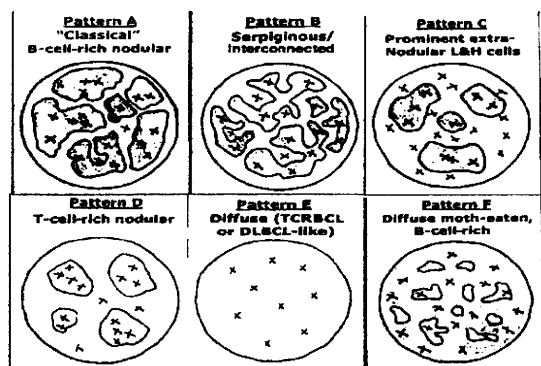


	CD15	CD30	CD20	EMA	Oct2 BOB.1	EBER ISH
1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	-	+	-
3	-	-	+	-	+	-
4	-	-	+	-	+	-
5	-	+	+	-	+	-
6	-	-	+	-	ND	-
7	-	-	+	-	+	-
8	-	+	+	-	ND	ND
9	-	-	+	+	+	ND
10	-	+/-	+	+	+	-
11	-	-	+	+	+	-
12	-	-	+	-	+	ND
13	-	-	+	+/-	ND	-
14	-	-	+	-	+	-

組織学的なパターンは classical B-cell-rich nodular (pattern A)を示した症例はなく、13例は prominent extra-nodular LP (L&H) cells (pattern C)あるいは serpiginous/interconnected (pattern B)と diffuse TCRBCL/DLBCL-like pattern (pattern E)が混在し、1例は全て diffuse patternを示した。



### 3) FISH法による遺伝子解析

#### a) Mature B-cell neoplasm における c-myc 転座

DLBCL 28 例、Burkitt lymphoma (BL) 68 例、BL と DLBCL の鑑別が困難な例 11 例、B-ALL 8 例について、LSI MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis)を用いて c-myc 遺伝子転座を検索した。DLBCL 24 例、BL 55 例、BL/DLBCL 7 例、B-ALL 5 例が判定可能であった。C-myc 転座は、DLBCL 3 例 (12.5%)、BL 44 例 (80%)、BL/DLBCL 4 例 (57%)、B-ALL 5 例 (100%)に認められた。

#### b) DLBCL における BCL2 転座

DLBCL と診断された 21 例に BCL2 遺伝子転座を検索したが、BCL2 遺伝子の転座は 1 例も認められなかった。

#### c) EWS, FKHR 転座

リンパ腫が疑われた症例の中に Ewing sarcoma, alveolar rhabdomyosarcoma と中央診断された症例が各 1 例あった。これらの症例では、それぞれ、EWS, FKHR 遺伝子の転座が FISH 法にて確認された。

#### 4) ALCL99 国際共同研究

ALCL99 国際共同研究に登録された 499 例のうち 431 例を review した。380 例が ALK-positive ALCL と診断されたが、そのうち 5 例は ALK-positive B-cell lymphoma であった。

リンパ節原発が 265 例、皮膚 13 例、軟部 22 例、その他 23 例で、多発例が 29 例、不明が 23 例であった。

亜型分類は 14 例が検体不十分でできなかった。235 例 (65%) が common pattern、22 例 (6%) が small-cell pattern (SC)、9 例 (2%) が lymphohistiocytic pattern (LH)、9 例 (2%) が Hodgkin-like pattern であった。361 例中 86 例 (24%) が composite ALCL で、SC/LH component は 114 例 (32%) に認められた。SC/LH component 101 例中 19 例が national review では見逃されていた。逆に national review で SC/LH component とされた 111 例中 29 例が international review では確認されなかった。

血管周囲に腫瘍細胞が配列する perivascular pattern は 371 例中 151 例 (41%) で認められ、SC/LH でより高率に認められた (75/113; 60% vs. 72/244; 40%) ( $p < 0.001$ )。

ALK 染色では 92% に nuclear and cytoplasmic staining pattern が認められた。

SC-LH と perivascular pattern では皮膚、縦隔、および臓器浸潤が高率にみられた。臨床所見と ALK 染色パターン (cytoplasmic+nuclear vs. cytoplasmic) との間に相関はみられなかった。多変量解析にて、再発リスクと SC-LH (HR=1.9,

p=.004)、perivascular pattern (HR=2.1, p=.001)との間に有意な相関が認められた。CD3 陽性所見は単変量解析では有意な再発リスク因子であった。

#### D. 考察

小児リンパ腫臨床試験登録症例の 95%が病理中央診断されており、病理中央診断システムは、臨床試験適格性についての判断基準(診断の確認)として十分に機能している。

小児の DLBCL は、germinal center B-cell immunophenotype (GCB type)が多いとされるが、成人との違いや分子生物学的特性は明確にされていない。今回の検討では、ほとんどが GCB type で、c-myc 転座が 12.5%認められたが、BCL2 転座は認められず、成人 DLBCL とは counterpart となるリンパ球や分子生物学的特性が異なることが示唆された。2008 年 WHO 分類では、Burkitt リンパ腫との中間型として B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma が挙げられ、両者の鑑別については混沌としたままである。病理中央診断においても、免疫組織化学染色や FISH による c-myc 転座のみでは鑑別診断が困難で、血液病理専門の病理判定委員の間でもコンセンサスが得られない症例が存在した。今後は、染色体分析、マーカー診断、さらには、発現アレイなど、網羅的な遺伝子解析を含めた検討が必要と考えられた。これについては、現在研究計画書を作成し、研究審査委員会での承認を待っている。JPLSG では B-NHL として同じプロトコールでの治療研究が行われており、治療反応性を含めた総合的な検討が待たれる。

NLPHL では、通常 CHL で陽性となる CD15, CD30 は陰性で、CD20, CD45, BCL6, Oct2, BOB.1 が陽性、EMA は約 50%の症例で陽性であるとされている。EBER-ISH は CHL では 20-70%の症例で陽性であるが、NLPHL では陰性である。自験例では、腫瘍細胞は、CD15 陰性、CD20 陽性、CD30 は 3/4 の症例で陰性、EMA は 2/3 の症例で陰性、Oct2, BOB1 は検索した 9

例全例陽性であった。1 例を除いて全例にびまん性増殖が少なくとも一部に認められ、T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma との鑑別を要した。このような反応性 T-cell を背景に腫瘍細胞がびまん性の増殖パターンを呈する領域は、14 症例すべてに認められた。CD21 陽性の FDC meshwork は、不完全なものも含めると全例に認められ、CD4+CD57+T-cell が LP 細胞を取り囲むロゼット形成も全ての症例で認められた。IgD は、検索した 9 症例のうち 8 例で LP 細胞に陽性となった。EBER-ISH も全例陰性であった。NLPHL と T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma との鑑別には、CD4+CD57+T-cell によるロゼット形成や CD21 陽性 FDC メッシュワークが有用で、IgD 陽性所見も参考になると思われた。

ALCL99 国際共同研究は、ALK-positive ALCL375 例を international review し、22 歳未満の ALK-positive ALCL の病理組織亜型、予後因子についての詳細な解析を行った。現在論文報告に向けて準備中である。

#### E. 結論

小児リンパ腫における中央病理診断システムは確立し、臨床試験における基盤として十分に機能している。さらに遺伝子転座などの遺伝子検査を取り入れた、より総合的な病理診断を試みた。小児の DLBCL は GCB type が大部分で成人と生物学的特性が異なることが示唆された。ALCL99 国際共同研究では 375 例の ALK-positive ALCL の解析により病理学的予後因子が確立された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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

2) Suzuki D, Kobayashi R, Yasuda K, Nakagawa A, Morimoto T, Yabe M, Yabe H, Kobayashi K. Precursor-T lymphoblastic lymphoma after unrelated bone marrow transplantation in a patient with Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 33(1):22-24, 2011

3) Fujita N, Kobayashi R, Takimoto T, Nakagawa A, Ueda K, Horibe K. Results of the Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) NHL-98 protocol for the treatment of B-cell non Hodgkin lymphoma and mature B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Leukemia & lymphoma* 52(2):223-229, 2011

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

5) 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

6) 中澤温子 「小児リンパ腫の病理」日本小児血液学会誌 24(8), 230-233, 2010

7) 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

2) 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 2010年9月3日

3) 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 2010年9月11日

4) 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 2011年12月19日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 2. 学会発表

1) 「Central Pathology Review System in Pediatric Cancer in Japan」9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society Workshop9「Current state and problem for childhood cancers in Asia」2010年8月26日 Gifu, Japan

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)  
分担研究報告書

小児造血器腫瘍の分子・細胞遺伝学的中央診断システム確立のための研究

研究分担者 林泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨 JPLSG の分子・細胞遺伝学的診断委員会は、分子診断と微小残存病変(minimal residual disease, MRD)を大きな課題として取り組んできた。今年度は、急性骨髄性白血病(AML)のAML-05プロトコールでは、初診時のキメラ遺伝子と *FLT3* 遺伝子の検索を行い、その結果と形態、マーカーと染色体解析結果を用いた中央診断を行ない、診断の精度の向上に貢献した。AML-05 プロトコールは平成 22 年 12 月で終了し、その後は診断困難例のみ中央診断を行っている。急性リンパ性白血病(ALL)では、再発 ALL のフローサイトメトリー(FCM)を用いた MRD と免疫グロブリン遺伝子および T 細胞受容体遺伝子を用いた PCR-MRD は順調に施行されており、検出率も 9 割に高まった。T-ALL と B 前駆型-ALL はプロトコール開始に向けて準備中である。今後、各臨床試験のプロトコール立案段階、しかもできるだけ早期の段階から、適切な分子診断、MRD 利用を立案できるためのチェック機関のような委員会を目指す予定である。これからは中央診断に関すること、MRD に関すること、検体保存に関すること、付随研究の立案に関することなどに本委員会が関与していくことが望ましいと思われる。

研究協力者

岩本彰太郎(三重大学医学部)  
太田秀明(大阪大学医学部)  
清河信敬(独立行政法人国立成育医療研究センター研究所)  
滝 智彦(京都府立医科大学)  
出口隆生(三重大学医学部)  
照井君典(弘前大学医学部)  
堀 壽成(愛知医科大学)  
横澤敏也(独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター)  
<今年度より参加>  
福島 敬(筑波大学小児科)  
嶋田 明(名古屋大学小児科)  
加藤啓輔(茨城こども病院内科)  
近藤健介(聖マリアンナ医科大学小児科)  
山下友加(独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター)

A. 研究目的

小児造血器腫瘍の大規模治療研究では、染色体・遺伝子異常が診断、治療法の決定や予後の予測に重要である。JPLSG 分子・細胞遺伝学的診断委員会(以下分子診断委員会)では、今年度は、AML-05 プロトコールの形態、マーカー、キメラ遺伝子等の結果を用いた中央診断は順調に行われ、診断の精度を高めている。キメラ mRNA による微小残存病変(minimal residual disease, MRD) (キメラ MRD) は施行されているが、提出検体が少ないことが問題となっている。AML-05 プロトコールは 12 月で終了した。その後は診断困難例のみ中央診断を行っている。再発急性リンパ性白血病(ALL) の MRD 検索システムは順調に施行され、T-ALL、B 前駆型-ALL ではプロトコール開始に向けて準備を行っている。

B. 研究方法

今年度は AML-05 プロトコールのキメラ遺伝子の中央診断を継続し、キメラ MRD も施行され

ている。全登録症例の形態、マーカー、染色体、キメラ遺伝子、*FLT3*-internal tandem duplication (ITD)の結果について、診断小委員会による最終診断およびリスク分類に関する予後因子の確認を行い、診断の精度を高めている。AML-05 プロトコールは平成 22 年 12 月で終了し、その後は診断困難例のみ中央診断を行っている。

MRD については、再発 ALL のフローサイトメトリー (FCM) による MRD (FCM-MRD) と、免疫グロブリン (*Ig*) と T 細胞受容体 (*TCR*) 遺伝子による MRD (PCR-MRD) が大きな問題もなく、施行されている。T-ALL、B 前駆型 ALL の MRD はプロトコール開始に向けて準備を行っている。乳児白血病委員会の ALL プロトコールでも MRD をやる予定である。

### C. 研究結果

(I) 平成 22 年度第一回分子診断委員会 (6 月 19 日)

#### (1) 分子診断のメンバーについて

今後、TCCSG のキメラ解析を行っている筑波の福島講師などを含めて、分子診断の実務に関わる人や、附随研究につながるような研究を行っている施設から、メンバーを募集して、以下の 4 名がメンバーに加わった。

福島 敬 (つくば大学小児科)

嶋田 明 (名古屋大学小児科)

加藤啓輔 (茨城こども病院内科)

近藤健介 (聖マリアンナ医科大学小児科)

#### (2) MRD

##### 1. FCM-MRD (出口隆生委員)

ALL-R08 において MRD による層別化を実施中である。堀委員が PCR-MRD について、出口委員が FCM-MRD について、委員会後の堀部班班会議で解析結果についての発表を行う。現在のところ大きな問題はなく実施されている (班会議発表資料参照)。検体提出がされない症例、不適切な提出が少ないながらみられた。

##### 2. PCR-MRD (堀壽成委員)

再発 ALL については JPLSG・堀部班会議で詳

細を発表した。RQ-PCR 法を用いることにより、定量の精度を上げる試みを実施し、現在 BFM のセンターラボから QC 用の検体を待っているところである。T-ALL は検出率を向上させるためプライマーセットを増やした。乳児 ALL においても観察研究で分子 MRD を実施の予定である。

国立病院機構名古屋医療センターから研究補助員が愛知医科大学に来て技術を習得している。名古屋医療センターに機器は揃っているの、技術を覚えてもらって将来的には 2 つのラボで実施が出来るよう体制を整備する。観察研究の検体などで慣れてもらいながら質を検証していく。

#### (3) AML (横澤敏也委員)

AML-05/P05 では、キメラ遺伝子解析、*FLT3*-ITD、キメラ遺伝子を用いた MRD について合計 422 例の解析で、何らかのキメラが陽性であった症例は 183 例、キメラ陰性 239 例であった。*PML-RARA* 陽性が 2 例あった。AML-P05 では、34 例の解析で 31 例が *PML-RARA* 陽性であった。*FLT3*-ITD は AML-05 では 418 例中 44 例 (10.5%)、P05 では 33 例中 5 例 (15%)、D05 では 58 例中 1 例 (1.7%) が陽性であった。キメラ MRD は AML-05 が 76 例、P05 が 19 例登録があった。

#### (4) 診断小 WG (滝智彦委員)

分子診断委員会からも何人か参加して、形態、マーカー、染色体、FISH、キメラなどの結果をメーリングリストで配布し、総合的に検討して最終診断を決定している。染色体とキメラの不一致例を FISH で確認したりしている。こういう体制で行っているのは AML がはじめてであり、今後の ALL や乳児 ALL などの臨床試験のモデルになると思われる。

#### (5) リンパ腫 (森哲也リンパ腫委員会委員長: オブザーバー参加)

検体の保存、中央診断のシステムについては、十分なシステムを有さず実施されたため、各グループの中央診断施設に検体が保存されている状況である。それを利用できるようにする努力と、新規プロトコールにおける中央診断、検体保

存のシステムは、骨髄、末梢血、組織などを包括して作成する必要がある。

#### (6) 乳児 ALL (滝智彦委員)

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

#### (7) 分子診断委員会の今後の役割について(滝智彦委員)

分子診断委員会内で、担当を決めてきたが、各委員会への参加の負担があること、委員会での議論のフィードバックが十分ではないこと、担当の分野が異なり各担当での対応が必要なことなどから、担当を決める体制は十分ではないと考えられる。

各臨床試験のプロトコール立案段階、しかもできるだけ早期の段階から、適切な分子診断、MRD利用を立案できるためのチェック機関のような委員会であることが望まれる。中央診断に関すること、MRDに関すること、検体保存に関すること、付随研究の立案に関すること、などにこの委員会から関与していくことが望ましいのではないかとと思われる。

プロトコールマニュアルWGとの連携においても、WGで議論したものに対してチェックやアドバイスをやっていく体制が望ましいかも知れない。委員会としては小児造血器腫瘍の診断の手引きの改訂という仕事も考えられる。

現在は、各治療研究委員会のメーリングリストに参加しているが、各治療研究委員会委員長に分子診断委員会のメーリングリストに入ってもら

って、各治療委員会での議論・要望を分子診断委員会にあげてもらいたい。

中央診断の実務への関与については、AMLの診断委員会がモデルになると思われるが、ALLでも同様のことができるかどうかは今後の検討課題である。

#### (II) 平成22年度第二回分子診断委員会(11月13日)

(1) 分子診断委員会の新しいメンバーについて  
分子診断委員会を強化するために、今回より福島、嶋田、加藤、近藤の4名に新たなメンバーとして加わっていただいた。また、名古屋医療センターでのBCP-ALLのPCR-MRDの担当者として、山下友加さんが加わった。(いずれも今回はオブザーバーとして参加)

#### (2) 中央診断(横澤敏也委員)

AML-05では、登録例475例のうち検体が送付されなかった4例を除く471例について解析が行われた。何らかのキメラ mRNA が陽性であった症例は205例、キメラ陰性266例であった。*PML-RARA*陽性が3例あった。*AML1-ETO*陽性が26.3%と多く、この傾向は我が国の成人でも同様である。*NUP98-HOXA9*はこれまでのところ陽性例はなかった。AML-P05では *PML-RARA* 陽性36例、陰性5例で、検体送付なしが4例であった。*FLT3-ITD* 陽性例は、AML-05では468例中52例(11.1%)、P05では40例中5例(12.5%)、D05では68例中1例(1.5%)であった。疫学研究でのキメラ、*FLT3-ITD* 解析をどうするかについては今後の課題である。

#### (3) MRD

##### 1. キメラ(横澤敏也委員)

AML-05が305検体中81例、P05が62検体中20例の登録があった。そのうち *AML1-ETO* が52例(196検体)で、その他は少ない。MRD測定後のRNAは廃棄している。

##### 2. FCM-MRD(出口隆生委員)

再発 ALL: ALL-R08の28-29例の検体が送られてきたが、対象となったのはそのうちの21例であった。T-ALLについては6カラーで三重大学と

成育医療研究センターで行う予定である。

BCP-ALL はマンパワーの問題で全例に行うのは難しい。まずは 100 例程度で行い、PCR の結果と比較して評価するのがいいのではないかと考えている。

### 3. PCR-MRD(堀壽成委員)

T-ALL と再発 ALL については少しずつ行っている。BCP-ALL については愛知医大と名古屋医療センターで行う予定であり、現在 QC を受けている。検出率は徐々に上がっており、現在9割程度であり、再構成のプライマーの種類を増やすことで検出率が上がった。

### 4. ダウン症候群

#### ①FCM-MRD(出口隆生委員)

TAM については、現在パイロットで検討を行っている。その中で、新生児施設から採取後数日経過した検体が送られてきたことがあった。検体提出に慣れていない新生児施設に対してはプロトコールへの記載などで注意が必要である。

#### ②GATA1 変異と PCR-MRD(照井君典委員)

GATA1 は症例により変異部位が異なるため、感度設定が難しい。TAM では芽球が減ってきてからでは検出が難しくなり、AMKL も芽球比率が低い場合は検出が難しい。

#### (4)中央診断担当者会議

8月18日と10月30日に中央診断担当者会議が行われ、「小児造血器腫瘍の診断の手引き」の改訂作業が行われていることが報告された。この会議には、林、出口、清河、堀、太田、滝、福島、山下委員が参加した。12月6日にも開催され、具体的な手順等が討議された。

### D. 考察

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

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

前駆型 ALL についてはプロトコール開始に向けて検討中である。

遺伝子を用いた ALL の PCR-MRD は再発 ALL で開始され、プライマーの種類を増やすことで検出率は 9 割になった。T-ALL と B 前駆型 ALL では準備中である。検索を行う人員、費用の問題があり、特に B 前駆型 ALL の PCR-MRD は名古屋医療センターにおいても開始する準備をしている。

### E. 結論

今年度は AML-05 の中央診断が順調に行われて、本プロトコールは終了した。また再発 ALL の MRD は順調に施行されている。T-ALL と B 前駆型 ALL の MRD は、検討を行い準備している。今後、分子診断委員会の新たな改変を予定している。

### F. 健康危険情報

該当なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutation in childhood therapy-related leukemia. *Leukemia* (in press)
2. 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* 25 : 382-384, 2011
3. Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Science* 102 : 302-308, 2011
4. 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* 203 : 292–296, 2010
5. Seki M, Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Agematsu K, Morio T, Yachie A, Kato M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr Int* 52 : e196–199, 2010
  6. 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* 24 : 1975–1977, 2010
  7. 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* 55 : 1406–1409, 2010
  8. 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* 116 : 4631–4638, 2010
  9. 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* 37 : 569–581, 2010
  10. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y. Serum eosinophil cationic protein and 27 cytokines /chemokines in acute exacerbation of childhood asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 152 Suppl 1:62–66, 2010
  11. 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* 91 : 831–837, 2010
  12. 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* 24 : 1018–1024, 2010
  13. 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* 24 : 383–396, 2010
  14. 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* 24 :



## 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, 2010.4.15
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, 2010.4.15
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, 2010.4.24
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, 2010.4.24
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, 2010.4.24
6. 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, 2010.4.24
7. 林 泰秀. 小児白血病の発症, 進展の分子遺伝学. 113回日本小児科学会学術集会, 岩手, 2010.4.25
8. 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, 2010.9.22
9. 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, 2010.9.23
10. 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, 2010.9.23
11. 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, 2010.9.24
12. 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, 2010.9.23
13. 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, 2010.9.24
14. 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, 2010.9.24
15. 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, 2010.9.24
  16. 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, 2010.9.25
  17. 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, 2010.9.26
  18. 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, 2010.9.25
  19. 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, 2010.9.25
  20. 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, 2010.9.25
  21. 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, 2010.9.25
  22. 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, 2010.10.16
  23. 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. 2010.12.6
  24. 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. 2010.12.6
  25. Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Takita J, Kato M, Kanazawa 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. 2010.12.7
  26. 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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.17
27. 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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.17
28. 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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.17
29. 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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.18
30. 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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.18
31. 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セス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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.18
32. 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: システマ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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.18
33. 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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.18
34. 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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.18
35. 朴 明子, 柴田夕貴子, 佐野弘純, 塩澤裕介, 石橋清子, 飯塚もと子, 外松 学, 下田あい子, 林 泰秀. 小児在宅緩和ケアの実践について. 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, 大阪, 2010.12.18
36. 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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.18
37. 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, 堀部敬三, 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総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 2010.12.19
38. 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

一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, 2011.1.30

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)

分担研究報告書

小児固形腫瘍の病理中央診断システムの確立と病理診断の標準化に関する研究

研究分担者 堀江 弘 千葉県こども病院検査部病理科

研究要旨

本研究の目的は希少腫瘍、あるいは臨床研究非登録例を含む全ての固形腫瘍を対象とした新しい中央病理診断システムを確立し、そのアウトカム等を研究しうる基盤を構築し、併せてその診断精度の向上のため病理診断業務の標準化に向けた取り組みを行うことにより、小児固形腫瘍の治療成績の向上に寄与することである。本年度は中央病理診断システムの骨子となる小児固形腫瘍観察研究実施計画書が策定され、日本小児がん学会研究審査委員会において承認され、その実施に向けた最終段階に入っている。本年度の中央病理診断の実績については、神経芽腫 55 例、腎腫瘍 43 例、肝腫瘍 35 例、横紋筋肉腫 30 例の計163 症例で、全臨床研究登録症例(179 例)の 91.1%を占めている。懸案であった各種の固形腫瘍の中央診断の基準となる診断の手引の作成を検討していたが、その成果である「小児固形腫瘍の診断の手引き」を現在刊行中である。

研究協力者(小児腫瘍組織分類委員会委員)

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

立が不可欠である。本研究においては臨床研究グループ症例のみでなく、他の希少な小児固形腫瘍の治療の向上にも寄与しうる中央病理診断システムを確立することをめざしている。また、診断の精度の向上のため、小児固形腫瘍の診断の手引きを作成する。

B.研究方法

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

C.研究結果

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

A.研究目的

小児固形腫瘍の治療あるいは臨床研究においては、精度の高い中央病理診断システムの確

1. 国立成育センター内に小児腫瘍中央診断委員会事務局が設置され、肝腫瘍を除く共同研究

グループ症例の受付、診断作業、標本管理等の業務がスタートした。共同研究機構とのタイアップにより来年度からは肝腫瘍症例の診断もこのルートに集約されることになる。

2. 2009年の小児固形腫瘍の中央診断症例は、神経芽腫 75 例、腎腫瘍 40 例、肝腫瘍 27 例、横紋筋肉腫 28 例の計170 症例であった。

3. 小児固形腫瘍の病理中央診断の現状についての詳細は、平成 23 年 2 月 5 日国立成育医療研究センターにおいて生育医療委託事業・中川班との共催で実施された小児腫瘍セミナーにおいて報告した。

4. 全国の小児医療施設における固形腫瘍診断に対する理解を広め、小児固形腫瘍治療の均てん化に資するため、診断の手引を作成中であったが、その成果は「小児固形腫瘍の診断の手引き」として、現在刊行中である。その掲載内容は以下のとおりである。

1. 神経芽腫群腫瘍の診断の手引き
2. 小児腎腫瘍の診断の手引き
3. 小児肝腫瘍の病理組織診断
4. 小児横紋筋肉腫のコンセンサス病理診断
5. Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の病理組織診断
6. 分子生物学的診断用の腫瘍組織検体等の取り扱いについて

#### D. 考察

新しい小児固形腫瘍中央診断の基本となる小児固形腫瘍観察研究実施計画書が作成されたが、アウトカム研究については、現実的多くの難しい問題を含んでおり、段階的に改善を加えながら実行していくことになると思われる。

#### E. 結論

小児固形腫瘍の治療の均てん化を図るためには、中央病理診断システムの構築は不可欠で、その対象についても全ての腫瘍種を包括したものであることが望まれる。また、その診断精度向上のためには、各種の腫瘍に対する理解や適切な診断材料をうることが重要であるので、本研究の成果である「固形腫瘍診断の手引き」が有効に活用されることを期待している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hishiki T, Matsunaga T, Sasaki F, Yano M, Ida K, Horie H, Kondo S, Watanabe K, Oue T, Tajiri T, Kamimatsuse A, Ohnuma N, Hiyama E: Outcome of hepatoblastoma treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT. *Pediatr Surg Int*, 27: 1-8, 2011

2. Arai Y, Honda S, Haruta M, Kasai F, Fujiwara Y, Ohshima J, Sasaki F, Nakagawara A, Horie H, Yamaoka H, Hiyama E, Kaneko Y: Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 49: 596-609, 2010

3. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会:小児腫瘍カラーアトラス 第5巻 肝臓・胆嚢・膵臓腫瘍. 金原出版、東京 2010

4. 第 26 回日本小児がん学会教育講演抄録集 2010.12

5. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会:小児腫瘍症例検討会抄録集 小児がん : - 2010

##### 2. 学会発表

1. 新たに刊行された小児腫瘍カラーアトラス「肝臓・胆嚢・膵臓腫瘍」について. 堀江 弘 第26回日本小児がん学会 大阪 2010.12.17

2. 難治性肝芽腫に関する病理学的観点からの検討. 堀江 弘 第26回日本小児がん学会 大阪 2010.12.17

3. JPLTにおける高リスク群肝芽腫症例の検討. 上松瀬 新、菱木知郎、田尻達郎、渡邊健一郎、矢野道広、堀江 弘、井田孔明、近藤知史、大植

孝治、佐々木文章、檜山英三 第26回日本小児  
がん学会 大阪 2010.12.17

4. 難治性肝芽腫の治療～拡大肝切除、転移巣切  
除.IVR. 菱木知郎、佐々木文章、矢野道広、井  
田孔明、堀江 弘、近藤知史、渡邊健一郎、大植  
孝治、田尻達郎、上松瀬 新、檜山英三 第26回  
日本小児がん学会 大阪 2010.12.17

5. 新たな病理組織分類アトラスの作成と小児固  
形腫瘍の生物学的特異性の解明. 堀江 弘、北  
條 洋、田中祐吉、中澤温子、藤本純一郎、横山  
繁昭、中山雅弘、石田 剛、宮内 潤、大喜多  
肇、井上 健、平戸純子、小林庸次、森川征彦、  
恒吉正澄、浜崎 豊、秦 順一 26回日本小児が  
ん学会 大阪 2010.12.18

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

分担研究報告書

小児固形腫瘍の分子・細胞遺伝学的中央診断システム確立のための研究

研究分担者 大喜多 肇 国立成育医療研究センター 室長

**研究要旨** 小児固形腫瘍の分子・細胞遺伝学的診断システム確立、標準化の一環として、小児固形腫瘍の分子診断の手引きを作成した。昨年度検討した分子診断の問題点および精度管理から、検体処理及び送付法を各施設、担当者に周知・徹底する必要があると考えられたため、凍結検体からの RT-PCR、パラフィン切片からの FISH 法、その他の核酸解析に対応する検体処理・保存、送付方法を含む内容とした。特に普段、検体を取り扱うことの少ない臨床医でも検体処理できるように配慮した。診断手順を周知することにより、遺伝子解析に対する信頼性を担保し、さらなる診断の精度向上が期待される。

**A. 研究目的**

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

断の検出が一般的である。分子診断の精度管理上の問題点からは、検体処理及び送付法を各施設、担当者に周知・徹底する必要があると考えられたため、分子診断の手引きを作成することとした。凍結検体からの RT-PCR、パラフィン切片からの FISH 法、その他の核酸解析に対応する検体処理・保存、送付方法を含む手順を周知することにより、遺伝子解析の精度を向上させることを目的とした。

**B. 研究方法**

過去に行った Ewing 肉腫ファミリー腫瘍、横紋筋肉腫の遺伝子解析 60 例の経験より、抽出された検体取扱い上の問題点を踏まえて、小児固形腫瘍の分子診断の手引きを作成した。遺伝子診断方法は、凍結検体を用いた RT-PCR 法が基本であるが、凍結検体がない場合は、パラフィン包埋組織を用いた Fluorescence in situ hybridization (FISH) や RT-PCR も考慮され、また、他の検査を行う可能性もあることから、それらにも対応する内容とした。特に普段、検体を取り扱うことの少ない



臨床医でも検体処理できるように配慮した。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

小児固形腫瘍の分子・細胞遺伝学的診断システム確立、標準化の一環として、小児固形腫瘍の分子診断の手引きを作成した。分子診断の精度管理上の問題点から、検体処理及び送付法に関して各施設、担当者に周知・徹底すべきと考えられた内容を中心とし、凍結検体からの RT-PCR、パラフィン切片からの FISH 法、その他の核酸解析に対応する検体処理・保存、送付方法を主たる内容とした。

内容としては、(1) 採取された検体の処理法として、無菌材料、生標本、捺印標本、新鮮凍結材料、電子顕微鏡、ホルマリン固定についてそれぞれ方法を解説した。診断・検査の方法によって異なる最適な処理・保存方法があるので、用途を考慮した検体の処理方法を記した。それぞれの材料に適した検体の処理方法を記した。また、(2) 検体の処理法と用途に関してそれぞれの検体処理と可能な検査法をまとめ、(3) 不適切な検体処理の例としては、実際にあった不適切な検体処理の例を挙げて注意を促すこととした。(4) 検体送付方法として、それぞれの材料に適した保管・送付方法を記した。

#### 標本処理方法とその後の診断・用途

	ホ	凍結	捺印	新鮮
HE	◎	△	△	×
免染	◎	○	△	×
FISH	○	○	◎	×
CISH	○	○	◎	×
RT-PCR		△	◎	×

×

MLPA	△	◎	×	△
フロー	△～×	×	×	◎
DNA blot		×	◎	×
	△			
定量 PCR	×	◎	×	

△

ホ:ホルマリン固定、凍結:未固定凍結、捺印:捺印標本、新鮮:新鮮組織、HE:ヘマトキシリン・エオジン染色、免染:免疫染色、CISH: Chromogenic in situ hybridization、MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification、フロー:フローサイトメトリー。◎:最適、◎可能、△可能であるが感度等が低下、×:不適当。

### D. 考察

小児固形腫瘍の分子・細胞遺伝学的診断システム確立、標準化の一環として、小児固形腫瘍の分子診断の手引きを作成した。検体処理・保存、送付方法を含む手順を普段、検体を取り扱うことの少ない臨床医でも周知することにより、遺伝子解析に対する信頼性を担保し、さらなる診断の精度向上が期待される。

Ewing 肉腫等の腫瘍に対する遺伝子解析は、腫瘍の診断上、欠くべからざるものになりつつある。Machado らは、560 例の Ewing 肉腫を疑われる腫瘍に対してパラフィン包埋組織を用いた FISH、RT-PCR を行っているが、両方法を合わせても診断的意味のある情報を得られた割合は 73.4%にすぎず、それぞれの方法では 50%程度であった (Diagn Mol Pathol 18(4), 189, 2009)。一方、より古い報告であってもパラフィン切片を用いた FISH や RT-PCR 法で 80%程度の情報が得られている報告もある。解析技術の進歩にもかかわらず、近年の多数例を用いた解析で診断的情報が得られたケースが少ないのは、コンサルテーション症例が多いため検体の処理にばらつきがある可能性が考え

られ、特にパラフィン切片の場合は、各施設における検体処理が重要と考えられる。諸外国と国内では、検体処理についての状況は異なると思われるが、今後は分子解析も想定して検体処理に当てる必要があると考えられる。

#### E. 結論

小児固形腫瘍の分子・細胞遺伝学的診断システム確立、標準化の一環として、小児固形腫瘍の分子診断の手引きを作成した。凍結検体からの RT-PCR、パラフィン切片からの FISH 法、その他の核酸解析に対応する検体処理・保存、送付方法を含む内容とした。特に普段、検体を取り扱うことの少ない臨床医でも検体処理できるように配慮した。診断手順を周知することにより、より遺伝子解析に対する信頼性を担保し、さらなる診断の精度向上が期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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;37(5):1279-88.

##### 2. 学会発表

1) Nakazawa A, Okita H, Sagai S. Central Pathology Review System in Pediatric Cancer in Japan. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society, Gifu, August 25-27,

2010.

2) Okita H, Haruta M, Kaneko Y, Koshinaga T, Hinotsu S, Fukuzawa M, Horie H, Hata J, Kiyokawa N. WT1 alterations in neuroblastoma and the genotype-phenotype correlation in Japan. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society, Gifu, August 25-27, 2010.

#### H. 知的財産件の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)

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

研究分担者 千葉県がんセンター 中川原 章

**研究要旨** わが国に小児固形腫瘍の中央組織保存および標準化された遺伝子診断のモデルを構築するために、全国規模の神経芽腫組織バンクおよび遺伝子診断システムの確立を図って来た。平成7年の開始以来、検体数は2900を越しており、国際的にも最も多数の精度の高い保存検体となった。現在の通常検査は、DNA ploidy (FACScan)とMYCN増幅有無のFISH法と定量的PCR法による測定であるが、on-line systemでその結果を主治医に返送する体制は完全に定常化した。日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)登録検体数も徐々に増え、200件に達した。個々の症例について問い合わせや要望がある検体については、必要に応じて、アレイCGH検査、発現ミニチップ検査、Alk等遺伝子変異解析を行った。本システムの保持のために、今後、恒常的かつ安定的な資金獲得が必須である。

#### A. 研究目的

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

#### B. 研究方法

全国の日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)登録施設および非登録施設から送られてくる神経芽腫サンプル(凍結組織、新鮮生組織、末梢血)と匿名化された必要最小限の臨床情報を収集した。DNA ploidy (FACScan)とMYCN増幅をFISH法と定量的PCR法によって測定し、7-10日以内にon-line systemでその結果を主治医に返した。

#### C. 研究結果

千葉県がんセンターにおける神経芽腫・腫瘍バンクは開設以来15年を経、全国から約2900

検体が収集された。この中には、600検体にもぼるマススクリーニングで発見された神経芽腫検体が含まれ、世界的にも有数の検体センターとなっている。平成21年度に行ったフォローアップ調査により、長期にわたる8年生存率の算定が可能となり、わが国で唯一の最近の症例の長期生存率を出すことができた。手術摘出検体(凍結組織、冷蔵生組織、末梢血)は、原則として手術日またはその翌日に当センターであらかじめ用意された搬送用ボックスに入れて発送され、翌日到着後、一週間以内にDNA ploidy、MYCN copy number (FISH法とreal time PCR法)の結果がオンライン(パスワード付き)で主治医に報告される体制が確立された。また、診断や予後判定が困難なため主治医から依頼のあった検査については個別に協議し、必要な追加検査を行うシステムも確立した。それらには、アレイCGH、選ばれた200遺伝子を搭載したミニチップ検査(TrkAを含む)、ALK遺伝子変異解析などが含まれ、すべて国際的な標準化された検査および診断体制となっている。また、国立生育医療センター病理部と連携した診断困難な個々の症例の詳細なheterogeneityに関する検討体制、および、国立がんセンター生化学部と連携した網羅的なDNAメチル化検査体制も確立した。したがって、神経芽腫の検

体センターおよび国際標準に則った遺伝子診断体制とその他施設連携がほぼ完全に整い、世界的にも最先端のシステムが確立した。

#### D. 考察

現在もなお難治性の小児がんを克服するためには、新たなリスク分類を開発する必要がある。神経芽腫は、小児悪性固形腫瘍の中でも発生頻度が高いうえに治癒率が低く、臨床的に最も問題となっているがんである。そのために、系統的な中央診断体制の確立と標準化された診断法、さらには、新規診断法の開発が必要である。そのためには系統的な検体保存体制が整備される必要がある。我々は15年前より独自の神経芽腫検体センターを立ち上げ、これまでに約 2900 検体の保存を行った。これは、世界的にも有数のものであり、精度の高さを考えると世界で最もクオリティの高い保存検体と言える。平成22年度は、JNBSGで検体保存および利用のための体制整備がほぼ整い、制度的にも確立した。したがって、今後、JNBSGとして新しい治療プロトコルの作製と臨床試験の推進が期待される。

#### E. 結論

わが国における神経芽腫の中央病理診断と中央遺伝子診断体制が確立し、検体の保存および利用システムも十分に確立された。今後は、JNBSGによるグループスタディの臨床プロトコールと密に連携し、臨床試験における実質的な成果を挙げていきたい。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. De Katleen P, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris JM, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A, Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schulte JH, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. Accurate Outcome Prediction in Neuroblastoma across Independent Data Sets Using a Multigene Signature. *Clin. Cancer Res.* 16:1532-1541, 2010
2. Kojima S, Hyakutake A, Koshikawa N, Nakagawara A, Takenaga K. MCL-1V, a novel mouse antiapoptotic MCL-I variant, generated by RNA splicing at a non-canonical splicing pair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:492-497, 2010
3. 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* 29:2681-2690, 2010
4. Yamada C, Ozaki T, Ando K, Suenaga Y, Inoue K, Ito Y, Okoshi R, Kageyama H, Kimura H, Miyazaki M, Nakagawara A. RUNX3 modulates DNA damage-mediated phosphorylation of tumor suppressor p53 at Ser-15 and acts as a Co-activator for p53. *J. Biol. Chem.* 285:16693-16703, 2010
5. Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A. LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392:252-257, 2010
6. Arai Y, Honda S, Haruta M, Kasai F, Fujiwara Y, Ohshima J, Sasaki F, Nakagawara A, Horie H, Yamaoka H, Hiyama E, Kaneko Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 49:596-609, 2010.
7. Bu Y, Suenaga Y, Okoshi R, Sang M, Kubo N, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. NFB1/MDC1 participates in the regulation of G2/M transition in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397:157-162, 2010.
8. Iwata S, Takenobu H, Kageyama H, Koseki H, Ishii T, Nakazawa A, Tatzaki S,