本研究の結果から骨肉腫におけるゲノムコピー数解析が予後を反映するマーカーとなりうることを示された。次年度以降新規症例を加えてゲノム領域の絞り込みを行ない、候補遺伝子についても検討を進める

(大平)。今回の検討の結果、小児造血器腫瘍における IDH1/2 の関与は少ないと考えられた。一方、小児固形腫瘍において一部の腫瘍の発症・進展に IDH1/2 が関与していることが示唆され、その中でも一部の例では機能喪失型の異常が腫瘍化に関与している可能性が示された(小川)。小児の小円形肉腫について遺伝子発現パターンに基づいた鑑別法の確立によって、臨床診断への応用が期待される(大喜多、清河)。

2. 小児がん発症、治療モデルの構築と解析：p16 機能性ペプチドの ALCL 細胞に対する腫瘍抑制効果について、in vivo での効果が確認された。p16 非発現株における増殖抑制は、p16 機能性ペプチド導入による p16INK4a-cyclinD-CDK4Rb 経路の機能回復によるものと考えられた(中澤)。Burkitt リンパ腫特異的に発現する ZNF385B はアポトーシス制御に関与する分子であることが明らかになり、同リンパ腫の病態にかかわる可能性が示唆されるとともに、アポトーシス制御による治療への応用が期待される(清河)。

3. 分子情報に基づく治療層別化法の臨床応用：肝芽腫のゲノムプロファイルに基づく予後層別化モデルの構築では、網羅的遺伝子発現の解析から特に良好な再現性を示した約 20 遺伝子を絞り込んだが、これらの発現パターンを統計的予測アルゴリズムに組み込みリスクマーカーとして使用するにはさらに追加の症例のデータが必要であり、次の課題である。肝芽腫のゲノムプロファイルに基づく予後層別化モデルの構築に関しては、今後本研究のゲノムプロファイルに基づく肝芽腫予後層別化暫定モデルを臨床試験に付随した前方視的研究体制を整備し検証、実用化することが望まれる(大平)。

RQ-PCR による「分子 MRD 法」では、今回は小児再発 ALL を対象として RQ-PCR 法による MRD 定量を実施した結果、腫瘍細胞の免疫遺伝子再構成は 95% という高い頻度で検出可能であった。精巢の組織検体や髄液からの MRD ターゲット検出も実施可能であり、今後のリンパ腫を対象とした本研究の応用可能性を強く示唆する結果であった。また 21 例中 17 例で 2 個以上の再構成が確認されたが、これらはリンパ系腫瘍のサブクローンの存

在を示唆しており、今後は初発時や再発時のサブクローンが次の再発時にどのように保存されるか否かを明らかにすることが重要な課題である（鶴澤）。キメラ遺伝子による MRD 検出では、予後不良因子とされる BCR-ABL の MRD 陰性化までの期間は、他のキメラ遺伝子に比べて明らかに長い傾向が確認された。予後不良因子とはされていない TEL-AML1 および E2A-PBX1 では、多くの症例では MRD 陰性化が day29 の時点であるが、一部に day15 の早期に陰性化する反応良好例がある一方で、陰性化が day43 以降の反応不良例が存在する。今後予後との関係について解析を進め、その予後予測因子としての有用性を明らかにする（福島）。FCM による MRD 検出は、簡便で低コストであり、10 カラーを用いることによって、より精度の高い MRD 検出が可能であれば、臨床的な有用性が高いと期待され、今後 PCR による MRD 検出との相関性や、予後との関係についてさらに検討を進め、臨床応用を目指す（清河）。

ETP-ALL については、今後さらにその臨床特性や、分子特性について明らかにし、治療層別化する妥当性について検証を進める（清河）。

リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫の中央診断については、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。パラフィン切片を用いた FISH 法による MYCN 遺伝子増幅や染色体転座の判定は概ね容易であり、凍結組織が得られない症例でもこれらの遺伝子の検索が可能であった（中澤）。

E. 結論

難治性小児がんの分子プロファイリングを行って診断・治療の標的因子を探索し、同定された標的因子候補について小児がんの発症、治療モデル構築を目的とした解析を行なった。また、先行研究で得られた知見をもとに、分子情報に基づく治療層別化法の臨床応用に関する研究を進めた。今後さらに、これまでの研究成果の臨床への応用の実現に力を注ぎ、難治性小児がんの治療予後向上に寄与す

ることを目指す。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Onda K, Iijima K, Katagiri YU, Okita H, Saito M, Shimizu T, Kiyokawa N. Differential effects of BAFF on B cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. *Int J Hematol.* 2010 Jun;91(5):808-19.

2) Miyagawa Y, Okita H, Hiroshima M, Sakamoto R, Kobayashi M, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata JI, Umezawa A, Kiyokawa N. A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation. *Tissue Eng Part A.* 2010 Sep 6. [Epub ahead of print].

3) Kaneko T, Okita H, Nakajima H, Iijima K, Ogasawara N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Nakagawa A, Kiyokawa N, Sato T, Fujimoto J. Neuroblastoma cells can be classified according to distinctive glycosphingolipid expression profiles identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Oncol.* 2010 Nov;37(5):1279-88.

4) 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. *Cytometry Research* 2010 Sep;20 (2):27-34.

5) Ogasawara N, Katagiri YU, Kiyokawa N, Kaneko T, Sato B, Nakajima H, Miyagawa Y, Kushi Y, Ishida H, Kiso M, Okita H, Sato T, Fujimoto J. Accelerated biosynthesis of neolactoseries-glycosphingolipids in differentiated mouse embryonal carcinoma F9 cells detected by using dodecyl N-acetylglucosaminide as a saccharide primer. *J Biochem.* (in press).

6) Ohta H, Iwamoto S, Kiyokawa N, Tsurusawa M, Deguchi T, Takase K, Fujimoto J, Horibe K, Komada Y. Flow cytometric analysis of de novo acute myeloid leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* (in press).

7) Katagiri YU, Sato B, Yamatoya K, Taki T, Goto-Inoue N, Setou M, Okita H, Fujimoto J, Ito C, Toshimori K, Kiyokawa N. GalNAc β 1,3-linked paragloboside carries the epitope of a sperm maturation-related glycoprotein that is recognized by the monoclonal antibody MC121. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press).

8) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos

at cleavage stage. BMC Dev Biol. (in press).

9) Nakagawa A, Matsuoka K, Okita H, Iwafuchi H, Hori H, Kumagai M. Neuroblastoma with discordant genotype-phenotype relationship: Report of four cases with MYCN amplification and favorable histology. *Pediatr Devel Pathol* (in press).

10) Kasahara M, Sakamoto S, Shigeta T, Fukuda A, Kosaki R, Nakazawa A, Uemoto S, Noda M, Naiki Y, Horikawa R. Living-donor liver transplantation for carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency. *Pediatr Transplant*. 2010 Dec;14(8):1036-40.

11) Fu Yong-Juan, Morota N, Nakagawa A, Takahashi H, Kakita A. Neurocutaneous melanosis: surgical pathological features of an apparently hamartomatous lesion in the amygdala. *J Neurosurg Pediatrics*. 6(1):82-6, 2010.

12) Nakahara K, Morota N, Ihara S, Oka H, Matsuoka K, Nakagawa A. Meningeal Melanocytoma Extruded From the Skull of a Neonate -Case Report-. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 50(3):240-242, 2010.

13) Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamijo T. Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene*. 29(18):2681-90, 2010.

14) Kobayashi R, Yamato K, Tanaka F, Takashima Y, Inada H, Kikuchi A, Kumagai MA, Sunami S, Nakagawa A, Fukano R, Fujita N, Mitsui T, Tsurusawa M, Mori T. Lymphoma Committee, Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Retrospective analysis of non-anaplastic peripheral T-cell lymphoma in pediatric patients in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 54(2):212-5, 2010.

15) 中澤温子. 小児白血病・リンパ腫の病理診断. *小児科臨床*. 73(8):1290-1294, 2010.

16) 中澤温子. 小児リンパ腫の病理. *日本小児血液学会誌*. 24(8):230-33, 2010.

17) 中澤温子. 未分化大細胞型リンパ腫 ALK 陽性と陰性. *病理と臨床*. 28(8): 828-832, 2010.

18) 中澤温子. Anaplastic lymphoma kinase (ALK). *病理と臨床*. 28(臨時増刊号): 326-327, 2010.

19) 杉本貴昭, 山中潤一, 麻野泰包, 中川温子, 藤本治朗. 生体肝移植後 6 年目に発症した Burkitt リンパ腫の 1 例. *移植*. 45(1): 54-59, 2010.

20) 松岡健太郎, 坂田晃子, 大喜多肇, 中川温子. 増殖性筋膜炎の一例. *小児がん*. 47(1): 170, 2010.

21) 大喜多肇, 松岡健太郎, 坂田晃子, 中川温子. Mesenchymal hamartoma of the liver の一例. *小児がん*. 47(1): 154, 2010.

22) 中澤温子. 小児悪性リンパ腫の分類・診断・予後因子. *血液診療エキスパート 悪性リンパ腫*. 243-252, 中外医学社. 2010.

23) 中川温子. 小児節性濾胞辺縁帯リンパ腫 小児濾胞性リンパ腫 原発性免疫不全に伴うリンパ増殖性疾患 「WHO 血液腫瘍分類—WHO 分類 2008 をうまく活用するために—」. 351-352, 358-360, 530-533, 医薬ジャーナル社. 2010.

24) 森 鉄也. 小児未分化大細胞型リンパ腫の治療. *日本小児血液学会雑誌* 24 巻 3 号. Page131-138. 2010.

25) 森 鉄也. 【小児リンパ腫】 未分化大細胞型リンパ腫. *日本小児血液学会雑誌* 24 巻 4 号. Page241-244. 2010.

26) 森 鉄也. 【小児白血病・リンパ腫診療のアップデート】 病態と治療 未分化大細胞型リンパ腫. *小児科診療* 73 巻 8 号. Page1383-1389. 2010.

31) 石田剛, 大喜多肇, 長谷川匡, 秦順一. Ewing 肉腫の病理診断上の問題点. *日本整形外科学会雑誌*. 84 : 1126-1131, 2010.

32) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):382-4.

33) Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. 2011 Feb;102(2):302-8.

34) Kawamura M, Kaku H, Ito T, Funata N, Taki T, Shimada A, Hayashi Y. FLT3-internal tandem duplication, CD56 expression, and obstructive jaundice due to granulocytic sarcoma at relapse in a pediatric patient with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Dec;203(2):292-6.

35) Taketani T, Taki T, Nakamura T, Kobayashi Y, Ito E, Fukuda S, Yamaguchi S, Hayashi Y. High frequencies of simultaneous FLT3-ITD, WT1 and KIT mutations in hematological malignancies with NUP98-fusion genes. *Leukemia*. 2010 Nov;24(11):1975-7.

36) Shiba N, Kanazawa T, Park MJ, Okuno H, Tamura K, Tsukada S, Hayashi Y, Arakawa H. NOTCH1 mutation in a female with myeloid/NK cell precursor acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Dec 15;55(7):1406-9.

37) Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Nov 25;116(22):4631-8.

38) Minobe K, Ono R, Matsumine A, Shibata-Minoshima F, Izawa K, Oki T, Kitaura J, Iino T,

- Takita J, Iwamoto S, Hori H, Komada Y, Uchida A, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T. Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. *Int J Oncol*. 2010 Sep;37(3):569-81.
- 39) Mizushima Y, Taki T, Shimada A, Yui Y, Hiraumi Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe K, Kamitsuji Y, Hayashi Y, Tsukimoto I, Kobayashi R, Horibe K, Tawa A, Nakahata T, Adachi S. Prognostic significance of the BAALC isoform pattern and CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol*. 2010 Jun;91(5):831-7.
- 40) Komeno Y, Kitaura J, Watanabe-Okochi N, Kato N, Oki T, Nakahara F, Harada Y, Harada H, Shinkura R, Nagaoka H, Hayashi Y, Honjo T, Kitamura T. AID-induced T-lymphoma or B-leukemia /lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1018-24.
- 41) 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; Tokyo Children's Cancer Study Group. Long-term results of Tokyo Children's Cancer Study Group trials for childhood acute lymphoblastic leukemia, 1984-1999. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):383-96.
- 42) Shiba N, Kato M, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1090-2.
- 43) Taga T, Shimomura Y, Horikoshi Y, Ogawa A, Itoh M, Okada M, Ueyama J, Higa T, Watanabe A, Kanegane H, Iwai A, Saiwakawa Y, Kogawa K, Yamanaka J, Tsurusawa M. Continuous and high-dose cytarabine combined chemotherapy in children with down syndrome and acute myeloid leukemia: Report from the Japanese children's cancer and leukemia study group (JCCLSG) AML 9805 down study. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Dec 30. [Epub ahead of print]
- 44) Maeda N, Horibe K, Kato K, Kojima S, Tsurusawa M. Survey of childhood cancer survivors who stopped follow-up physician visits. *Pediatr Int*. 2010 Oct;52(5):806-12.
- 45) Yamaji K, Okamoto T, Yokota S, Watanabe A, Horikoshi Y, Asami K, Kikuta A, Hyakuna N, Saikawa Y, Ueyama J, Watanabe T, Okada M, Taga T, Kanegane H, Kogawa K, Chin M, Iwai A, Matsushita T, Shimomura Y, Hori T, Tsurusawa M; Japanese Childhood Cancer Leukemia Study Group. Minimal residual disease-based augmented therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Dec 15;55(7):1287-95.
- 46) Kobayashi R, Yamato K, Tanaka F, Takashima Y, Inada H, Kikuchi A, Kumagai MA, Sunami S, Nakagawa A, Fukano R, Fujita N, Mitsui T, Tsurusawa M, Mori T; Lymphoma Committee, Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Retrospective analysis of non-anaplastic peripheral T-cell lymphoma in pediatric patients in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Feb;54(2):212-5.
- 47) Tsurusawa M, Shimomura Y, Asami K, Kikuta A, Watanabe A, Horikoshi Y, Matsushita T, Kanegane H, Ohta S, Iwai A, Mugishima H, Koizumi S; Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group. Long-term results of the Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group studies 811, 841, 874 and 911 on childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):335-44.
- 48) Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*. 2010 May 13;115(19):3869-78.
- 49) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3158-61.
- 50) Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, Weiss T, Nowak D, Koren-Michowitz M, Kato M, Sanada M, Shih LY, Nagler A, Raynaud SD, Muller-Tidow C, Mesa R, Haferlach T, Gilliland DG, Tefferi A, Ogawa S, Koefler HP. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2882-90.
- 51) Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Sanada M, Nannya Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Imazeki F, Yoshida H, Ogawa S, Yokosuka O, Omata M. Prognostic significance of genetic alterations detected by high-density single nucleotide polymorphism array in gastric cancer. *Cancer Sci*. 2010 May;101(5):1261-9.
- 52) Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijaykrishnan J, Papaemmanuil E, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Gast A, Dobbins SE, Ma Y, Sheridan E, Taylor M, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JA, Allan JM, Moorman AV, Harrison CJ, Tomlinson IP, Richards S, Zimmermann M, Szalai C, Semsei AF, Erdelyi DJ, Krajcinovic M, Sinnett D, Healy J, Neira AG, Kawamata N, Ogawa S, Koefler HP, Hemminki

- K, Greaves M, Houlston RS. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet.* 2010 Jun;42(6):492-4.
- 53) Okamoto R, Ogawa S, Nowak D, Kawamata N, Akagi T, Kato M, Sanada M, Weiss T, Haferlach C, Dugas M, Ruckert C, Haferlach T, Koeffler HP. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2010 Sep;95(9):1481-8.
- 54) Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated Intracellular Signaling by Mutated c-CBL in Myeloid Neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2010 Aug 1;16(15):3825-31.
- 55) Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle.* 2010 Mar 23;9(6)..
- 56) Nowak D, Ogawa S, Muschen M, Kato M, Kawamata N, Meixel A, Nowak V, Kim HS, Kang S, Paquette R, Chang MS, Thoenissen NH, Mossner M, Hofmann WK, Kohlmann A, Weiss T, Haferlach T, Haferlach C, Koeffler HP. SNP array analysis of tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia identifies heterogeneous secondary genomic alterations. *Blood.* 2010 Feb 4;115(5):1049-53.
- 57) Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2010 Apr 8;115(14):2872-81.
- 58) Morishima S, Ogawa S, Matsubara A, Kawase T, Nannya Y, Kashiwase K, Satake M, Saji H, Inoko H, Kato S, Kodera Y, Sasazuki T, Morishima Y. Impact of highly conserved HLA haplotype on acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2010 Jun 10;115(23):4664-70.
- 59) Lilljebjorn H, Sonesson C, Andersson A, Heldrup J, Behrendtz M, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Mitelman F, Johansson B, Fontes M, Fioretos T. The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mol Genet.* 2010 Aug 15;19(16):3150-8.
- 60) Asaoka Y, Tada M, Ikenoue T, Seto M, Imai M, Miyabayashi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Kudo Y, Mohri D, Isomura Y, Ijichi H, Tateishi K, Kanai F, Ogawa S, Omata M, Koike K. Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Apr 16;394(4):1042-6.
- 61) Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A, Mimaki M, Kato M, Ogawa S, Igarashi T. Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. *Brain Dev.* 2010 Aug 19. [Epub ahead of print]
- 62) Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamijo T. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene* 30(1):97-105, 2011.
- 63) Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Masumoto K, Ohira M, Nakagawara A, Taguchi T. Concordance for neuroblastoma in monozygotic twins: case report and review of the literature. *J. Pediatr Surg.* 45(12):2312-6, 2010.
- 64) Ohira M, Nakagawara A. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. *Cancer Sci.* 101(11):2295-301, 2010.
- 65) De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebbeck J, Van Maerken T, De Paepe A, Laureys G, Schulte JH, Schramm A, Van Den Broecke C, Vermeulen J, Van Roy N, Beiske K, Renard M, Noguera R, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Kogner P, Martinsson T, Nakagawara A, Ohira M, Caron H, Eggert A, Cools J, Versteeg R, Speleman F. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin. Cancer Res.* 16(17):4353-62, 2010.
- 66) Shi Y, Takenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Jiang LL, Kamijo T. HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* 46(12):2324-34, 2010.
- 67) De Preter K, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris J, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A, Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schute J, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent datasets using a multi-gene signature. *Clin. Cancer Res.* 16(5): 1532-41, 2010.

2. 学会発表 (主要なもののみ記載)

- 1) 恩田恵子, 玉一博之, 山田浩之, 齋藤洋平, 鈴木恭子, 藤村純也, 齋藤正博, 清水俊明, 清河信敬. 小児 B 細胞性腫瘍における BAFF 受容体の発現と BAFF の作用. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 盛岡, 4 月 23 日-25 日, 2010.
- 2) 朴明子, 加藤元博, 清河信敬, 滝田順子, 真田昌, 小川誠司, 林泰秀. 小児 T 細胞性急性リンパ性白血病における網羅的ゲノム解析. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 4 月 23-25 日, 2010.
- 3) 橋本互, 清河信敬. 小児造血器腫瘍のマ

- ルチカラーFCM 分析. (シンポジウム) 第 20 回 日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6月26日-27日, 2010.
- 4) 清河信敬, 恩田恵子, 橋本互, 長谷川大輔, 飯島一智, 福島敬, 齋藤正博, 藤本純一郎, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 5 カラーおよび 10 カラーによる小児白血病のマーカー中央診断. 第 20 回 日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6月26日-27日, 2010.
- 5) 飯島一智, 藤本純一郎, 中川温子, 清河信敬. Analysis on molecules characteristically expressed in childhood mature B-cell lymphoma/leukemia. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月22日-24日, 2010.
- 6) 朴明子, 加藤元博, 清河信敬, 滝田順子, 小川誠司, 林泰秀. 小児 T 細胞性造血器腫瘍における LEF1 遺伝子の異常. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月22日~24日, 2010
- 7) 清河信敬, 恩田恵子, 橋本互, 長谷川大輔, 飯島一智, 福島敬, 齋藤正博, 藤本純一郎, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 小児白血病のマーカー中央診断に対する 10 カラーフローサイトメトリー解析の有用性. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9月24日-26日, 2010.
- 8) 飯島一智, 恩田恵子, 中川温子, 藤本純一郎, 清河信敬. 小児成熟 B 細胞性リンパ腫/白血病に特徴的に発現する遺伝子の解析. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9月24日-26日, 2010.
- 9) Park MJ, Kato M, Kiyokawa N, Takita J, Ogawa S, Hayashi Y. Mutations of LEF1 gene in pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9月24日-26日, 2010.
- 10) Park MJ, Kiyokawa N, Kato M, Suzuki N, Oda M, Hara J, Kobayashi R, Horibe K, Ogawa S, Hayashi Y. LEF1 gene mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T cell non-hodgkin's lymphoma. The 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando, U.S.A., 12.4-7, 2010.
- 11) 清河信敬, 犬飼岳史, 高橋浩之, 康勝好, 杉田完爾, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 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中央診断における Early T-cell precursor ALL のマーカーの特徴. 第 52 回日本小児血液学会学術総会, 大阪, 12月17日-19日, 2010.
- 12) 犬飼岳史, 清河信敬, 高橋浩之, 康勝好, 真部淳, 熊谷昌明, 小原明, Dario Campana, 杉田完爾. Early T-cell precursor ALL 同定のための汎用抗原を用いたスコアリング・システム. 第 52 回日本小児血液学会学術総会, 大阪, 12月17日-19日, 2010.
- 13) Nakazawa A. Central Pathology Review System for Pediatric Cancers in Japan. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society. Workshop 9 「Current state and problem for childhood cancers in Asia」 Gifu, Japan, August 26, 2010.
- 14) 中澤温子, 大島孝一, 北條洋, 松野吉宏, 田丸淳一, 藤本純一郎, 中村栄男, 中峯寛和, 吉野正, 森鉄也, 鶴澤正仁. Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma の臨床病理学的検討. 第 52 回日本小児血液学会総会. 大阪, 12月19日, 2011.
- 15) Okita H, Haruta M, Kaneko Y, Koshinaga T, Hinotsu S, Fukuzawa M, Horie H, Hata J, Kiyokawa N. WT1 alterations in nephroblastoma and the genotype-phenotype correlation in Japan. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society, Gifu, August 25-27, 2010.
- 16) 滝田順子, 西村力, 大木健太郎, 金兼弘和, 大喜多肇, 藤本純一郎, 菊地陽, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司. Ewing/PNET family における ALK 遺伝子の解析. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 4月23-25日, 2010.
- 17) 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, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司. 神経芽腫における部分欠損型 ALK の活性化. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 4月23-25日, 2010.
- 18) 林泰秀. 小児白血病の発症, 進展の分子遺伝学. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 4月23-25日, 2010.
- 19) 柴徳生, 加藤元博, 朴明子, 真田昌, 金澤崇, 福島啓太郎, 伊藤悦朗, 工藤寿子, 荒川浩一, 小川誠司, 林泰秀. 小児白血病と MDS における CBL と MPL 遺伝子の解析. 第 7 回北関東小児がんセミナー, 高崎, 5月15日, 2010.
- 20) 西村力, 滝田順子, 真田昌, 大久保淳, 大木健太郎, 加藤元博, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 難治性小児固形腫瘍における ALK 変異と臨床応用. 第 7 回北関東小児がんセミナー, 高崎, 5月15日, 2010.
- 21) 樋渡光輝, 滝田順子, 大久保淳, 西村力, 大木健太郎, 内坂直樹, 安達正時, 真田昌, 加藤啓輔, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 小児固形腫瘍における ALK 阻害剤を用いた抗腫瘍効果の検討. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月22日~24日, 2010.
- 22) 滝田順子, 西村力, 大木健太郎, 樋渡光輝, 大久保淳, 内坂直紀, 真田昌, 大喜

- 多摩, 藤本純一郎, 金兼弘和, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 小児固形腫瘍における ALK 遺伝子の関与. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日~24 日, 2010.
- 23) 柴徳生, 加藤元博, 朴明子, 真田昌, 花田良二, 伊藤悦朗, 荒川浩一, 小川誠司, 林泰秀. 小児悪性造血腫瘍における CBL 遺伝子と MPL 遺伝子の変異解析. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日~24 日, 2010.
- 24) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Ohkubo J, Uchisaka N, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Genome-wide scanning of pediatric acute myeloid leukemia using SNP-genotyping microarrays. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.
- 25) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Ohkubo J, Uchisaka N, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Mutations of IDH1 and IDH2 in pediatric acute myeloid leukemia. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.
- 26) Uchisaka N, Kato M, Takita J, Sanada M, Nishimura R, Oki K, Okubo J, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Mutation analysis of lymphocyte tyrosine kinase (LTK) in acute lymphoblastic leukemia. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.
- 27) Shiba N, Kato M, Park MJ, Sanada M, Fukushima K, Kudo K, Hanada R, Ito E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. Mutation analyses of CBL and MPL genes in childhood leukemia and myelodysplastic syndrome. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.
- 28) Toki T, Kanezaki R, Wang RN, Terui K, Hayashi Y, Miura M, Maeda M, Ito E. Internal deletions of transcription factor GATA1 observed in transient abnormal myelopoiesis. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.
- 29) Uchisaka N, Kato M, Takita J, Sanada M, Nishimura R, Oki K, Okubo J, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Mutation analysis of lymphocyte tyrosine kinase (LTK) in acute lymphoblastic leukemia. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.
- 30) Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Takita J, Kato M, Kanazaw T, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutations in therapy-related leukemia and infant leukemia. The 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando, U.S.A., 12.4-7, 2010.
- 31) 佐野弘純, 嶋田明, 村田知里, 朴明子, 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. 急性骨髄性白血病における RAS 遺伝子変異と臨床像. 第 52 回日本小児血液学会学術総会・第 26 回日本小児がん学会学術集
- 会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 32) 柴徳生, 滝智彦, 朴明子, 長澤正之, 金澤崇, 外松学, 荒川浩一, 林泰秀. 治療関連白血病における CBL と RAS 遺伝子の解析. 第 52 回日本小児血液学会学術総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 33) 堀壽成, 山田朋美, 山路和孝, 鶴澤正仁, 横田昇平, 渡辺新, 菊田敦, 百名伸之, 今井千速. CCLSGALL2004 研究における Ig/Tc 遺伝子再構成のパターンと RPCR-MRD への適応性. 第 52 回日本小児血液学会学術総会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 34) Ohira M, Kojima T, Niwa T, Oba S, Ishii S, Takita J, Kato M, Ogawa S, Nakamura Y, Kamijo T, Nakagawara A.: Clinical application of genomic signature including ALK mutation to the new tumor risk classification for neuroblastoma. American Association for Cancer Research 100th Annual Meeting (AACR) 2010, Washington D.C., USA. April 17-21, 2010.
- 35) Ohira M, Nakamura Y, Kojima T, Niwa T, Takita J, Kato M, Ogawa S, Oba S, Ishii S, Kamijo T, Nakagawara A.: Risk stratification of neuroblastoma by genomic signature including ALK abnormality. Advances in Neuroblastoma Research 2010 (ANR2010), Stockholm Sweden, June 21-24, 2010.
- 36) Ohira M, Nakamura Y, Kamijo T, Oba S, Ishii S, Nakagawara A.: Genomic and expression profiles specifically characterize therapy-resistant aggressive neuroblastomas. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日-24 日, 2010.
- 37) 岩田慎太郎, 大平美紀, 上條岳彦, 米本司, 石井猛, 館崎慎一郎, 中川原章. Genomic approach による骨肉腫の化学療法感受性予測. 第 52 回日本小児血液学会総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 38) 大平美紀, 大羽成征, 中村洋子, 上條岳彦, 淵岡美佐, 好田忠行, 石井信, 中川原章. 神経芽腫のカスタム化遺伝子発現ミニチップの clinical validation と腫瘍リスク分類構築における意義の検討. 第 52 回日本小児血液学会総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.

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

臨床応用を目的とした難治性小児がんの発症・治療モデルの構築

研究代表者 清河 信敬 (独)国立成育医療研究センター研究所 小児血液・腫瘍研究部長

研究要旨. 1) 小児リンパ性腫瘍 77 例、小児肉腫 26 例について、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行ない、病型ごとの発現遺伝子プロファイリングにより Burkitt リンパ腫特異的因子 ZNF385B を同定し、培養細胞系を用いてこの分子が B 細胞の細胞死制御に関与することを明らかにした。標的因子としての臨床応用を目指してさらに解析中である。2) T 細胞性 ALL の中の前不良亜群として海外で注目されている Early T-cell precursor (ETP-)ALL に関し、本邦における発症の実態と、分子特性解析を行った。本邦でも、海外と同頻度で該当症例が存在することが明らかとなり、その臨床特性についてさらに検討中である。3) 小児 ALL の新たな予後層別化因子として期待される微小残存病変(MRD)について、10 カラーフローサイトメトリー(FCM)での細胞マーカーによる検出法を構築し臨床検体を用いてその有用性を確認した。臨床応用を目指してさらに検討中である。

A. 研究目的

小児がんは小児死亡の主要な原因の一つであり、成育医療分野では非常に重要な疾患であるが、リンパ性腫瘍は中でも最も頻度が高い。近年リンパ性腫瘍の治療成績は著しく向上しているが、一部に依然として治療抵抗性で再発を繰り返す亜群が存在し、分子標的療法などのより有効な治療法の開発が望まれている。逆に、治療反応例については、高い治療効果を維持しつつも、晩期障害の軽減と QOL 向上を目指した、治療の軽減が重要な課題となっている。その克服には、全ゲノム構造やエピゲノム異常、遺伝子・蛋白発現等の網羅的解析による包括的な分子異常解明を行って、難治性症例や治療反応例を事前に鑑別可能な層別化法の確立や、新規治療法の標的となる病因分子の探索が必須である。

そこで本研究では、小児白血病治療研究グループと連携し、主に、成熟 B リンパ腫、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病(ALL)、再発 ALL 等の難治性リンパ性腫瘍について、臨床検体に対する包括的・体系的な生体分子情報解析(オミックス)の手法を用いて、その臨床的特性に関する分子情報プロファイルを網羅的に明らかにし、得られた知見に基づいて培養細胞やモデル動物を用いた小児がんの発症・治療モデルを構築、解析して、層別化を含む新規診断法や、新規治療法開発を行い、臨床応用することを目的とする。

B. 研究方法

1. 小児がんの網羅的発現遺伝子解析：白血病細胞検体から total RNA を RNeasy Plus kit (Qiagen 社) で抽出し、各 50 ng を用いて WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NyGen 社) により cDNA を合成、増幅し、Biotin 標識した後、マイクロアレイ (Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) により網羅的遺伝子発現を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring (Agilent 社) を用いて解析した。
2. 小児 ALL のマーカー解析：骨髓液あるいは末梢血液について、FITC、PE、ECD、PC5.5、PC7、APC、APC-Alexa-700、APC-Alexa-750、Pacific-Blue、Krome-Orange (Cascade-Yellow) の 10 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる全血法の蛍光染色を行った。溶血後、Digital flow cytometry Galios (Beckman-Coulter 社) を用いて 3 レーザー10 カラー解析を行った。lineage 決定・病型診断に必要な項目に加え、様々な機能分子に対する抗体についても解析を行った。
3. 培養細胞株を用いた標的因子の機能解析：標的遺伝子の cDNA は RT-PCR により増幅し、クローニングした。培養細胞への遺伝子導入と発現誘導は、Retro-X Tet On/Off システム(pRetroX Tight および pRetro-X Tet on/off advanced)を用いて、テトラサイクリン依存性の発現誘導系をレトロウイルスベクターにより目的細胞に導入した。
(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。

C. 研究結果

1. 小児がんの網羅的発現遺伝子解析と標的因子候補の機能解析：T-ALL、再発 ALL を含む小児リンパ性腫瘍の臨床検体 77 件、ユーイング肉腫等の肉腫 26 例について、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行なった。現在、得られた結果を用いて分子特性プロファイリングを行なっており、各リンパ性腫瘍の亜群ごとに特徴的に発現する遺伝子を複数同定してその機能解析を進め、小児の小円形肉腫の遺伝子発現プロファイルに基づいた鑑別法開発に着手している。

上記解析により、成熟 B リンパ腫の中で、Burkit リンパ腫に特異的に発現するジンクフィンガー型蛋白をコードする遺伝子 ZNF385B を同定した。GeneChip 解析では、ZNF385B は Burkit リンパ腫のみに発現を認め、リンパ芽球性リンパ腫や、同じ成熟 B リンパ腫である瀰漫大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) には発現を認めなかった。種々の分化段階の B リンパ性腫瘍を含む細胞株について、RT-PCR で検討した結果、ZNF385B の Burkit リンパ腫特異的発現が確認された。

そこで、ZNF385B を発現していない DLBCL 由来細胞株 BJAB にテトラサイクリン依存性の発現誘導系を用いて同遺伝子を発現させ、細胞変化について解析した結果、ZNF385B の発現に伴ってアポトーシスの誘導が認められたことから、この分子が B 細胞の細胞死制御に関与することが判明した。診断、治療の標的因子としての臨床応用の可能性についてさらに解析中である。

2. ETP-ALL の分子特性解析：最近、海外では、T-ALL の一部に「CD8, CD1a 陰性、CD5 陰性 or 弱陽性で、幹細胞/骨髄系抗原陽性」といった T 前駆細胞に特徴的な抗原発現様式を示し、遺伝子発現プロファイルでも通常の T-ALL とは異なった特徴を示す亜群 ETP-ALL が存在し、極めて予後不良と考えられることから、治療の層別化が必要であるとして注目されている。そこで、本邦における T-ALL における ETP-ALL の発症の実態と、分子特性解析を行った。

過去にマーカー解析を行なった T-ALL 169

例のうち、検査項目が不十分だった 8 例を除外した 161 例について検討した結果、33 例 (20.5%) が ETP-ALL の基準を満たしており、海外の報告 (St. Jude+AIEOP の 12.6%) より高い頻度であることが明らかとなった。この中には、従来 Myeloid-NK/T と呼ばれてきた症例や、AML と診断された症例も含まれており、多様な集団である可能性が示唆された。現在、予後を含む臨床特性についてさらに検討中であり、検体が保存されている症例に関しては網羅的な発現遺伝子解析 (前項参照) により詳細な分子特性の解明に着手している。

3. マルチカラー FCM による小児白血病 MRD の検出：微小残存病変 (MRD) の検出が、小児 ALL の新たな予後層別化因子として期待されている。これまでに、先行研究において 10 カラー FCM を用いた白血病マーカー診断システムを構築してきたが、この測定系を応用した MRD 検出系の構築に着手した。

マルチカラー FCM では、同時に多数の項目について測定可能な利点がある反面、蛍光補正が複雑で難しくなる点や、同時に複数の抗体を反応させるため抗原と抗体の結合に立体的な競合が生じて抗原発現を正確に検出できない可能性等が懸念される。そこで、これらの問題点について考慮して検討を行い、表 1 に示す 2 種類の抗体パネルを決定した。

1	Pacific Blue	CD19	CD19
2	Krome Orange	CD45**	CD45**
3	FITC	CD4*	CD44
		CD16*	
4	PE	CD10	CD10
5	ECD	CD3*	
		CD13*	CD45RA
		CD14*	
6	PC5.5	CD38	CD38
7	PC-7	CD8*	CD3*
		CD33*	CD33*
		CD56*	CD56*
		CD235a*	CD235a*
8	APC	CD58	CD58
9	APC-Alexa-700	CD34	CD34
10	APC-Alexa750	CD20	CD20

表 1 MRD 検出用 10 カラー抗体パネル

このパネルでは、測定項目の中に、非腫瘍細胞を積極的に除外するための測定項目 (表中の*印) を複数設定することで、MRD 検出をより容易かつ正確に行なうとともに、MRD 細胞の検出のための検査項目と非腫瘍細胞除外のための検査項目を蛍光補正に問題が生じ難い組合せで配色してある。

実際に、このパネルを用いて、小児白血病患児の初発時および治療開始後の骨髄検査を

実施したところ、MRD 検出に有用であることが確認された。そこで、さらに症例数を増やして検討中であり、今後、MRD 検出結果と予後との相関や、PCR 法による MRD 検出結果との相関等、臨床応用を目指した検討を行う予定である。

D. 考察

1. 小児がんの網羅的発現遺伝子解析と標的因子候補の機能解析：これまでに、解析が遅れていた小児がんの病型について網羅的発現遺伝子解析を進めており、各リンパ性腫瘍の亜群ごとの特徴的な発現遺伝子様式や、小児の小円形肉腫の遺伝子発現様式の差が明らかになってきた。さらに解析を進めることによって、この中から、複数の病因標的因子が同定されることが期待される。今回の検討で、新たに同定された ZNF385B が B 細胞のアポトーシス制御に関与する分子であることが明らかになり、Burkit リンパ腫の診断・治療の標的因子としての可能性が期待され、現在、そのアポトーシス制御における機能の解析や、Burkit リンパ腫の病態における意義についての解析を進めている。

2. ETP-ALL の分子特性解析：ETP-ALL は、予後が極めて不良と考えられることから、海外では治療層別化の対象として注目されており、本邦においてもその実態について明らかにすることが急務である。今回の検討で、本邦においても、その基準に合致した症例が存在し、頻度としては欧米よりもやや高いことが明らかとなった。現在、その分子特性についてさらに詳細な解析を実施中であり、臨床特性についても検討を進めている。

3. マルチカラーFCM による小児白血病 MRD の検出：MRD の検出は、今後小児白血病の予後因子として重要性が増すと考えられており、本研究班の中でも、その様々な検出方法の検討と臨床応用に関する取り組みを行っている。FCM による MRD 検出は、迅速かつ低コストであることが大きな利点であり、情報量の多い 10 カラー解析で検出することによって、より正確な MRD 検出法が確立されることが期待される。

E. 結論

小児がん臨床検体の網羅的発現遺伝子解析を進め、各病型における発現遺伝子特性について多くの知見が得られた。特に、Burkit リンパ腫に特異的な発現遺伝子として

ZNF385B を同定し、その診断・治療の標的因子候補としての可能性についてさらに解析中である。本邦における ETP-ALL 発症の実態について明らかにし、その分子特性や臨床特性についてさらに検討中である。小児 ALL の新たな予後層別化因子として期待される MRD について、10 カラーFCM での細胞マーカーによる検出法を構築し、臨床検体を用いてその有用性についてさらに検討中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Onda K, Iijima K, Katagiri YU, Okita H, Saito M, Shimizu T, Kiyokawa N. Differential effects of BAFF on B cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. *Int J Hematol*. 2010 Jun;91(5):808-19.

2) Miyagawa Y, Okita H, Hiroshima M, Sakamoto R, Kobayashi M, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata JI, Umezawa A, Kiyokawa N. A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation. *Tissue Eng Part A*. 2010 Sep 6. [Epub ahead of print].

3) Kaneko T, Okita H, Nakajima H, Iijima K, Ogasawara N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Nakagawa A, Kiyokawa N, Sato T, Fujimoto J. Neuroblastoma cells can be classified according to distinctive glycosphingolipid expression profiles identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Oncol*. 2010 Nov;37(5):1279-88.

4) 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. *Cytometry Research* 2010 Sep;20 (2):27-34.

5) Ogasawara N, Katagiri YU, Kiyokawa N, Kaneko T, Sato B, Nakajima H, Miyagawa Y, Kushi Y, Ishida H, Kiso M, Okita H, Sato T, Fujimoto J. Accelerated biosynthesis of neolactoseries-glycosphingolipids in differentiated mouse embryonal carcinoma F9 cells detected by using dodecyl N-acetylglucosaminide as a saccharide primer. *J Biochem*. (in press).

6) Ohta H, Iwamoto S, Kiyokawa N, Tsurusawa M, Deguchi T, Takase K, Fujimoto J, Horibe K, Komada Y. Flow cytometric analysis of de novo acute myeloid leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol*. (in press).

7) Katagiri YU, Sato B, Yamatoya K, Taki T, Goto-Inoue N, Setou M, Okita H, Fujimoto J, Ito C, Toshimori K, Kiyokawa N. GalNAc β 1,3-linked paragloboside carries the epitope of a sperm maturation-related glycoprotein that is recognized by the monoclonal antibody MC121. *Biochem Biophys Res Commun*. (in press).

8) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J,

Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. BMC Dev Biol. (in press).

2. 学会発表

- 1) 恩田恵子, 玉一博之, 山田浩之, 齋藤洋平, 鈴木恭子, 藤村純也, 齋藤正博, 清水俊明, 清河信敬. 小児 B 細胞性腫瘍における BAFF 受容体の発現と BAFF の作用. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 盛岡, 4 月 23 日-25 日, 2010.
- 2) 朴明子, 加藤元博, 清河信敬, 滝田順子, 真田昌, 小川誠司, 林泰秀. 小児 T 細胞性急性リンパ性白血病における網羅的ゲノム解析. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 4 月 23-25 日, 2010.
- 3) 橋本互, 清河信敬. 小児造血器腫瘍のマルチカラー-FCM 分析. (シンポジウム) 第 20 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 26 日-27 日, 2010.
- 4) 清河信敬, 恩田恵子, 橋本互, 長谷川大輔, 飯島一智, 福島敬, 齋藤正博, 藤本純一郎, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 5 カラーおよび 10 カラーによる小児白血病のマーカー中央診断. 第 20 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 26 日-27 日, 2010.
- 5) 山田浩之, 清河信敬, 恩田恵子, 橋本互, 長谷川大輔, 飯島一智, 福島敬, 齋藤正博, 藤本純一郎, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 小児白血病における CD244 の発現. 第 20 回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京, 6 月 26 日-27 日, 2010.
- 6) 飯島一智, 藤本純一郎, 中川温子, 清河信敬. Analysis on molecules characteristically expressed in childhood mature B-cell lymphoma/leukemia. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日-24 日, 2010.
- 7) 清河信敬, 飯島一智. Differential effects of BAFF on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日-24 日, 2010.
- 8) 朴明子, 加藤元博, 清河信敬, 滝田順子, 小川誠司, 林泰秀. 小児 T 細胞性造血器腫瘍における LEF1 遺伝子の異常. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日~24 日, 2010.
- 9) 清河信敬, 恩田恵子, 橋本互, 長谷川大輔, 飯島一智, 福島敬, 齋藤正博, 藤本純一郎, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 小児白血病のマーカー中央診断に対する 10 カラーフローサイトメトリー解析の有用性. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.
- 10) 飯島一智, 恩田恵子, 中川温子, 藤本純一

郎, 清河信敬. 小児成熟 B 細胞性リンパ腫/白血病に特徴的に発現する遺伝子の解析. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.

11) 恩田恵子, 山田浩之, 齋藤正博, 飯島一智, 清河信敬. BAFF は B 前駆細胞性 ALL の増殖を亢進するがアポトーシスは抑制しない. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.

12) Park MJ, Kato M, Kiyokawa N, Takita J, Ogawa S, Hayashi Y. Mutations of LEF1 gene in pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.

13) Park MJ, Kiyokawa N, Kato M, Suzuki N, Oda M, Hara J, Kobayashi R, Horibe K, Ogawa S, Hayashi Y. LEF1 gene mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T cell non-hodgkin's lymphoma. The 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando, U.S.A., 12.4-7, 2010.

14) 飯島一智, 山田浩之, 中川温子, 藤本純一郎, 清河信敬. バーキットリンパ腫特異的分子の発現・機能解析. 第 52 回日本小児血液学会学術総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.

15) 清河信敬, 犬飼岳史, 高橋浩之, 康勝好, 杉田完爾, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 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中央診断における Early T-cell precursor ALL のマーカーの特徴. 第 52 回日本小児血液学会学術総会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.

16) 山田浩之, 清河信敬, 橋本互, 恩田恵子, 飯島一智, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明. MLL 関連キメラ遺伝子陽性小児急性白血病における MCSP 抗原発現. 第 52 回日本小児血液学会学術総会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.

17) 犬飼岳史, 清河信敬, 高橋浩之, 康勝好, 真部淳, 熊谷昌明, 小原明, Dario Campana, 杉田完爾. Early T-cell precursor ALL 同定のための汎用抗原を用いたスコアリング・システム. 第 52 回日本小児血液学会学術総会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.

G. 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

小児がんの分子病理所見に基づく悪性度の判定とその治療への応用

研究分担者 中澤 温子 (独)国立成育医療研究センター 病理診断部 部長

研究要旨： 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、免疫組織学的、分子病理学的解析を加えた病理診断による治療の層別化を実践した。さらに細胞増殖・分化に関わる分子の発現解析や染色体異常の検討を行い、従来の組織学的診断をさらに発展させた悪性度診断確立および p16 機能ペプチドを用いた分子標的療法の開発に向けた基礎的データを得た。

A. 研究目的

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

この課題を達成するためには、各小児がん疾患あるいは各症例の生物学的特性を分子レベルで明らかにしていくことが必要である。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・治療法開発を行う。特に、急速な進展や再発を繰り返す亜型の分子特性を明らかにし、QOL 改善を目標とした予後予知法確立や新規治療モデルの提示を目指す。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。さらに、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を確立する。

B. 研究方法

治療の層別化を効率的に行うために、中央病理診断システムにより、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および RT-PCR, FISH 法による分子病理学的解析をおこなった。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 (Blood 2003;101:1220-35)、Highly aggressive lymphomas は p16INK4a-cyclinD-CDK4-Rb、p14ARF-MDM2-p53-p21CIP1、p27KIP1-cyclin E-CDK2 といった G1 期制御機構の異常を背景にしていることが示された。p16INK4a-cyclinD-CDK4-Rb の異常を有する Anaplastic large cell lymphoma 細胞株を用いて Transporter peptide を用いた p16INK4a 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、p16INK4a ペプチドを添加し、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。p16INK4a 機能性ペプチド導入によるリン酸化 Rb 蛋白発現の変化をウェスタンブロット法にて、p16 非発現株 DEL と p16 発現株 Su-DHL1 を用いて比較検討した。Annexin V, 7AAD を用いた FCM によるアポトーシス解析、マウス xenograft (DEL 株) を用いた in vivo での p16INK4a ペプチド皮下注による腫瘍抑制効果についての検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。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. 小児がん中央病理診断システム (JPLSG, JRSG, JNBSG)：2010 年はリンパ腫として登録された症例 135 例、神経芽腫 66 例、横紋筋肉腫 33 例について中央病理診断を行った。従来の免疫組織学的染色に加えて FISH 法に

よる染色体転座・MYCN 遺伝子増幅の判定を表のごとく行い、鑑別診断、予後因子の検討に役立てた。神経芽腫の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。胞巣型横紋筋肉腫では、凍結組織が得られない場合にパラフィン切片を用いた FISH 法により、FKHR 転座の解析を行った。

鑑別診断のための FISH による染色体転座・遺伝子増幅の解析

病理組織分類	転座・増幅
悪性リンパ腫 Burkitt lymphoma Diffuse large B-cell lymphoma Anaplastic large cell lymphoma	c-myc BCL-2 ALK1
胞巣型横紋筋肉腫	FKHR MYCN 増幅
神経芽腫	MYCN 増幅
その他 滑膜肉腫 Infantile fibrosarcoma/ Congenital mesoblastic nephroma Myxoid liposarcoma	SYT ETV6 ETV6 CHOP

2. 細胞周期関連分子の発現と p16INK4a 細胞内分子標的療法の基礎的検討について：ALCL 細胞 2 株(DEL, Su-DHL1)における p16INK4a 機能性ペプチド導入後 72 時間の時点での増殖抑制率は 8 μ M でそれぞれ 76%、75%であった。同様の実験を健常者の末梢血単核球を用いて行ったが、ペプチド複合体導入は認められたが、細胞傷害効果はみられなかった。

p16INK4a 機能性ペプチド導入によるリン酸化 Rb 蛋白発現は、p16 非発現株 DEL では 8 μ M 導入 48 時間後で、70%、16 μ M 導入 48 時間後で 52%に低下した。p16 発現株 Su-DHL1 では、p16 ペプチド導入によるリン酸化 Rb 蛋白発現の変化は認められなかった。

Annexin V, 7AAD を用いた FCM によるアポトーシス解析では、Annexin V 陽性 7AAD 陰性の早期アポトーシス細胞は、p16INK4a 機能性ペプチド導入 24 時間後には、2.2%から 28.5%に増加した。

マウス xenograft(DEL 株)を用いた in vivo

での p16INK4a ペプチドの腫瘍抑制効果については、p16INK4a ペプチド皮下注 4 日後に腫瘍は 43%に縮小した(p=0.007)。

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、免疫組織化学染色、FISH による染色体転座の検索を合わせて、診断確定、治療の層別化を行うことができた。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。

パラフィン切片を用いた FISH 法による MYCN 遺伝子増幅や染色体転座の判定は概ね容易であり、凍結組織が得られない症例でもこれらの遺伝子の検索が可能であった。

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たており、今回このシステムを用いた p16INK4a 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 p16INK4a 機能性ペプチドの複合体の添加により、in vitro、in vivo ともに有意な増殖抑制効果が認められた。In vitro では、p16 非発現株だけでなく、p16 発現株においても増殖抑制がみられたが、リン酸化 Rb は p16 非発現株では p16INK4a 機能性ペプチド導入後に発現が減少したが、p16 発現株ではリン酸化 Rb の発現は変化がなかった。したがって p16 非発現株における増殖抑制は、p16INK4a 機能性ペプチド導入による 16INK4a-cyclinD-CDK4-Rb 経路の機能回復によるものと考えられたが、p16 非発現株における増殖抑制は cyclinD-CDK4-Rb 経路とは関係しないことが判明した。

E. 結論

難治性小児がん(リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫)の病理組織学的、免疫組織学的、分子病理的中央病理診断システムが確立し、診断確定、治療の層別化に有効に利用されている。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) Nakagawa A, Matsuoka K, Okita H, Iwafuchi H, Hori H, Kumagai M. Neuroblastoma with discordant genotype-phenotype relationship: Report of four cases with MYCN amplification and favorable histology. *Pediatr Devel Pathol* (in press).
- 2) Kasahara M, Sakamoto S, Shigeta T, Fukuda A, Kosaki R, Nakazawa A, Uemoto S, Noda M, Naiki Y, Horikawa R. Living-donor liver transplantation for carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency. *Pediatr Transplant*. 2010 Dec;14(8):1036-40.
- 3) Kaneko T, Okita H, Nakajima H, Iijima K, Ogasawara N, Miyagawa Y, Katagiri U Y, Nakagawa A, Kiyokawa N, Sato T, Fujimoto J. Neuroblastoma cells can be classified according to glycosphingolipid expression profiles identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Oncol*. 37(5):1279-88, 2010.
- 4) Fu Yong-Juan, Morota N, Nakagawa A, Takahashi H, Kakita A. Neurocutaneous melanosis: surgical pathological features of an apparently hamartomatous lesion in the amygdala. *J Neurosurg Pediatrics*. 6(1):82-6, 2010.
- 5) Nakahara K, Morota N, Ihara S, Oka H, Matsuoka K, Nakagawa A. Meningeal Melanocytoma Extruded From the Skull of a Neonate -Case Report-. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 50(3):240-242, 2010.
- 6) Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawa A, Kamijo T. Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene*. 29(18):2681-90, 2010.
- 7) Kobayashi R, Yamato K, Tanaka F, Takashima Y, Inada H, Kikuchi A, Kumagai MA, Sunami S, Nakagawa A, Fukano R, Fujita N, Mitsui T, Tsurusawa M, Mori T. Lymphoma Committee, Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Retrospective analysis of non-anaplastic peripheral T-cell lymphoma in pediatric patients in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 54(2):212-5, 2010.
- 8) 中澤温子. 小児白血病・リンパ腫の病理診断. *小児科臨床*. 73(8):1290-1294, 2010.
- 9) 中澤温子. 小児リンパ腫の病理. *日本小児血液学会誌*. 24(8):230-33, 2010.
- 10) 中澤温子. 未分化大細胞型リンパ腫 ALK 陽性と陰性. *病理と臨床*. 28(8): 828-832, 2010.
- 11) 中澤温子. Anaplastic lymphoma kinase (ALK). *病理と臨床*. 28(臨時増刊号): 326-327, 2010.
- 12) 杉本貴昭, 山中潤一, 麻野泰包, 中川温子, 藤本治朗. 生体肝移植後 6 年目に発症したパーキットリンパ腫の 1 例. *移植*. 45(1): 54-59, 2010.
- 13) 松岡健太郎, 坂田晃子, 大喜多肇, 中川温子. 増殖性筋膜炎の一例. *小児がん*. 47(1): 170, 2010.
- 14) 大喜多肇, 松岡健太郎, 坂田晃子, 中川温

子. *Mesenchymal hamartoma of the liver の一例*. *小児がん*. 47(1): 154, 2010.

15) 中澤温子. 小児悪性リンパ腫の分類・診断・予後因子. *血液診療エキスパート 悪性リンパ腫*. 243-252, 中外医学社. 2010.

16) 中川温子. 小児節性濾胞辺縁帯リンパ腫 小児濾胞性リンパ腫 原発性免疫不全に伴うリンパ増殖性疾患 「WHO 血液腫瘍分類 - WHO 分類 2008 をうまく活用するために-」. 351-352, 358-360, 530-533, 医薬ジャーナル社. 2010.

2. 学会発表

- 1) 中澤温子, 大喜多肇, 松岡健太郎. 慢性活動性 EB ウイルス感染症モデルマウスの病理組織学的検討. 第 99 回日本病理学会総会. 東京, 4月29日, 2010.
- 2) 中澤温子. 神経芽腫群腫瘍診断の実際. 第 2 回小児腫瘍セミナー (教育講演) 東京, 8月7日, 2010年.
- 3) Nakazawa A. Central Pathology Review System for Pediatric Cancers in Japan. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society. Workshop 9 「Current state and problem for childhood cancers in Asia」 Gifu, Japan, August 26, 2010.
- 4) 中澤温子. 小児リンパ腫の病理診断. 2010年日本病理学会小児組織分類委員会症例検討会 (教育講演) 大阪, 9月3日, 2010.
- 5) 中澤温子, 中野夏子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 今留謙一, 笠原群生. 小児生体肝移植後 EB ウイルス感染症. 第 30 回日本小児病理研究会. 9月4日, 大阪, 2010.
- 6) 中澤温子. 小児腫瘍の病理診断. 第 53 回神奈川小児腫瘍研究会 (特別講演). 横浜, 9月11日, 2010.
- 7) 中澤温子, 大島孝一, 北條洋, 松野吉宏, 田丸淳一, 藤本純一郎, 中村栄男, 中峯寛和, 吉野正, 森鉄也, 鶴澤正仁. Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma の臨床病理学的検討. 第 52 回日本小児血液学会総会. 大阪, 12月19日, 2011.
- 8) 中澤温子. 小児リンパ腫—中央病理診断からのメッセージ. 第 54 回東海小児血液懇話会 (特別講演). 名古屋, 2月1日, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

難治性小児リンパ系腫瘍の分子プロファイリングとその臨床応用

研究分担者 森 鉄也（独）国立成育医療研究センター 内科系専門診療部 血液腫瘍科医長

研究要旨： 全国規模の多施設共同治療研究である日本小児白血病リンパ腫研究グループ(Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group: JPLSG)リンパ腫登録例を対象として包括的な分子プロファイリング解析を行う。包括的な分子プロファイリング解析により得られた小児リンパ腫の生物学的特性と臨床研究により得られた小児リンパ腫の臨床情報を統合しデータベースを作成する。データベースの活用により、新たな予後因子の検出、治療標的の検出を行い、治療成績の向上に貢献することを目標とする。研究計画書を作成しJPLSGによる研究の承認を得るための対応を開始した。

研究協力者

鶴澤正仁（愛知医科大学医学部）

： JPLSG 運営委員会委員長

JPLSG BNHL-03 研究代表者

堀部敬三（国立名古屋医療センター）

： JPLSG 会長

ALCL99 研究代表者

角南勝介（成田赤十字病院）

： JPLSG LLB/ALB-03 研究代表者

菊地陽（帝京大学医学部）

： JPLSG リンパ腫委員

中澤温子（国立成育医療研究センター）

： JPLSG リンパ腫中央診断担当

大島孝一（久留米大学医学部）

： JPLSG リンパ腫中央診断担当

小川誠司（東京大学医学部）

： リンパ腫のゲノム構造解析

林泰秀（群馬県立小児医療センター）

： リンパ腫のゲノム構造解析

大喜多肇（国立成育医療研究センター）

： リンパ腫のエピゲノム解析

清河信敬（国立成育医療研究センター）

： リンパ腫の発現遺伝子解析

A. 研究目的

小児リンパ腫の治療成績は改善し、長期生存率は 80-90%に達している。一方で、治療抵抗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。小児リンパ腫に対する治療は多剤併用化学療法が標準的であり(ホジキンリンパ腫では放射線照射の併用)、既知の予後因子（病理組織型、病期、全身状

態、初期治療反応性など）に基づき、それぞれの患者のリスクに応じた治療が選択されている。

近年、分子レベルにおける病態解析に基づいた新しい病型概念(molecular Burkitt's lymphoma など)の提案、分子標的療法(rituximab など)の開発が進められている。小児リンパ腫においても包括的な分子プロファイリング解析により、新たな予後因子の検出、治療標的の検出が期待される。

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group: JPLSG)による小児リンパ腫に対する臨床研究登録例を対象として、包括的な分子プロファイリング解析を行う。包括的な分子プロファイリング解析により得られた小児リンパ腫の生物学的特性と、臨床研究により得られた小児リンパ腫の臨床情報を統合しデータベースを作成する。データベースの活用により、新たな予後因子の検出、治療標的の検出を行い、治療成績の向上に貢献することを目標とする。

B. 研究方法

下記の内容の研究計画書を作成した。

1. 対象： JPLSG リンパ腫臨床研究に登録された小児リンパ腫で、中央診断にリンパ腫標本が提出され、解析可能な余剰検体が保存されている症例(JPLSG リンパ腫臨床研究中央診断、および余剰検体の研究利用について、患者、あるいは代諾者から書面による同意が取得されている症例)を対象とする。
2. 試料： JPLSG リンパ腫中央診断施設に保