

保存されている解析可能な余剰検体(新鮮検体、パラフィン固定検体、細胞浮遊液検体など)。

3. 解析: JPLSG リンパ腫中央診断施設に保存されている解析可能な余剰検体の一部から、常法に従って核酸(DNA、RNA)等の解析試料を調整し、以下の解析を行う。解析終了後の余剰試料は、JPLSG 検体保存センターに保存する。

3-1. ゲノム構造解析: 東京大学(小川 誠司)において、ゲノム DNA 500ng を用いてマイクロアレイ(Affimetrix Human Mapping 250K Array)による網羅的ゲノム構造解析を実施する。DNA を特定の制限酵素で断片化して、蛍光標識した後、約 250,000 のゲノム遺伝子上の配列に相当する合成遺伝子配列が載っている GeneChip と反応させる。これらの合成遺伝子配列は、全ゲノム配列から一定間隔で抽出されたものであり、染色体を約 250,000 の区画に分割してそれぞれの断片のコピー数を定量できるように設計されている。反応後、結合しなかった余剰 DNA を洗浄して除去したのち、各合成遺伝子配列に対する被検遺伝子断片の結合を蛍光強度としてスキャナーで読み込む。得られた結果を国立成育医療研究センター(中澤 温子)に送付し、病理診断情報とリンクさせて一括管理する。専用開発されたアルゴリズム CNAG を用いた解析によってリンパ細胞に特徴的なゲノム構造異常について解析する。ゲノム構造の異常(微小な増幅や欠失)が同定された場合、PCR やシーケンシング、可能な場合には FISH により、異常の確認、詳細な異常部位の同定などの解析を行う。

3-2. エピゲノム解析: 国立成育医療研究センター(大喜多 肇)において、ゲノム DNA 1  $\mu$ g を用いてマイクロアレイ(Illumina Infinium beads array)による網羅的エピゲノム解析を実施する。1  $\mu$ g のゲノム DNA を bisulfite 処理し、450K Infinium Methylation BeadChip (Illumina)とハイブリダイズさせ、専用スキャナーでデータを取得する。450K Infinium Methylation BeadChip には 45000 箇所以上のメチル化部位由来のオリゴヌクレオチドが載せられており、メチル化アレルおよび非メチル化アレル由来の蛍光シグナル強度によりメチル化の割合が示される。得られた結

果を国立成育医療研究センター(中澤 温子)に送付し、病理診断情報とリンクさせて一括管理する。専用開発されたソフトウェアを用いた解析によってリンパ細胞に特徴的なエピゲノム異常について解析する。

3-3. 発現遺伝子解析: 国立成育医療研究センター(清河 信敬)において、RNA を用いて Affimetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array で発現遺伝子を網羅的に解析する。各 RNA 50ng から Ovation システム™により cDNA を合成、増幅し、蛍光標識した後、約 45,000 の遺伝子に対する合成遺伝子配列が搭載された GeneChip と反応させる。結合しなかった余剰 cRNA を洗浄して除去したのち、各合成遺伝子配列に対する被検遺伝子断片の結合を蛍光強度としてスキャナーで読み込み、得られた結果を国立成育医療研究センター(中澤 温子)に送付し、病理診断情報とリンクさせて一括管理する。専用開発されたソフト GeneSpring を用いた解析によって各病型のリンパ腫細胞の RNA 発現パターンを解析する。また、解析の進展に伴い、特にリンパ腫の病態との関連が推測される遺伝子群が同定された場合は、その遺伝子について RNA および cDNA の余剰分を用いてリアルタイム PCR による定量的な発現解析によって発現の確認を行う。

(倫理面への配慮)

JPLSG リンパ腫研究への登録者の中から、自由意思により中央診断に提出された余剰検体を研究利用することに同意した者のみを研究対象とする。本研究の対象である患者は未成年者であるため、担当医は代諾者からインフォームドコンセントを取得する。また、患者が研究登録の決定等の意志を表すことができる場合は、法的な資格のある代諾者からの同意の他、さらに未成年者である患者の意志を確認する。JPLSG リンパ腫研究登録者には JPLSG データセンターから登録番号が付与される。対象患者から採取された検体、臨床情報を示すフローシートには登録番号のみが添付される。したがって、本研究の担当者・関係者が対象患者の個人情報を知り得る機会はない。検体提供患者の診療施設において、JPLSG リンパ腫研究の倫理審査が行われ、承認されていることを必須とする。本研究の遺

伝子解析の結果は、現時点で対象患者の治療を変更するための明確な根拠にはなり得ず、対象患者の治療に介入するものではない。したがって本研究が対象患者の治療に危険を及ぼすことはない。

### C. 研究結果

1. 施設審査委員会による研究の承認：国立成育医療研究センターなどの施設審査委員会による本研究計画書の承認を得る。
2. JPLSG による研究の承認：本研究は JPLSG リンパ腫研究登録者を対象とすることから、JPLSG による研究の承認が必要である。JPLSG リンパ腫委員会、JPLSG 研究審査委員会、JPLSG 運営委員会などによる承認を得る。
3. 研究の開始：上記の手続きが整い次第、JPLSG 中央診断施設から検体を収集し、研究を開始する。

### D. 考察

今回の研究の実施によって、本邦における全国統一的な小児リンパ腫の網羅的体系的な分子情報解析を、組織的・包括的に推進する体制が整うとともに、その成果を応用した、診断・治療開発の推進が期待される。

### E. 結論

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た、包括

的な分子プロファイリング解析情報と、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たデータベース構築を目指した研究を開始した。これは、本邦における小児腫瘍の全国規模の組織的・包括的な分子情報解析の先駆けであり、その成果を応用した、診断・治療開発の推進が期待される。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

#### 2. 学会発表

なし

### 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

大喜多 肇（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 室長

研究要旨： 小児の腎腫瘍である腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍の網羅的なメチル化解析を行った。腎明細胞肉腫は、ほとんどゲノム異常の分かっていない腫瘍であるが、多数の CpG サイトが高メチル化を示すことが判明した。腎横紋筋肉腫様腫瘍では、プロトカドヘリンをはじめとする複数の遺伝子群が高メチル化を受けていることが判明し、少なくともその一部ではメチル化と遺伝子発現が相関していた。今後、これらの遺伝子の腫瘍発生・進展に関わる役割を解析する。

### A. 研究目的

小児期には成人期とは異なった特異な腫瘍が発生する。特に胎児性腫瘍と呼ばれる発生期の臓器形成を模倣する形態を示す腫瘍が好発することと、成人期に多い上皮性腫瘍と異なり、血液系腫瘍や肉腫が多いことがあげられる。小児期の腫瘍は、成長期というバックグラウンドを背景に、成人腫瘍とは異なった機序で発生するものが多いと考えられている。

小児期に好発する腎腫瘍として腎芽腫とともに腎明細胞肉腫や腎横紋筋肉腫様腫瘍が知られている。腎芽腫や腎明細胞肉腫の治療成績は近年向上しているが、腎横紋筋肉腫様腫瘍の成績は、未だに極めて不良であり（治癒率は 20 % 以下）、その治療法開発は急務である。腎明細胞肉腫の遺伝子異常は、一部に染色体転座があるとの報告がなされているものの、ほとんど知られていない。一方、腎横紋筋肉腫様腫瘍の大部分では、22 番染色体上の SMARCB1 遺伝子の欠失/変異による不活性化がみられ、その腫瘍発生に対する関与が想定されている。SMARCB1 遺伝子産物は、クロマチン再構成因子の一つであり、その欠失によるクロマチン構造変化に伴って p16 の遺伝子発現がエピジェネティックに抑制されることがその一つと考えられている。

本研究では、これらの腫瘍の分子遺伝学的背景を明らかとし、診断・治療の標的となりうる分子群を解明することを目的とした。特に、腎明細胞性腫瘍や腎横紋筋肉腫様腫瘍の網羅的なメチル化解析によりエピジェネティクス異常を明らかにし、その腫瘍発生に関わる意義を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍 3 例ずつと対照として非腫瘍部腎組織を用いた。組織より常法に従って DNA を抽出した。EpiTect Bisulfite kit(QIAGEN)で DNA をバイサルファイト変換し、Illumina, Infinium DNA メチル化アッセイ(HumanMethylation27 BeadChip)を用いて主に遺伝子プロモーター領域に存在する CpG サイトのメチル化状態を解析した。本アッセイでは、27,578 箇所(約 14,000 以上の遺伝子)の CpG サイトを 1 塩基の解像度で解析できる。各 CpG 部位のメチル化の程度は、メチル化検出用のプローブと非メチル化プローブの蛍光強度の比率 ( $\beta$ -value、0-1 の値で示される)によって表され、0 は全くメチル化されていない状態、1 は完全にメチル化されている状態である。全てのメチル化部位(プローブ)のデータ (27,578 箇所)のうちプローブの信頼度を示す p 値が 0.05 未満のプローブを選択し、かつ、各組織内での標準偏差が 0.2 未満のプローブを選択し、その後の解析に用いた。各腫瘍型と非腫瘍部腎組織との  $\beta$  値の差が 0.3 以上の遺伝子を選択し、H-InvDB 遺伝子リスト特徴抽出ツールを用いてデータマイニングを行った。過メチル化を示した遺伝子の一部についてはリアルタイム PCR 法にて遺伝子発現を解析した。

(倫理面への配慮)

腫瘍検体使用に当たっては倫理委員会に申請して承認を得た。腫瘍検体は同意取得した上、匿名化したものを用いた。

### C. 研究結果

腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍、非腫

瘍部腎組織の網羅的メチル化解析を Infinium DNA メチル化アッセイを用いて行った。全プローブを用いた階層的クラスタリングでは、腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍、非腫瘍腎組織がそれぞれクラスターを形成し、それぞれの腫瘍に特徴的なメチル化パターンの存在が示唆された。非腫瘍部腎組織と比較して、 $\beta$ 値が 0.3 以上高い CpG サイトを高メチル化、0.3 以上低いサイトを低メチル化と定義したところ、CCSK では、全プローブの 5.1 % が高メチル化、1.1 % が低メチル化であった。一方、RTK では、3.0 % が高メチル化、2.3 % が低メチル化であった。

全てのメチル化部位(プローブ)のデータ 27,578 箇所のうち、プローブの信頼度を示す p 値が 0.05 未満かつ、各組織型内での標準偏差が 0.2 未満のプローブは、23,700 箇所であった。各組織型で  $\beta$  値が 0.3 以上大きい高メチル化遺伝子と 0.3 以上小さい低メチル化遺伝子に関して、H-InvDB 遺伝子リスト特徴抽出ツールを用いて、染色体領域等のアノテーションに特徴的に遺伝子リストの中に平均より有意に高い頻度で出現する項目を抽出した。

その結果、腎横紋筋肉腫様腫瘍では、染色体 5q31.3 領域や 16q13 領域に高メチル化を示すプローブが高頻度に出現していた。5q31.3 領域で高メチル化を示す遺伝子領域には、プロトコドヘリン遺伝子ファミリーがクラスターを形成しており、その一部は腫瘍で低発現であることを確認した。16q13 領域にはメタロチオネインをコードする遺伝子が複数、存在した。一方で腎横紋筋肉腫様腫瘍に特徴的に低メチル化を示す領域として、染色体 22q22 領域や染色体 11q21.3 があり、それぞれ、ケラチン関連タンパク質、small proline-rich protein のファミリーが存在していた。遺伝子オントロジー解析では膜や細胞外領域に関連する遺伝子に、遺伝子ファミリー解析ではカドヘリンあるいはプロトコドヘリン遺伝子群に、臓器との関連では、腎・膀胱に特異的に発現する分子に、高メチル化を示すプローブが高頻度に出現していた。

さらに、既に癌に関連して過剰なメチル化が報告されている遺伝子である ALX4 や MSX1 では、腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫ともに高メチル化が観察された。

#### D. 考察

腎横紋筋肉腫様腫瘍では、SMARCB1 遺伝子の欠失・変異による不活性化が知られてい

る。その結果、クロマチン構造の変換を介してエピジェネティックな変異が誘導される可能性がある。この異常による腫瘍発生に p16 が関与しているとの報告はなされているが、その全容は明らかではない。クロマチン構造変換を通じてメチル化異常が生じている可能性もあり、今後、その関連を解析する計画である。

小児の腎芽腫では、プロトコドヘリン遺伝子群の遺伝子がサイレンシングを受けているという報告が既になされているが、腎横紋筋肉腫様腫瘍においても同様にプロトコドヘリン遺伝子群の多くに高メチル化が観察され、少なくとも一部では腫瘍において発現が低下していた。腎芽腫と腎横紋筋肉腫様腫瘍で共通したエピゲノム異常の可能性もあり、本遺伝子群が腎横紋筋肉腫様腫瘍においても腎芽腫同様にサイレンシングを受けているかどうか、また、本遺伝子群のサイレンシングが腎横紋筋肉腫様腫瘍発生に果たす役割を今後、検討していく。

腎明細胞肉腫は、遺伝子異常がほとんど明らかになっていない腫瘍である。腎横紋筋肉腫様腫瘍と比較しても CpG island の高メチル化が多く認められ、腫瘍発生にエピジェネティックな異常が大きく関与している可能性もあり、今後、発現解析も合わせて腫瘍発生機序を明らかにする計画である。

全プローブを用いたクラスター解析で各腫瘍組織型はクラスターを形成したが、遺伝子発現解析と比較するとクラスター形成は弱い傾向にあり、現時点ではメチル化パターンによって腫瘍組織型を決定することは困難である。しかしながら、解析する腫瘍種を増やし、適切なプローブのセットを選択することにより、腫瘍特異的なメチル化パターンを明らかにすることが可能と考えられた。

#### E. 結論

小児の腎腫瘍である腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍の網羅的なメチル化解析を行った。腎明細胞肉腫は、ほとんどゲノム異常の分かっていない腫瘍であるが、高メチル化が多数みられることが判明した。腎横紋筋肉腫様腫瘍では、複数の遺伝子群が高メチル化を受けていることが判明し、その一部では発現と相関していた。今後、これらの遺伝子の腫瘍発生・進展に関わる役割を解析する。

#### 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, Hiroyama 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.* 2011 Feb;17(3-4):513-21.
- 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) 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.* 2010 (in press).
- 4) 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.

## 2. 学会発表

- 1) 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.

- 2) 春田雅之, 新井康仁, 笠井文生, 大喜多肇, 秦順一, 福澤正洋, 金子安比古. ウィルムス腫瘍において未知原因遺伝子をコードする染色体領域の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月22日~24日, 2010.
- 3) 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, 大喜多肇, 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.
- 4) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 金兼弘和, 大喜多肇, 藤本純一郎, 陳玉彦, 真田昌, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 小児固形腫瘍における ALK 遺伝子の解析. 第 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.

## 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

研究分担者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨： 近年の分子遺伝学の進歩による小児がん発症と進展の分子メカニズムの解明は、新規治療薬剤の開発につながる。昨年度まで小児の急性骨髄性白血病(AML)の AML99 プロトコールにおける遺伝子を解析し予後との関係を明らかにしてきた。今年度は小児白血病と骨髄異形成症候群(MDS)における CBL 遺伝子と臨床像の関係を検討した。MDS のうち、若年性骨髄単球性白血病(JMML)40 例の検討では、CBL 遺伝子変異は 3 例(7.5%)にみられ、年齢はいずれも 6 ヶ月未満で、PTPN11 や RAS 遺伝子の変異はみられなかった。検索した慢性骨髄単球性白血病(CMML)の 1 例で変異がみられた。AML 81 例の検討では、急性巨核芽球性白血病(AMKL)の 1 例(1.2%)にのみ変異がみられた。治療関連白血病 20 例では MLL 再構成のある 1 例に変異がみられ、乳児白血病 20 例中 MLL 再構成のある 1 例に変異がみられた。これらのことより白血病発症における MLL と CBL の共同作用が示唆された。ALL 28 例では変異はみられなかった。CBL 遺伝子は小児白血病と MDS の一部で変異がみられ、これらの発症・進展に関与するものと思われた。

### A. 研究目的

近年、小児急性骨髄性白血病(AML)はチロシンキナーゼに関連する遺伝子の活性化変異と予後との関連が報告されている。我々はこれまで小児 AML 共同治療研究会で行われた AML99 プロトコールにより治療された 138 症例の遺伝子異常(*FLT3*, *KIT*, *MLL*, *RAS*, *NPM1*, *CEBPA*, *WT1* 遺伝子)と予後との相関を明らかにしてきた。近年、成人の AML と骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome)で CBL 遺伝子変異が高頻度に見られることが報告された。今年度は小児白血病と MDS の CBL 遺伝子の変異解析を行ない、臨床像との関係を検討した。

### B. 研究方法

CBL 遺伝子はチロシンキナーゼの働きを調節するユビキチンリガーゼをコードしており、通常は癌抑制遺伝子と考えられている。CBL 遺伝子の変異の解析は、AML 81 例、MDS 24 例、若年性骨髄単球性白血病(JMML) 40 例、慢性骨髄単球性白血病(CMML) 1 例、急性リンパ性白血病(ALL) 28 例、治療関連白血病 20 例、乳児白血病 20 例の計 214 例について DNA または RNA を抽出し、これまで変異の報告のある CBL 遺伝子の exon7-9 (linker/RING finger domain) について、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法または DNA-PCR 法と直接塩基決定法にて変異の有無を検討し、臨床像との相関について検討した。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

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た。MDS のうち、JMML 40 例の検討では、CBL 遺伝子変異は 3 例(7.5%) にみられ、いずれも 11 番長腕-acquired uniparental disomy (11q-aUPD)がみられ、年齢は 6 ヶ月未満で、PTPN11 や RAS 遺伝子の変異はみられなかった。AML 81 例の検討では、急性巨核芽球性白血病(AMKL) 1 例(1.2%)にのみ変異がみられた。検索した CMML 1 例で変異がみられた。治療関連白血病 20 例では MLL 再構成のある 1 例に変異がみられ、乳児白血病では 20 例中 MLL 再構成のある 1 例に変異がみられ、MLL と CBL の共同作用が示唆された。小児 ALL 28 例では変異はみられなかった。

### D. 考察

近年 CBL 遺伝子の変異が成人の MDS と骨髄増殖症(MPD)で高頻度であると報告された。特に CMML では高頻度と報告され、これと病型が似ている小児の JMML 40 例で検討を行ったところ、CBL 遺伝子変異と 11q-aUPD は 3 例にみられたが、この 3 例には JMML でこれまで報

告されている *PTPN11* や *RAS* 遺伝子の変異はみられず、*CBL* 遺伝子は *JMML* の原因遺伝子の 1 つであると思われた。これらの 3 例の年齢は 2 例が 2 ヶ月、1 例が 3 ヶ月で、1 例が移植の副作用で 32 ヶ月で死亡したが残り 2 例は 12 ヶ月と 68 ヶ月無病生存中であり、*CBL* 変異例は予後良好であることが示唆され、欧米の報告と一致している。欧米では *CBL* 遺伝子の胚細胞変異が報告されているが、正常細胞が入取できなかったため、今回は検討できなかった。AML 81 例の検討では、*AMKL* の 1 例(1.2%)にのみ変異がみられ、*AMKL* は *MDS* から進展することが多く興味深い。検索した *CMML1* 例で変異がみられ、成人でも高頻度とされており、一致する結果と思われた。治療関連白血病 20 例では *MLL* 再構成のある 1 例に変異がみられ、乳児白血病 20 例中 *MLL* 再構成のある 1 例に変異がみられた。これまで *MLL-CBL* 融合遺伝子が報告されており、白血病発症に *MLL* と *CBL* の共同作用が示唆された。*ALL* 28 例では変異はみられなかった。

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る。現在 AML-05 プロトコール 350 症例の解析を準備している。

## E. 結論

小児白血病と *MDS* で *CBL* 遺伝子変異を検討し、臨床像との相関を明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of *ALK* in neuroblastoma. 2011 Feb;102(2):302-8.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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.

10) 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.

11) 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.

### 2. 学会発表

1) Takita J, Nishimura R, Sanada M, Ohki K, Motohiro K, Chen YY, Kanegane H, Okita H, Fujimoto J, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. *ALK* gene aberrations in pediatric solid tumors. 第 6 回小児研究アジア学会, 台北, 4.15, 2010.

2) Nishimura R, Takita J, Ohki K, Kato M, Chen YY, Sanada M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. High resolution copy number analysis of Ewing sarcoma family of tumors using high-density SNP-genotyping microarrays. 第 6 回小児研究アジア

- 学会, 台北, 4.15, 2010.
- 3) 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.
- 4) 柴徳生, 加藤元博, 朴明子, 真田昌, 金澤崇, 黒澤秀光, 伊藤悦朗, 荒川浩一, 小川誠司, 林泰秀. 若年性骨髄単球性白血病における CBL 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.
- 5) 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.
- 6) 外松学, 佐野弘純, 朴明子, 山田佳之, 加藤政彦, 林泰秀. 当科にて経験した血球貧食症候群 12 例の臨床的検討. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 4 月 23-25 日, 2010.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 佐野弘純, 塩澤裕介, 朴明子, 金澤崇, 外松学, 林泰秀. 維持療法中にサイトメガロウイルス網膜炎を発症した急性リンパ性白血病の 1 例. 第 21 回群馬小児がん研究会, 前橋, 8 月 20 日, 2010.
- 12) 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.
- 13) 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 内坂直樹, 安達正時, 真田昌, 加藤啓輔, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司. 胸膜芽腫における網羅的ゲノム解析. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日~24 日, 2010.
- 14) 滝田順子, 西村力, 大木健太郎, 樋渡光輝, 大久保淳, 内坂直樹, 真田昌, 大喜多肇, 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Matsubara A, Kato M, Sanada M, Takita J, Chiba S, Hayashi Y, Kobayashi Y, Watanabe T, Yoshino T, Koefler JP, Bartram CR, Ogawa S. Genome-wide analysis using high-density SNP microarrays in various types of hematologic malignancies. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.
- 23) 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.
- 24) Toki T, Kanazaki 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.
- 25) 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.
- 26) Ogawa C, Ohra A, Manabe A, Makimoto A, Koh K, Isoyama K, Sugita K, Sugita K, Noguchi Y, Oota S, Maeda M, Yabe H, Kaneko T, Kumagai M, Kajiwara M, Takahashi H, Kikuchi A, Shimada H, Sotomatsu M, Fukushima T, Saito M, Hayashi Y, Hanada R, Tsuchida M. Adverse effects (AEs) of L-asparaginase (L-asp) in the induction therapy in TCCSG ALL L07-1602 study. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.
- 27) 朴明子, 林泰秀. T-ALL の分子生物学特徴について. 2010 年東京小児がん研究グループ (TCCSG) 秋季セミナー, 渋川, 10 月 16 日-17 日, 2010.
- 28) 朴明子, 外松学, 林泰秀. 肝機能障害を伴う TAM の臨床像について. 第 114 回小児血液腫瘍懇話会, 東京, 10 月 29 日, 2010.
- 29) 柴徳生, 朴明子, 林泰秀. 小児急性白血病と骨髄異形成症候群における CBL 遺伝子の解析. 第 114 回小児血液腫瘍懇話会, 東京, 10 月 29 日, 2010.
- 30) Park MJ, Kiyokawa N, Kato M, Suzuki N, Oda M, Hara J, Kobayashi R, Horibe K, Ogawa S, Hayashi Y. LZF1 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.
- 31) Muramatsu H, Hayashi Y, Kawamura M, Kojima S, Yabe M, Isoyama K, Taki T, Tsuji K, Tsuchida M, Manabe A, Ito E, Iwamoto S, Kato H, Sumie A, Taga T, Nomura K, Hasegawa D, Watanabe K, Kikuchi A. Low-dose cytosine arabinoside therapy for neonates with down syndrome (DS) and transient leukemia (TL). The 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando, U.S.A., 12.4-7, 2010.
- 32) 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.
- 33) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 金兼弘和, 大喜多肇, 藤本純一郎, 陳玉彦, 真田昌, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 小児固形腫瘍における ALK 遺伝子の解析. 第 52 回日本小児血液学会学術集会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 34) 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 内坂直樹, 安達正時, 真田昌, 加藤啓輔, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆. 高密度 SNP アレイを用いた胸膜肺芽腫における網羅的ゲノム解析. 第 52 回日本小児血液学会学術集会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 35) 村松秀城, 菊地陽, 林泰秀, 川村眞智子, 小島勢二, 矢部みはる, 磯山恵一, 滝智彦, 辻浩一郎, 土田昌宏, 真部淳. ダウン症候群に合併した一過性骨髄異常増殖症 148 例の後方視的解析. 第 52 回日本小児血液学会学術集会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 36) 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集会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 37) 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集会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 38) 吉田健一, 滝田順子, 西村力, 安達正時, 大木健太郎, 大久保淳, 永田安伸, 真田昌, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司. 次世代シーケンサーを用いたエクソシーケンシングによる神経芽腫の標的分子の解析. 第 52 回日本小児血液学会学術集会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 39) 塩澤裕介, 田淵健, 林泰秀. 進行神経芽腫治療における手術の役割: システムティックレビューとメタアナリシス. 第 52 回日本小児血液学会学術集会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 40) 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集会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 41) 安達正時, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力, 大木健太郎, 大久保淳, 内坂直樹, 真田昌, 小川誠司, 林泰秀, 五十嵐隆. 小児固形腫瘍における NOTCH シグナルの検討: 発現様式と遺伝子変異の解析. 第 52 回日本小児血液学会学術集会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.
- 42) 大木健太郎, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力, 大久保淳, 安達正時, 真田昌, 外松学, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆. 小児悪性腫瘍における Isocitrate dehydrogenase 1/2 の変異解析. 第 52 回日本小児血液学会学術集会・第 26 回日本小

児がん学会学術集会, 大阪, 12月17日-19日, 2010.

43) 康勝好, 小原明, 小川千登世, 加藤元博, 清河信敬, 福島敬, 嶋田博之, 高橋浩之, 梶原道子, 菊地陽, 真部淳, 熊谷昌明, 生田孝一郎, 花田良二, 林泰秀, 土田昌宏. 小児急性リンパ性白血病中間危険群に対する早期強化療法としての大量 cytarabine 療法の意義: TCCSG L99-15 研究. 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.

44) 朴明子, 清河信敬, 加藤元博, 鈴木信寛, 小田慈, 原純一, 小林良二, 小川誠司, 堀部敏三, 林泰秀. T 細胞性急性リンパ性白血病における LEF1 遺伝子異常の解析. 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.

45) 滝田順子, 安達正時, 西村力, 吉田健一, 小川誠司, 林泰秀. 次世代シーケンサーによる神経芽腫におけるエクソーム解析. 第 6 回 JNBSG 研究会, 東京, 1月30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

分担研究者 鶴澤 正仁 愛知医科大学医学部小児科 教授

研究要旨： 小児の急性リンパ性白血病(ALL)を代表とするリンパ系腫瘍の再発・難治例の生命予後は 50%以下と極めて不良である。この再発・難治例における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微小残存病変(MRD)量と関連が深い。従って、腫瘍のクロナリテイの変化の有無とサルベージ治療に対する反応、およびサルベージ治療後の MRD 量と予後の関連を明らかにすることは、難治・再発症例に対する有効な治療法開発のために極めて重要である。

この目的のために本研究では小児再発 ALL およびリンパ腫患者を対象として、初発時と再発時における腫瘍細胞のクロナリテイの解析、およびサルベージ治療後の骨髄 MRD 量を Ig/TCR 遺伝子再構成を利用した RQ-PCR による「分子 MRD 法」で定量的に測定し、治療反応性や再発予後との関連を明らかにする。

### 研究協力者

堀 壽成

愛知医科大学医学部 小児科 講師

### A. 研究目的

本研究の最終目的は、わが国の再発・難治性小児造血器腫瘍、特にリンパ系腫瘍に対して新たな治療計画を開発することにある。この目的のために治療前に再発難治性リンパ系腫瘍細胞の免疫関連遺伝子再構成を指標としたモノクロナリテイ検索を実施し、サルベージ治療に対する反応、およびサルベージ治療後の MRD 量と再発予後の関連を明らかにする。

### B. 研究方法

1. MRD ターゲットの検出：これまでに我々は MRD ターゲットの検出に用いてきた Ig $\kappa$ 鎖、IgH鎖、TCR $\gamma$ 鎖、TCR $\delta$ 鎖、TCR $\beta$ 鎖に加え、新たに IgH鎖における DH-JH、さらに SIL-TAL の遺伝子再構成の検出を行った。具体的には小児 ALL 初発・再発症例を対象として、それぞれの遺伝子上に設定された複数のプライマー（V $\beta$  family primers 23種類、D $\beta$  primer 2種類、J $\beta$  primer: J $\beta$  1 6種類、J $\beta$  2 7種類、DH family primers 7種類、JH primer 1種類、sil-db, tal-db primer 各1種類）を用いて、V $\beta$ -J $\beta$ 、D $\beta$ -J $\beta$ 、DH-JH、SIL-TAL の再構成のスクリーニング PCR を施行、heteroduplex analysis を施行してクロナリテイを確認し、得られた PCR 産物についてその塩基配列を解析した。

2. MRD 定量：これまでに我々は従来の半定量的な nestedPCR 法に代り、より定量的な Taqman-probe 法による RQ-PCR を導入し、ALL 症例を対象として MRD 定量を施行、その結果に関するオランダのエラスムスMC免疫学教室の評価に基づいて、定量法を改良して追加症例の定量を行った。その結果 2010年に総合的な定量精度に関して欧州の ALL-MRD 専門研究機関（ESG-ALL-MRD）への参加条件を満たし、同委員会への正式参加を承認された（アジアではシンガポールに次いで2番目、国内では初めての MRD 測定認可施設）。本研究ではこのように国際的に標準化された MRD 検出法を用いて MRD 測定を実施した。

（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. 対象：解析対象は 39 例で内訳は初発 ALL 20 例、再発 ALL 16 例、リンパ腫 1 例、その他 2 例である。年齢は 1-9 歳が 26 例、10-15 歳が 10 例、16 歳以上が 3 例である。

2. MRD ターゲット：MRD スクリーニングが既に終了した 22 例中 MRD ターゲット(再構成)検出成功例は 21 例(95%)で 1 例が検出不能であった。再構成部位は IgH 15 例(71%)、Ig $\kappa$  8 例(38%)、TCR $\delta$  7 例(33%)、

TCR $\gamma$  10 例(48%)、TCR $\beta$  5 例(24%)で、検出可能な MRD ターゲット数(再構成部位)は3 個以上が 9 例、2 個が 8 例、1 個が 4 例であった。再発例は検体(DNA)不足の 2 例を除いた全例で検出可能であり、その部位は骨髄(BM)再発 9 例、中枢神経(CNS)単独再発 2 例、精巣単独再発 1 例で、精巣の組織検体や髄液からの MRD ターゲット検出にも成功した。

#### D. 考察

今回我々は小児再発 ALL を対象として RQ-PCR 法による MRD 定量を実施した。その結果、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。また精巣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。

#### E. 結論

本年度われわれは、免疫受容体遺伝子再構成を用いた微小残存病変定量において、その検出率向上のため TCR $\beta$  鎖、IgH 鎖 DH-JH、SIL-TAL 遺伝子再構成の検出を可能にした。また RQ-PCR による MRD 定量については、その精度が必要な水準に到達したことを BFM グループによって承認され、ESG-MRD-ALL への正式参加を達成した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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]

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

#### 2. 学会発表

1) 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.

#### 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

研究分担者 小川 誠司 東京大学医学部附属病院 キャンサーボード 特任准教授

研究要旨： *IDH1* および *IDH2* 遺伝子は、クエン酸回路に関わる酵素で、イソクエン酸から  $\alpha$ -ketoglutarate への変換を司る。近年、成人の神経膠芽腫や急性骨髄性白血病(AML)において *IDH1/2* の高頻度な変異が報告されたが、小児悪性腫瘍における *IDH1/2* の関与は明らかではない。そこで、AML や神経芽腫など代表的な小児悪性腫瘍 618 検体につき *IDH1/2* の変異解析を行った。その結果、造血器腫瘍では、AML の新鮮腫瘍 1 症例で *IDH2* の R140Q 変異が認められた。固形腫瘍では、*IDH1* の変異を計 3 検体(神経芽腫の 2 例、Ewing 肉腫 1 例)に、また *IDH2* の変異を計 4 検体(神経芽腫 1 例、Ewing 肉腫 1 例、横紋筋肉腫細胞株 1 株および神経膠腫細胞株 1 株)に検出した。固形腫瘍で検出された変異は全てこれまでに報告のないものであり、神経芽腫でみられた *IDH1* の frameshift mutation である D143X は germlin 変異であることが確認された。以上の結果より、小児悪性腫瘍における *IDH1/2* の変異は成人の造血器腫瘍や脳腫瘍に比べて頻度が少ないものの、一部の腫瘍の発症・進展に関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

*IDH1*, *IDH2* がコードするイソクエン酸デヒドロゲナーゼは、脳内における NADP<sup>+</sup> から NADPH への還元を触媒する。WHO グレード II または III の神経膠腫 445 個のうち、70%でこれら 2 つの遺伝子のいずれか一方が変異していることが明らかになった。これらの変異により、*IDH1* と *IDH2* 蛋白の酵素活性が低下もしくは失われることが腫瘍の発症に関与すると推定されている。また最近、成人の急性骨髄性白血病(AML)や骨髄異形成症候群(MDS)においても高率に *IDH1*, *IDH2* の変異が報告され、予後と相関することが明らかとなった。一方、小児悪性腫瘍における *IDH1*, *IDH2* の関与に関しては不明である。そこで、小児悪性腫瘍の発症・進展における *IDH1*, *IDH2* の関与を明らかにするために代表的な小児悪性腫瘍である、白血病、神経芽腫、横紋筋肉腫、Ewing 肉腫、脳腫瘍、肝芽腫、ラブドイド腫瘍における *IDH1/2* の変異解析ならびに変異蛋白の機能解析を行った。

### B. 研究方法

材料としては、小児造血器腫瘍として AML、MDS、若年性骨髄単球性白血病、慢性骨髄性白血病の計 199 検体、小児固形腫瘍として神経芽腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、Ewing/PNET 腫瘍、悪性ラブドイド腫瘍、脳

腫瘍の計 419 検体を用いた。

1. *IDH1*, *IDH2* の変異解析：腫瘍検体より DNA を抽出し、*IDH1*, *IDH2* の coding region に関して、dHPLC 法を用いて変異のスクリーニングを行い、直接変異解析法を行って変異の確認を行った。変異が検出された新鮮腫瘍に関しては、germline 変異であるか否かを検討するために正常組織より DNA を抽出し、解析を行った。また造血器腫瘍に関しては、*IDH1/2* 変異との関連性を明らかにするために、*FLT3*, *c-KIT*, *NPM1* の変異解析も行った。
2. 酵素活性の測定：Ewing 肉腫検体で検出された activation site の近傍の *IDH2* 142 変異に関して、発現ベクターを構築して、酵素活性を測定した。正常検体より増幅した *IDH2* cDNA を用いて mutagenesis kit により I142L を導入した。これを pcDNA3 ベクターに挿入し、293T 細胞に transfection し、isocitrate から  $\alpha$ -ketoglutarate( $\alpha$ KT)への変換効率を測定した。さらに変異蛋白の機能獲得型の性状も解析するために  $\alpha$ KT から 2HG への変換効率も測定した。
3. メタボロームの網羅的解析：*IDH1* の frameshift germline 変異が検出された患者および両親の尿、正常細胞(好中球)を用いて、*IDH* 変異が代謝産物に及ぼす影響につき、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分

析計 (CE-TOFMS) を用いて測定した。

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

### C. 研究結果

1. 造血器腫瘍における *IDH1/2* の変異: AML の新鮮腫瘍 1 症例で *IDH2* の R140Q 変異が認められた。これは *IDH2* の既知の変異であり、成人の神経膠腫では最も頻度が高いものであった。この症例は 8;21 転座を有する AML-M2 の 12 歳男児であり、治療後早期再発により死亡している。*FLT3/ITD* は陰性で、*NPM1* および *c-KIT* の変異も検出されなかった。本症例の初発時の腫瘍細胞を用いた SNP アレイ解析では、7q、9q および 16q の欠失、また 12q、17q および 22q の gain など複数のゲノムコピー数の変化が認められた。

2. 固形腫瘍における *IDH1/2* の変異: *IDH1* 変異を計 3 検体、*IDH2* 変異を計 4 検体に見出した。詳細は以下の通りである。*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 例に検出した。また *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 例に検出した。固形腫瘍で検出されたこれらの変異は全てこれまでに報告のないものであった。Mutation testing による検討では、神経膠腫細胞株で検出された *IDH2* V8G を除きすべて disease causing であった。また、*IDH1* D143X が検出された神経芽腫症例の正常検体の解析により、この変異は germline 変異であることが判明した。さらに家系解析により、この germline 変異は母親から遺伝的に受け継がれたものであることが明らかとなった。検索した範囲では、*IDH1* の germline、frameshift 変異はこれまでに報告がないものであった。*IDH1* germline 変異を有する神経芽腫症例および両親の尿、正常細胞(好中球)を用いて、メタボロームに及ぼす影響に関して解析したところ、明らかな異常は認められ

なかった。さらに Ewing 肉腫検体で検出された *IDH2* I142 変異の機能解析では、isocitrate から  $\alpha$ KT への変換効率の低下は認められたが、 $\alpha$ KT から 2HG への変換効率の上昇は認められなかった。従って、*IDH2* I142L は機能喪失型の変異であり、機能獲得型の性状は認められなかった。

### D. 考察

以上の結果より、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。また *IDH2* 変異を有する小児例の遺伝学的背景が成人の *IDH1/2* 変異陽性例とは全く異なることから、小児例における *IDH2* の白血病発症における役割は、成人とは異なる可能性が示唆された。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。

### E. 結論

小児腫瘍における *IDH1/2* の変異解析を行い、造血器腫瘍の病態における *IDH1/2* の関与は少ないと考えられたが、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。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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, Koeffler 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.

4) 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.

5) 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.

6) Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan 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, Mooman 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, Koeffler 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.

7) 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.

8) 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.

9) 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):

10) 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.

11) 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.

12) Morishima S, Ogawa S, Matsubara A, Kawase T, Nannya Y, Kashiwase K, Satake M, Saji H, Inoko H, Kato S, Kodaera 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.

13) 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.

14) 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.

15) 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]

## 2. 学会発表

1) Takita J, Nishimura R, Sanada M, Ohki K, Kato M, Chen Y, Kanegane H, Okita H, Fujimoto J, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: ALK gene aberrations in pediatric solid tumors. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, April 15 ~18, 2010 .

2) Nishimura R, Takita J, Ohki K, Kato M, Chen Y, Sanada M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: High resolution copy number analysis of Ewing Sarcoma family of tumors using high-density SNP-genotyping microarray. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, April 15 ~18, 2010 .

3) Motomura A, Takita J, Nishimura R, Ohki K, Ohkubo J, Ida K, Kikuchi A, Okita H, Ogawa S, Igarashi T: Refractory Ewing Sarcoma family of tumors in a child with EWS-FEV fusion gene. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, April 15 ~18, 2010 .

4) Ohira M, Nakamura Y, Kojima 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*, Stockholm, Sweden, June 21-24, 2010 .

5) Takita J, Okubo J, Nishimura R, Oki K, Uchisaka N, Chen Y, Sanada M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: Effects of selective ALK inhibitors to neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research*, Stockholm, Sweden, June 21-24, 2010 .

6) Okubo J, Takita J, Nishimura R, Ohki K, Kato M, Chen Y, Sanada M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: Aberrant activation of ALK kinase by a short form ALK protein in neuroblastoma. *Advances*

in Neuroblastoma Research, Stockholm, Sweden, June 21-24, 2010.

- 7) 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日~25日, 2010.
- 8) 大久保淳, 滝田順子, 西村力, 大木健太郎, 加藤元博, 真田昌, 菊地陽, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: 小児固形腫瘍における ALK 阻害剤の効果に関する検討. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 4月23日~25日, 2010.
- 9) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: 横紋筋肉腫における ALK 遺伝子の増幅・変異の検討. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 岩手, 4月23日~25日, 2010.
- 10) 大木健太郎, 滝田順子, 西村力, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 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日~25日, 2010.
- 11) 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日~25日, 2010.
- 12) 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, 月5日12日, 2010.
- 13) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Okubo J, Uchisaka N, Adachi M, Sanada M, Igarashi T, Ogawa S: Mutations of IDH1 and IDH2 genes in pediatric solid tumors. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka, September 22~24, 2010
- 14) 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, 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.
- 15) 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 内坂直樹, 安達正時, 真田昌, 加藤啓輔, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: 胸膜肺芽腫における網羅的ゲノム解析. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月22日~24日, 2010.
- 16) 滝田順子, 西村力, 大木健太郎, 樋渡光輝, 大久保淳, 内坂直樹, 真田昌, 大喜多肇, 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.
- 17) 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 LEF 1 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.

- 18) 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.
- 19) Matsubara A, Kato M, Sanada M, Takita J, Chiba S, Hayashi Y, Kobayashi Y, Watanabe T, Yoshino T, Koefler H, Bartram C, Ogawa S: Genome-wide analysis using high-density SNP microarrays in various types of hematologic malignancies. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9月24日~26日, 2010.
- 20) Park M, 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.
- 21) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo 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.
- 22) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo 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.
- 23) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 金兼弘和, 大喜多肇, 藤本純一郎, 陳玉彦, 真田昌, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司: 小児固形腫瘍における ALK 遺伝子の解析. 第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12月17日~19日, 2010.
- 24) 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 内坂直樹, 安達正時, 真田昌, 加藤啓輔, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆: 高感度 SNP アレイを用いた胸膜肺芽腫における網羅的ゲノム解析. 第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12月17日~19日, 2010.
- 25) 吉田健一, 滝田順子, 西村力, 安達正時, 大木健太郎, 大久保淳, 永田安伸, 真田昌, 林泰秀, 五十嵐隆, 小川誠司: 次世代シーケンサーを用いたエクソンシーケンスによる神経芽腫の標的分子の解析. 第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12月17日~19日, 2010.
- 26) 大木健太郎, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力, 大久保淳, 安達正時, 真田昌, 外松学, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆: 小児悪性腫瘍における Isocitrate dehydrogenase 1/2 の変異解析. 第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12月17日~19日, 2010.
- 27) 安達正時, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力, 大木健太郎, 大久保淳, 内坂直樹, 真田昌, 小



川誠司, 林泰秀, 五十嵐隆: 小児固形腫瘍における NOTCH シグナルの検討; 発現様式と遺伝子変異の解析. 第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日~19 日, 2010.

- 無し
- 2. 実用新案登録  
無し
- 3. その他  
無し

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

- 1. 特許取得

## 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

研究代表者 大平 美紀 千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室 室長

研究要旨： 骨肉腫、肝芽腫、腎芽腫などの難治性小児がんの新規治療法の開発と腫瘍層別化システムの構築を目標に、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析とゲノムコピー数異常の解析による病期や予後に強く関わる分子的特徴の検索を行っている。先行研究で検討してきた肝芽腫については、これまでにゲノム・遺伝子発現プロファイリングが共に肝芽腫の予後と強く関連し、さらに2つの組み合わせで効率の良い腫瘍の層別化ができることを示したが、今年度はさらに前方視的な臨床的有用性の検証を視野に、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。また、新たに骨肉腫を解析対象に加え、化学療法感受性に関わる分子プロファイルの解明を目的に治療前のバイオプシーサンプルを用いたゲノムコピー数解析を行なった。高頻度の染色体増加が見られる中で、予後に強く関連すると期待される染色体領域が複数見いだされた。今後このマーカー候補についても症例を追加し検証を進める。

### A. 研究目的

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

そこで本研究では、骨肉腫、肝芽腫、腎芽腫などの難治性小児がんを対象に、悪性度などの臨床的特性の異なる小児がん由来組織の遺伝子発現やゲノム異常等の分子プロファイルを検索し、背景にある分子的特徴を明らかにすることにより、治療標的候補の同定と腫瘍層別化による効率的な治療システムの構築に応用することを目的とする。DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイル、アレイCGH解析、遺伝子変異検索によるゲノム異常の情報と予後情報の統計解析により層別化に必要な因子の絞り込みを行い、治療後のQOL改善と治癒率向上を目標とした予後判別法の確立や新規リスク分類の提示を目指す。

### B. 研究方法

1. 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：先行研究で収集した80症例の肝芽腫のアレイCGHデータについて、各染色体の短腕・長腕毎の腕レベルの増減の有無の数値化、各染色体内の breakpoint

数のカウント、各染色体の平均対数蛍光比の絶対値を合計し、それぞれ中央値を境界に二値化し、マーカーとして生存解析に用いた。

2. 小児骨肉腫腫瘍組織の収集と選択：千葉県がんセンターの凍結腫瘍組織バンクに寄託された骨肉腫組織を対象とした。同センターにおいて治療を受けた小児骨肉腫患者のうち、均一な背景を持つ症例群（初診時転移無し、四肢発生、同一化学療法プロトコールおよび広範切除以上の外科的治療施行）として抽出した予後良好例と予後不良例の各8例、合計16例の解析を行った。全例化学療法施行前のバイオプシーサンプルを用いた。

3. ゲノムコピー数異常解析：500ngのゲノムDNAを対象とし、ヒトオリゴアレイ(アジレント社 Whole Human Genome oligo DNA microarray, 44k フォーマット)を用いてアレイCGH解析を行った。

4. 遺伝子発現解析：凍結腫瘍組織から調製した total RNA 5 $\mu$ g を出発材料に逆転写酵素を用いて cDNA を調製し半定量 RT-PCR 解析に用いた。標準化コントロールとして GAPDH 遺伝子を用いた。

5. 遺伝子変異検索：腫瘍組織由来ゲノムDNA または cDNA を鋳型とし、遺伝子特異的プライマーを用いて増幅した産物をダイレクトシーケンシング法で塩基配列を確認した。(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、

関連法規を遵守し、倫理審査委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者の人権の擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

### C. 研究結果

1. 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：先行研究にて得た肝芽腫 60 症例のアレイ CGH データと各症例の予後情報から、予後不良パターンで特徴的なゲノム異常は 2、6、8、12、20 番染色体全体の増加と 4q の欠失であり、1p の欠失と 1q の増加は予後良好タイプを含む肝芽腫全体に高頻度に見られる異常であった。肝芽腫の予後診断においては、病理組織型や病期が従来取り入れられてきたが、病期に関しては欧米で使用されている分類とは異なるため、過去の症例については海外のスタディとの比較が容易ではなかった。そこで、世界共通かつ簡便にデータが得られるゲノム異常の指標を用いたリスク分類は特に有効であると期待される。本研究では、症例毎にアレイ CGH データの各染色体の平均対数蛍光比の絶対値を合計し、全 60 症例の中央値を閾値として **Silent/Aberrant** に二群化し、ゲノム異常の指標として生存解析に用いた。本研究のグローバルなゲノム異常の情報は解析プラットフォームが異なっても得られる結果に大きな違いはないため、異なるスタディ間でも容易に共有でき、汎用性のある層別化の実現に非常に有用である。これまでの解析から、**Silent** と分類される症例はほぼ予後良好症例(5 年生存率：95%以上)であり、検証用の追加症例 20 例においても再現性が得られた。予後不良症例群に対してはアレイ CGH による分類に加え、遺伝子発現プロファイルなど他のマーカーを用いたさらなる予後分類が必要である。予後と特に有意に相関を示す因子は本研究で得た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) であり、これらは予後に関して独立のマーカーであった。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  $\beta$  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。

2. 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：骨肉腫におけるゲノム異常の特徴は、高度な複雑性と **heterogeneity**、さらには **gain** が **loss** よりも圧倒的に多いことなどが挙げられ、これらはすなわちゲノム

不安定性が骨肉腫発症に重要であることを示唆している。しかし骨肉腫の予後因子として重要な化学療法感受性とゲノムコピー数異常の関係はこれまでに明らかになっていない。そこで骨肉腫における化学療法感受性のマーカーとなる遺伝子群の解明を目的に、本年度はまず千葉県がんセンターにて治療を受け凍結組織バンクに寄託された小児骨肉腫症例 68 例のうち典型的な 16 例についてアレイ CGH 法によるゲノムプロファイル解析を行った。

均一な背景を持つ小児骨肉腫症例(初診時転移無し、四肢発生、Neoadjuvant 化学療法プロトコールおよび広範切除以上の外科的治療施行)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)を対象として解析を行った。これらの臨床病理学的背景はほぼ均一なものであった。先行研究の肝芽腫について用いた染色体腕レベルの増減や染色体内 **breakpoint** 数の指標の比較では骨肉腫予後良好群、予後不良群間での頻度の有意差は認めなかった。一方、染色体領域毎についての両群のゲノムコピー数異常プロファイルの比較から、特に特異的に増幅を認めた領域は、予後良好群における 1q22 と予後不良群における 12q13 の 2 領域であった。12q13 の **gain** は予後不良群に高頻度に認められ、さらに化学療法奏効群 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(0/8 例 vs 6/6 例、 $P < 0.0001$ )。

### D. 考察

1. 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：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。

2. 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：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が示された。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。

## E. 結論

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、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。今後、臨床応用へ向けてさらに検討を進める。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関しては、ゲノムコピー数解析が予後を反映するマーカーとなる可能性が明らかとなり、今後さらに検討を進める。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Ohira M, Nakagawara A. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. *Cancer Sci.* 101(11):2295-301, 2010.
- 4) De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeek 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.
- 5) 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.
- 6) 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 and regulates tumorigenesis via repression of KIF1B  $\beta$  and

TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene* 29(18):2681-90, 2010.

7) 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

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 大平美紀, 大羽成征, 中村洋子, 上條岳彦, 瀧岡美佐, 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.

## 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