

厚生労働省科学研究費補助金
(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)

H22-次世代一般-008

分担研究報告書

神経芽腫スクリーニングの成果からみた本症の病態解明に関する研究

分担研究者 檜山 英三 広島大学自然科学研究支援開発センター 教授
広島大学病院小児外科

研究要旨 6ヶ月児を対象とした神経芽腫検査事業が、平成15年に休止され、その休止の条件として①本症の罹患と死亡の正確な把握、②マススクリーニングの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価、③本症による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立、の三点について対応することが課せられ、その後の解析で、この検査事業でこの腫瘍の本腫瘍の6歳までの累積罹患率が約2.8倍に上昇した一方で、6歳までに罹患した本腫瘍による累積死亡率は半数に減少していた。そのことを受け、本分担研究では、母子コホート研究として、本症の発症機序を明らかにするとともに、死亡率に結びつく予後不良な神経芽腫の新たな早期発見法と有効な対応策について検討を継続した。

神経芽腫検査事業の休止後のコホート解析を2010年まで広げた結果、検査事業休止後1才未満症例の発症率は速やかに減少したのに対し、2歳以降の症例が有意に増加していた。国際神経芽腫リスク分類委員会(INRG)のデータとの比較からは、検査事業を施行したコホートでは2歳以上のMYCN増幅した予後不良例の有意な低下が示され、乳児期に発症した腫瘍が予後不良腫瘍に転化することが示された。

18ヶ月でのスクリーニング検査を施行している大阪、京都、札幌でのデータを集計すると、18ヶ月月受診180,534人中2,620例発見：6,943人に1例の発見率で、明らかな過剰診断症例はなく、全例生存であった。

神経芽腫細胞の培養上清の検討から、予後不良な神経芽腫細胞では、Glutamate decarboxylase 活性が低下している可能性が示唆され、このパスウェイに注目して解析している。また、多発神経芽腫の全エクソン解析から、共通したミスセンス変異が検出され、本腫瘍の易罹患性に関与した変異の可能性が示唆された。

A. 研究目的

わが国で1984年から全国的に展開された尿中VMA, HVAをマーカーとする生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業(以下、神経芽マス)は過剰診療が指摘さ

れ2003年から休止したが、その後の後向き研究の結果(Lancet, 2008)から死亡率の低下が明らかになった。そこで、本分担研究では昨年度から神経芽腫の発生動向を検査事業休止後の母子コホートの動向から休

止後には乳児症例が減少し、2歳以上の進行例が増加しており、また国際比較からは神経芽マスによって乳児症例の増加と年長児症例の減少に加えて予後不良なMYCN増幅例が有意に減少していたことを示した。また、生物学的特性別に神経芽腫の発生動向を解析したところ、神経芽腫には易罹患性が存在し、その一部が自然体縮あるいは分化し、一方で悪性度が増加して予後不良な神経芽腫に進展していると仮定すると、易罹患性に関連するゲノム異常が存在することが推定された。

さらに、休止後に行われている18ヶ月の神経芽マスの成果を集積しつつ、予後不良例の新規マーカーの同定と有用性の検討を行ってきた。そこで、本年度は、これらのデータから神経芽腫の発症機序、悪性度上昇の機序を解明し、さらに新規のバイオマーカーを検証して、18ヶ月神経芽マスの有用性を検証する前向き研究への展開への根拠を集積することを目的とした。さらに、神経芽腫症例の遺伝的背景についての解析も加えて、検討した。

B. 研究方法

1. 生後6ヶ月児神経芽マスの再評価：

1) 休止後のコホート解析：昨年度に引き続き、休止後の2006-2010年出生(n=437万)の解析を施行した。比較対象のコホートは1971年から日本小児外科学会および日本小児がん学会に登録され、病理所見や腫瘍特性を再評価され予後解析もなされてクリーニングされた症例、約5,000例(マス発見2,500例)とした。このデータベースの補足率を、死亡個表での神経芽腫の死亡数との比較と、厚生労働科学研究費補助

金(子ども家庭総合研究事業)「小児慢性特定疾患治療研究事業の登録・管理・評価・情報提供に関する研究」(主任研究者：加藤忠明)から提供された平成10年から12年までの小児慢性特定疾患のコードC74.9の新規症例を診断年齢別に症例数との比較から67.5%である。

休止後のデータは主に日本小児外科学会の神経芽腫群腫瘍のデータを使用した。

2) コホートの国際比較解析：国際神経芽腫リスクグループ(INRG)データ(約11,000例)と比較検討。

1)で対象とした神経芽細胞腫検査事業が行われていた時期、及びその後の時期と同時期の欧米の神経芽腫の動向とその治療成績との比較検討を行うべく、INRG(国際神経芽腫リスクグループ)から、欧米での神経芽腫のデータベースを用いた。このデータベースは1990年以降に治療された北米(Children's Oncology Group)と欧州及び日本の神経芽腫を登録し、リスク分類を行うために作成されたデータベースで、これらのうちスクリーニングを行っていない北米と、1歳でスクリーニングを行っていたドイツの症例を中心に比較検討した。

2. 生後18ヶ月マススクリーニングの成績の検討動向

札幌、京都、大阪で行われてきた生後1歳半での尿中VMA,HVAによる神経芽腫スクリーニングの動向を調査し、現時点でのその成果と有用性について検討した。

3. 新規血中、尿中マーカーの検討：神経芽腫の特異的マーカーのLC-MS探索

1) 血清遊離 DNA を用いた MYCN 遺伝子増幅判定法の開発

神経芽腫の治療前の保存血清 102 例の血清遊離 DNA を抽出。血清遊離 DNA 中の MYCN (2p24.1) および対照遺伝子 NAGK (N-acetylglucosamine kinase, 2p12) を TaqMan 法による Real-time PCR 法で各々定量した。

2) 血中・尿中バイオマーカー探索

予後不良例の新たなバイオマーカーの探索を目的に、予後が良好であった神経芽腫の初代培養細胞と、予後不良で株化可能であった細胞株の培養液を用いて、LC-MS 解析を行って検討を行い、差分解析を行った。LC/MS の LC は、LC 20AD (SHIMADZU) を用い、サンプル量は 5 μ l としてカラムは L-Column2 ODS, 1.5 \times 150 mm (化学物質評価研究機構) をもちいた。MS は QqTOF 型 (QSTAR Elite) と LIT/FT 型 (LTQ-Orbitrap XL) を用い、デ

ータ処理は全 LC/MS データから全ピークを抽出して、各ピークの比較を行い、t 検定による評価にて $p < 0.05$ のものを特異的ピークとして抽出した。

4. 神経芽腫患者のゲノム解析

神経芽腫の易罹患性に関連するゲノム異常の探索に、胚細胞異常の可能性が高い多発神経芽腫 5 例の切除標本を、各 2 腫瘍ずつ DNA を抽出して、その全ゲノムエクソンのシーケンス解析を施行した。DNA を断片化後にエクソン領域を濃縮したのちに、次世代シーケンサー (Genomic Analyzer、イルミナ社製) にてシーケンス解析を行った。

抽出されたシーケンスで、今までの SNP データベースにないものを抽出して、従来のゲノム情報と比較し、全ての症例に共通した点突然多型 (SNPs) と欠失 (Indel) を検索した。また、候補部位については、

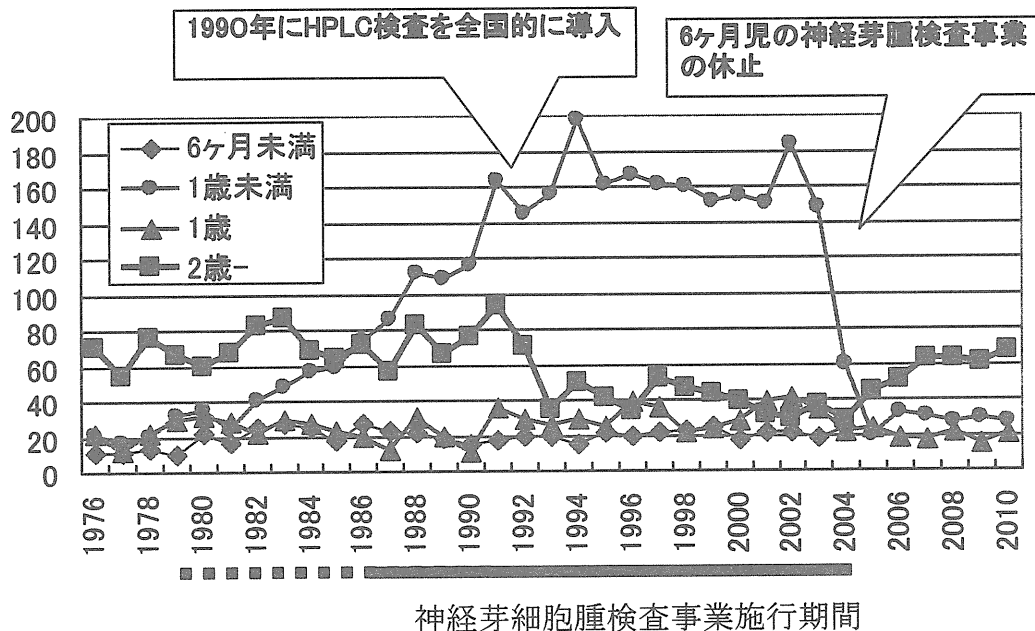


図 1 : 診断時年齢毎の神経芽腫登録数の年次別変化

sporadic な神経芽腫での検討を追加した。

C. 研究結果

1. 生後 6 ヶ月児神経芽マスの再評価：

1) 休止後の後向きコホート解析：6ヶ月神経芽腫検査事業によって予後良好な腫瘍が増加し、その中に過剰診断例が含まれていたことは明らかであったが、実際に年長児に発生する予後不良腫瘍をどの程度見いだせていたかを検討する目的で、昨年の検討に加え、継続的に年代をおって診断時年齢別の症例数を検討した(図1)。1歳未満の乳児は、スポット法による定性法が始まった1980年頃から漸増し、全国的に実施された1985年頃から明らかに増加していた。1990年ころに定量法である HPLC 法が全国的に導入され、その頃から、乳児例の明らかな増加と2歳以上の診断症例が半減を認めていたが、休止後は2005年から明らかに1歳

未満の症例は減少し、検査事業を開始前の値に近い数になったが、2006年以降2歳以上の年長児に発生する神経芽腫症例が増加し、年間60例程度になり、2010年症例も継続した傾向であり、この増加分が検査事業にて早期発見していた症例と考えられた。

2) コホートの国際比較解析：

次に、検査事業の施行時期の本邦の症例数の割合を、1980年以前の症例および休止後2年以上経過した2006年以降の症例とともに、ドイツ、北米(COG)のほぼ同時期のコホートとで比較検討を行なった(表2)。ドイツを除いて6ヶ月までの臨床発見例は、スクリーニングによる介入がないことから、6ヶ月以前の症例を対象としてその比較を行なった(図1)。その結果は前年度の結果と同様で、生後6-11ヶ月診断例は、本邦で神経芽マスが施行されていた時期には約5-6倍に増加していたが、一方で2歳以上の症例

表 1：本邦およびドイツ、北米での年齢別診断数

	日本 (1990-94)	日本 (1970-84)	日本 (2006-2009)	ドイツ (1990-1994)	COG (1990-1994)
<6	132	271	76	160	245
6≤ <12	791** (6.0)	199 (0.734)	50 (0.658)	104 (0.65)	170 (0.694)
12≤ <24	106 (0.803)	326 (1.203)	72 (0.947)	111 (0.694)	245 (1.0)
24≤ <60	130 (0.984)	478** (1.764)	163 (2.144)	224 (1.40)	406 (1.657)

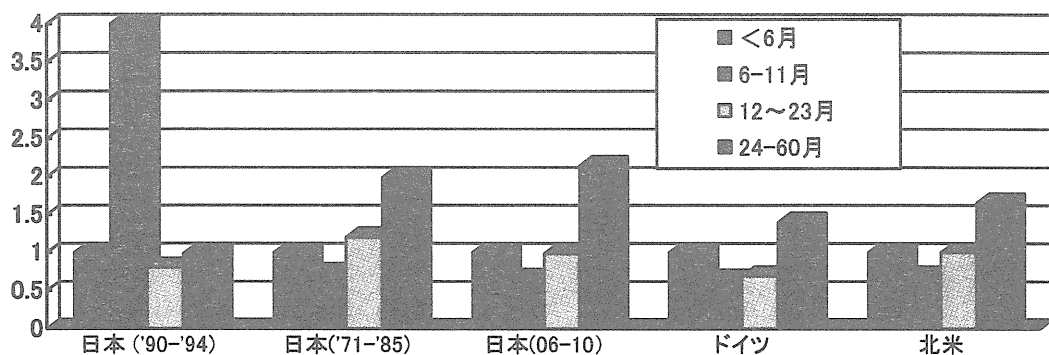


図 2：生後 6 ヶ月未満症例を 1 とした時の各年代別発症比率

は有意に減少し、ほぼ 1/2 になっていた。このことから、6 ヶ月の神経芽腫では、予後良好な神経芽腫を約 5-6 倍の頻度で過剰診断していたが、一方で年長児の神経芽腫が減少する結果となり、これらが、以前の前向きコホート研究で報告された死亡率の低下のデータを一致する結果となっていた。

2. 18ヶ月の神経芽腫検査について

平成15年以降、施行時期（生後18ヶ月）を変えて神経芽腫検査事業を継続してきた札幌、京都、大阪の自治体関係者等を交えて、その成果等について論議を継続した。インフォームドコンセントを得た上で、大阪、京都、札幌で実際に運用されている。

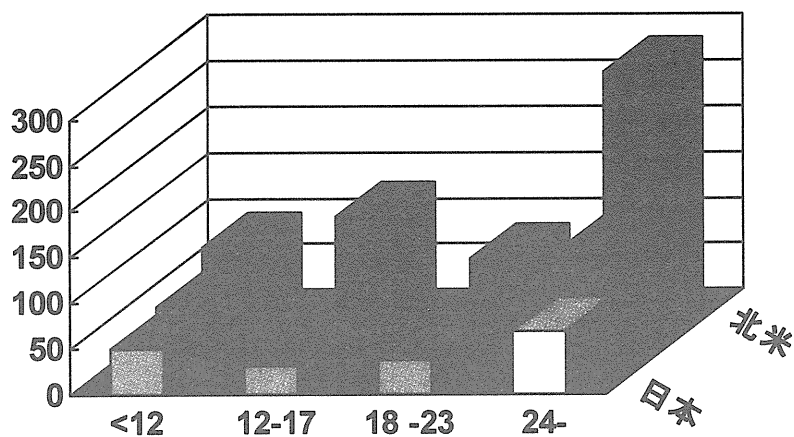


図3：日本と北米、ドイツの MYCN 増幅症例の分布

さらに、予後不良腫瘍の典型例である MYCN 遺伝子増幅症例の診断時年齢別の分布を MYCN 増幅症例には過剰診断例はないとすると、ほぼ同様の分布をするはずであるが、明らかに本邦の 2 歳以降の MYCN 増幅例の絶対数が少ないことが明らかとなった (図 3)。これは MYCN 増幅例が 6 ヶ月マスで早期に発見されたことが一因と考えることも可能で、実際 12-17 ヶ月の MYCN 増幅例が本邦で北米に比べ少ないことはこれで説明可能である。しかし、2 歳以降の症例の減少は早期発見効果だけでは説明困難であった。この時期に、生後 1 年でスクリーニングを施行したドイツがちょうど日本と北米の中間のデータを示した。

また、6 ヶ月マスが休止となった以降に、大阪(2004.5~2009.12)、京都(2004.12~2008.12)、札幌(2006.4~2009.12)の 18 ヶ月マスの状況についてまとめてみると、合計 180,534 人受診し、26 人に神経芽腫が見出されている。これらは、全例現時点では生存中であり、早期発見として 18 ヶ月が明らかに遅いことを示唆した症例や過剰診断例はなかった。発症率は 6,943 人に対して 1 (対 10 万出生あたり 1.44) であった。先の二次マスのデータが、11,116 出生に 1 (対 10 万出生あたり 9.00) であったことから、発見率は二次マスよりも高く、自然発生が 7,000 人に 1 人ということから、妥当な値であると考えられた。さらにこれらの症例のうち、現在 2 年経過し、陰性例に

発症例は確認されていない。これらの長期予後とともに、臨床発症例の分布、さらにそれらの悪性度解析が必要と考えられた。これらのエビデンスから、18ヶ月マスの有効性を検証する大規模な前向き研究が是非とも必要であることが強く示唆される結果となっている。

3. 新規マーカー探索

1) 血清遊離 DNA を用いた MYCN 遺伝子増幅判定法

血清遊離 DNA を用いた MYCN 遺伝子増幅判定法の開発を目指して、昨年度の結果にさらに症例を追加して、神経芽腫の治療前の保存血清 102 例の血清遊離 DNA を抽出。血清遊離 DNA 中の MYCN (2p24.1) および、対照遺伝子 NAGK (N-acetylglucosamine kinase, 2p12) を TaqMan 法による Real-time PCR 法で各々定量した。MYCN/NAGK 値は増幅例では非増幅例に比べ有意に高く ($p < 0.001$)、

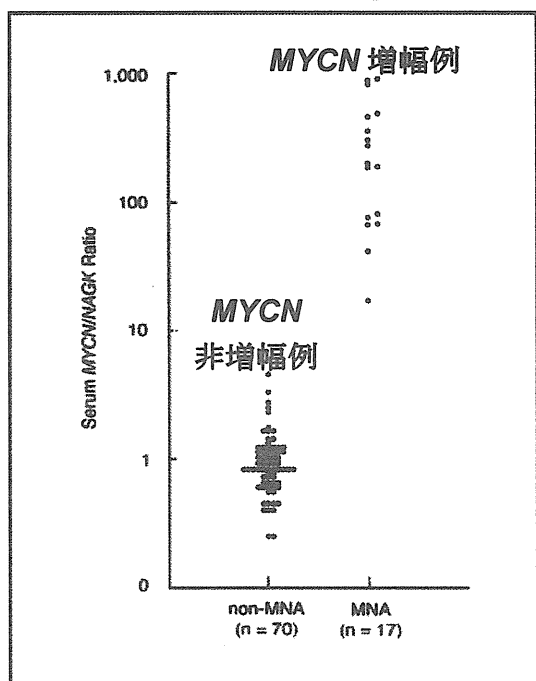


図4：血清中 MYCN 遺伝子定量

血清遊離 DNA の MYCN/NAGK 値の測定は MYCN 増幅の有無を判定できる精度の高い手法として期待される結果であった。

2) LC/MS による神経芽腫バイオマーカーの探索

予後が良好であった神経芽腫の初代培養細胞と、予後不良で株化可能であった細胞株の培養液を用いて、LC-MS 解析を行って検討を行い、差分解析を行った。 $p < 0.05$ のものを特異的ピークとして抽出したところ、予後良好群で約 700 ピーク、予後不良群で約 200 ピークが抽出された。これらの発現強度からクラスター分析を行うと、予後良好群と予後不良な 2 群の 3 群に分別された (図 5)。これらのペプチドや分子の同定を行い、パスウェイ解析を行った。予後良好群で GABA と Taurin が増加し、一方、予後不良群で Glutathione、Glutamate および Cysteine が増加していた。以上から、Glutamate decarboxylase 活性が生物学的特性と関連していることが示唆された。

4. 神経芽腫患者のゲノム解析

多発神経芽腫 5 例の切除標本を、各 2 腫瘍ずつで、10 検体の DNA を抽出して、その全ゲノムエクソンのシーケンス解析を施行した。ヒトゲノムデータベース NCBI human genome build 37.1(hg19)と比較した変異部位は 202,073 あり、10 検体の共通変異部位は 5,730 で、このうち SNP が 5,546、Indel が 181 であった。これらのうち、SNP のデータベースに記載されていないものが 1 で、Indel が 135 であった。この 1 つの SNP は Missense 変異であった。

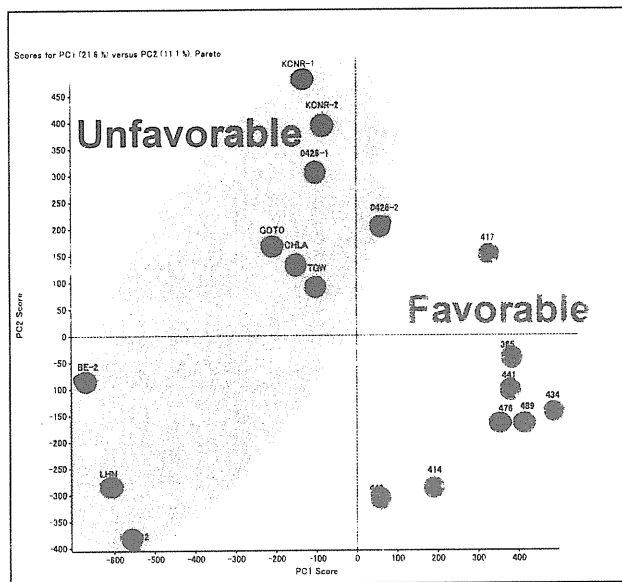


図5 神経芽腫初代培養細胞および細胞株の培養上清のLC-MS解析結果

そこで、本年度は、Sporadic な神経芽腫 187 例にて検討したところ、8 例を除いて同一の変異を少なくとも片側アレルに検出し、47 例はホモまたはヘミの変異であった。病理や病期との関連は認めず、予後良好群、予後不良群両者に同様に認めた。

D. 考察

2003年まで過去20年近く継続された生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業は、過剰診断による不利益から、休止となったが、一方で、この事業で得られたエビデンスを神経芽腫の診断と治療成績向上に確実に結びつけることが必要である。特に休止にあたり、早急に解決すべき点として①本症の罹患と死亡の正確な把握、②マスの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価、③本症による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立、の三点が挙げられ、これに対して国内外のコホートを用

Wild ...getggaac^{tt} cattgtctgg tctagctgt ...
 Variant ...getggaac^{tt} cattgtctgg tctagctgt ...

図6 : 多発例 10 腫瘍共通のミスセンス変異

いてすでに終了している後向き研究に加えて②前向き研究の成果と、③腫瘍特性解析からの新規マーカーによる早期発見法の確立について検証を継続した。

本年は後向き研究の継続として、2006年以降に診断された症例の発生頻度と予後の統計解析と病理所見の検討に加え、これらの後向き研究から得られるエビデンスについての検討を昨年に引き続き行った。2010年度のデータを追加して検討したが、休止後は、1歳未満の症例が減少し、予想通りに2歳以降の症例数が休止後その恩恵をうけなくなった児が2歳に達する時期と一致した2年経過した頃から増加し、小児人口の減

少を鑑みると、ほぼ休止前と同様の発症年齢分布となり、また、欧米とも同様の分布となったことから、6ヶ月の神経芽腫検査事業の本腫瘍における早期診断例の存在は再確認された。

さらに、欧米のデータとの比較でも、6ヶ月の神経芽腫で明らかに1歳未満症例が数倍に増加した一方で、2歳以上の進行例が減少していた。特に、MYCN増幅例が明らかに減少していることから、乳児期にはかなりの数の神経芽腫が発症し、その多くが退縮分化するが、一方で、これらを母地に悪性度の高い腫瘍が発生していることが明らかになった。

そこで、これらの後向き研究の成果を基に、施行された生後18ヶ月の前向き研究グループ成果では、現時点で26症例が発見され、約7,000出生に対して1の割合でほぼ自然発症と同等であり、これらのうち明らかな早期診断症例はなく、有効性を検証する前向き研究の早期施行が強く期待される。

新たな前向き研究を行うにあたり、施行時期の問題と共に新たな検査法の導入の検討を行ってきた。昨年来、血清を用いたMYCN増幅の検討、さらに、血清NM23H1値の測定などを行ってきた。また、昨年度はLC/MS/MSによる網羅的分子追跡法（マスマッピング）により、予後不良な神経芽腫に特異的なマーカーとしてpeptide MHをその候補として見出した。本年度は、直接神経芽腫細胞の培養細胞上清から検索し、Glutamate Decarboxylateが有用なマーカーになる可能性が示唆された。本研究にて、こうしたいくつかの候補蛋白が絞り込まれ、予後不良腫瘍に特化したマーカーによるスクリーニングが可能となると考えら

れ、同定と臨床応用を急いでいる。さらに、この治療が必要な腫瘍に特異的な腫瘍マーカーは、新たなスクリーニング法の開発だけでなく、臨床の場での診断や治療効果の判定に応用可能なマーカーとなる。

また、本年度は、神経芽腫発症への易罹患性に関わるゲノム異常を見出すために、多発例のエクソーム解析を行った。最終解析には至っていないが、今回見出したミスセンス変異は大多数の神経芽腫例に見出されている点は極めて興味深い。

従来、神経芽腫事業中の神経芽腫の発症数の値から推定した変異として、がん遺伝子、がん抑制遺伝子とさらに神経分化誘導制御因子の3つの因子の関与が推定された（図7）が、その最後の神経分化誘導制御因子である可能性が示唆された。また、この遺伝子は一番染色体短腕に存在することも極めて興味深く、今後、この遺伝子及び変異遺伝子の機能解析を神経芽腫での発現形態を検討する予定である。

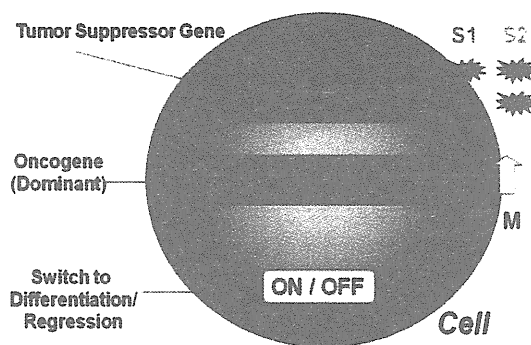


図7：神経芽腫発症パターンから推測される神経芽腫発症関連因子（Pediatric Surgery International 2010 より引用）

E. 結論

6ヶ月施行神経芽マス事業の前後の2,500万以上のコホート解析で、神経芽腫の発症形式とその自然経過について大きな知見を得た。通常の本腫瘍の累積罹患率が(7,000出生に1例)が、この事業を行うと3倍近く(2,500例に1例)に上昇したが、累積死亡率は半減していた。これは、乳児例は相当数が退縮・分化する一方、その中から悪性度を増して進行する腫瘍が存在することを示した。そこで、試験的に行われている18ヶ月神経芽マスは前者の腫瘍の発見はほとんどなく、また、新規マーカーを用いることでより効果的に予後不良例をスクリーニングできる神経芽マス確立が重要になり、これらの確立に向けてさらに検討を継続する。

さらに、血清を用いた悪性度診断法へのアプローチとして、本腫瘍細胞の培養上清からバイオマーカー見出す方法として、低分子マーカーの一斉解析法として LC/MS による網羅的検出をこころみたところ、昨年患者血清からのアプローチに加えてさらに有用な候補マーカーを見出した。これらのデータを蓄積し、予後不良な神経芽腫に特異的なマーカーの候補を絞り込み、診断・治療効果の判定に応用するだけでなく、今後の新たな形のスクリーニングへ応用する。

本年は、稀ではあるが存在する多発例を用いて、易罹患性に関わるゲノム異常を探索した。その結果、候補となるミスセンス変異を見出した。この変異の存在が、本腫瘍発生の一因子となることが分かれば、易罹患群が層別され、より効率のよい早期発見や早期治療が可能となり、今後の本腫瘍の治療成績向上に向けて極めて有用な知見

となると考えられ、早急に解析を継続することとし、次年度の研究に継続する。

F. 健康危険情報

昨年と同様に、生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業は、従来から指摘されている乳児の予後良好な腫瘍を過剰診断してきたが、一方、HPLCによる定量法が導入された1990年以降の群では、明らかに2歳以上の症例が半減し、予後向上に寄与していた。そこで、過剰診断を最小にし、さらに早期発見できるスクリーニングは、生後18ヶ月が適切で、すでに26例が発見され全例生存している。この事業によって、予後不良な年長児の神経芽腫症例が増加することが予想され、今後、18ヶ月の神経芽腫スクリーニングの前向き研究などにて対応を早急に行うべきである。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Iehara T, Hiyama E, Tajiri T, Yoneda A, Hamazaki M, Fukuzawa M, Hosoi H, Sugimoto T and Sawada T: Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12months of age and older really excellent? *Eur J Cancer*. in press.
- 2) Sakabe R, Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Kondo N, Nakashima A, Ohge H, Sueda T and Hiyama E: Prognostic Significance of Telomerase Activity and Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression in Ampullary Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. in press.

- 3) Ueda Y, Hiyama E, Kamimatsuse A, Kamei N, Ogura K and Sueda T: Wnt signaling and telomerase activation of hepatoblastoma: correlation with chemosensitivity and surgical resectability. *J Pediatr Surg* 46: 2221-2227, 2011.
 - 4) Herlambang B, Orihashi K, Mizukami T, Takahashi S, Uchida N, Hiyama E and Sueda T: New method for absolute spinal cord ischemia protection in rabbits. *J Vasc Surg* 54: 1109-1116, 2011.
 - 5) Kanda A, Sotomaru Y, Shiozawa S and Hiyama E: Establishment of ES Cells from Inbred Strain Mice by Dual Inhibition (2i). *J Reprod Dev*, 2011.
 - 6) Yamaoka E, Hiyama E, Sotomaru Y, Onitake Y, Fukuba I, Sudo T, Sueda T and Hiyama K: Neoplastic transformation by TERT in FGF-2-expanded human mesenchymal stem cells. *Int J Oncol* 39: 5-11, 2011.
 - 7) Kojima K, Hiyama E, Otani K, Ohtaki M, Fukuba I, Fukuda E, Sueda T and Hiyama K: Telomerase activation without shortening of telomeric 3'-overhang is a poor prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Sci* 102: 330-335, 2011.
 - 8) Kato Y, Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Hiyama E and Sueda T: Impact of intratumoral thymidylate synthase expression on prognosis after surgical resection for ampullary carcinoma. *J Surg Oncol* 103: 663-668, 2011.
 - 9) Hishiki T, Matsunaga T, Sasaki F, Yano M, Ida K, Horie H, Kondo S, Watanabe KI, Oue T, Tajiri T, Kamimatsuse A, Ohnuma N and Hiyama E: Outcome of hepatoblastomas 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. 学会発表
- 1) Naomi Kamei, Eiso Hiyama, Arata Kamimatsuse, Yuka Ueda, Kaoru Ogura, Taijiro Sueda. Clinical feature of ALK mutated neuroblastoma. 44th Annual Meeting of Pacific Association of Paediatric Surgeons (PAPS). Cancun, Mexico. April 13, 2011.
 - 2) 小倉薫, 檜山英三, 上松瀬新, 亀井尚美, 小林正夫, 中村和洋, 三木瑞香, 浜本和子, 藤田直人. 腹腔鏡補助下脾摘術を行った ALL の 2 例. 第 24 回日本小児脾臓研究会. 山梨県甲府市. 2011 年 5 月 14 日.
 - 3) 兵頭麻希, 音部玲子, 加瀬佳寿江, 家護谷五月, 大原正裕, 松浦伸也, 横崎恭之, 檜山英三, 檜山桂子, 丸山博文, 小林正夫, 村上茂. 遺伝性乳がん・卵巣がん症候群のカウンセリング事例の検討. 第35回日本遺伝カウンセリング学会学術集会. 京都府. 2011年6月6日.
 - 4) 檜山英三. 小児肝癌の国際共同臨床試験とゲノム解析. 第32回IFN治療研究会. 広島市. 2011年6月24日.

- 5) 坂部龍太郎, 村上義昭, 上村健一郎, 首藤毅, 橋本泰司, 中島亨, 大毛宏樹, 末田泰二郎, 檜山英三. 日本消化器外科学会総会胆道癌におけるテロメラゼおよび TERT 発現の検討. 第 66 回日本消化器外科学会総会. 名古屋市. 2011 年 7 月 13 日.
- 6) 池田均, 森川康英, 福澤正洋, 檜山英三. 公知扱いにならないピラルビシンの国内使用実績. 第 48 回日本小児外科学会学術集会. 東京都. 2011 年 7 月 20 日.
- 7) 亀井尚美, 檜山英三, 上松瀬新, 河島茉澄, 末田泰二郎. WAGR 症候群の経過観察中に腎腫瘍を認めた 2 例. 第 48 回日本小児外科学会学術集会. 東京都. 2011 年 7 月 22 日.
- 8) 上松瀬新, 亀井尚美, 檜山英三. 胸腔内悪性神経症腫の 1 例. 第 48 回日本小児外科学会学術集会. 東京都. 2011 年 7 月 22 日.
- 9) 河島茉澄, 檜山英三, 上松瀬新, 亀井尚美, 末田泰二郎. 術後再開通を来した直腸前庭瘻の一例. 第 48 回日本小児外科学会学術集会. 東京都. 2011 年 7 月 22 日.
- 10) 上松瀬新, 亀井尚美, 三木瑞香, 小倉薫, 有廣光司, 小林正夫, 檜山英三. 左腎 MRTK の 1 例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 群馬県前橋市. 2011 年 11 月 25 日.
- 11) 亀井尚美, 檜山英三, 上松瀬新, 三木瑞香, 梶梅輝之, 川口浩史, 中村和洋, 小林正夫, 末田泰二郎. WAGR 症候群の経過観察中に腎腫瘍を認めた 2 例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 群馬県前橋市. 2011 年 11 月 25 日.
- 12) 小倉薫, 檜山英三, 上松瀬新, 亀井尚美, 楠麻由, 三木瑞香, 小林良行, 中村和洋, 小林正夫. 家族性大腸腺腫家系に発生した肝芽腫の 1 例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 群馬県前橋市. 2011 年 11 月 25 日.
- 13) 金丸博, 鎌田綾, 千々松郁枝, 三木瑞香, 世羅康彦, 梶梅輝之, 川口浩史, 中村和洋, 小林正夫, 小倉薫, 檜山英三, 下瀬省二. 全身化学療法・局所放射線照射後に発症した悪性骨腫瘍の 4 例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 群馬県前橋市. 2011 年 11 月 25 日.
- 14) 檜山英三, 小倉薫, 上松瀬新, 亀井尚美. 小児がんへ有効な施策提言のための資料収集とアウトカム指標の抽出. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 群馬県前橋市. 2011 年 11 月 27 日.
- 15) 上松瀬新, 河島茉澄, 亀井尚美, 檜山英三, 但馬剛, 伊藤公訓. 腸重積を合併した Peutz-Jeughers 症候群の 1 例. 第 158 回日本小児科学会 広島地方会. 広島市. 2011 年 12 月 4 日.
- 16) 河島茉澄, 檜山英三, 小倉薫, 上松瀬新, 亀井尚美, 小林正夫, 川口浩史, 三木瑞香, 岩滝真一郎. 腫瘍破裂で発見された肝芽腫の 1 例. 第 158 回日本

小児科学会 広島地方会. 広島市. 2011年 12月 4日.

- 17) 坂部龍太郎, 村上義昭, 上村健一郎, 首藤毅, 橋本泰司, 中島亨, 大毛宏喜, 末田泰二郎, 檜山英三 十二指腸乳頭部癌におけるテロメラゼ活性およびhTERT発現の検討. 第111回日本外科学会定期学術集会. (紙上開催)
- 18) 小林弘典, 村上義昭, 上村健一郎, 首藤毅, 橋本泰司, 中島亨, 大毛宏喜, 湯浅吉夫, 加藤楽, 近藤成, 坂部龍太郎, 檜山英三, 末田泰二郎 胆管癌におけるTS、DPD、OPRT発現とS-1治療効果の相関についての検討. 第111回日本外科学会定期学術集会. (紙上開催)
- 19) 林陽子, 田川浩美, 森原なぎさ, 平野尚子, 檜山英三. 神経芽腫におけるがん幹細胞分離の試み. 第34回日本

分子生物学会年会. 横浜市. 2011年 12月 2日.

- 20) 河島茉澄, 亀井尚美, 上松瀬新, 檜山英三, 重安邦俊, 内藤浩之. 小児外傷性肝損傷4例の経験. 第158回日本小児科学会 広島地方会. 広島市. 2011年 12月 4日.
- 21) Eiso Hiyama. Recent PCR-based analysis for infection and cancer diagnosis. PIPKRA2012. Jakarta, Indonesia, Feb 10, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

マウス肝臓における遺伝子発現とDNAメチル化の網羅的解析

分担研究者 小川 佳宏 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子内分泌代謝学分野 教授

研究要旨 多くの疫学調査により、胎生期の栄養環境が成人期に発症する肥満や生活習慣病に関連する可能性が指摘されている（Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD）。一方、胎生期のみならず個体の成長が著しい新生児期も全身臓器の可塑性が高い時期であり、新生児期の栄養環境が成人期の肥満や生活習慣病の疾患感受性に影響を与える可能性がある。本研究は、従来知見のなかった新生児期の肝臓における*de novo*脂肪合成のエピジェネティクス制御の分子機構の解明を目指す新しい試みである。昨年度までに、肝脂肪合成の律速酵素グリセロール3リン酸アシル基転移酵素（GPAT1）遺伝子プロモーターにおけるDNAメチル化の程度が、遺伝子発現と逆相関することをマウスを用いた実験で明らかにした。本年度は、GPAT1遺伝子のエピジェネティクス制御機構の解析を進めた。新生仔マウス個体および培養細胞を用いた検討により、GPAT1遺伝子プロモーターは、DNAメチル化のみならずヒストン修飾の制御を受け、DNAメチル化酵素および転写因子SREBP1cのリクルート量の変動することにより転写活性が調節されることが明らかになった。さらに、DNAメチル化の網羅的解析法であるMIAMI法（*Oncogene* 25: 3059-3064, 2006）の導入を完了し、胎仔期～新生仔期～成獣期のマウスの肝臓におけるDNAメチル化状態の網羅的な解析を開始した。

研究目的

生活習慣病の発症には塩基配列の変化による遺伝素因のみならず栄養環境を含む環境因子が関与することが知られており、分子基盤の一つとしてエピジェネティクスによる遺伝子発現制御が指摘されている。しかしながら、栄養環境によりエピジェネティクス制御を受ける標的遺伝子は同定されていない。本研究は、生活習慣病の病態に密接に関連する肝臓において胎仔期～授乳期の遺伝子発現変化およびDNAメチル化変化を網羅的に解析し、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにするものである。

研究方法

1. 授乳期～離乳期における肝臓脂肪合成遺伝子の発現変化
新生仔から離乳後のマウス肝臓における脂肪合成酵素(GPAT1, FAS, SCD1)およびこれら脂肪合成酵素の発現を正に制御する転写因

子SREBP1cの遺伝子発現とDNAメチル化変化を検討した。

2. GPAT1プロモーター領域のクロマチン修飾についての検討
クロマチン免疫沈降(ChIP)法により、GPAT1遺伝子のヒストン修飾状態を種々の栄養状態の雄性C57BL6マウスの肝臓について検討した。
3. GPAT1プロモーター領域で複合体を形成する転写因子群の解析
GPAT1プロモーター領域における、SREBP1cとDNAメチル化酵素複合体のリクルート量を新生仔から離乳後のマウス肝臓を用いて検討した。
4. 肝臓における遺伝子発現とDNAメチル化パターンの網羅的解析
胎生期～新生仔期～成獣期のマウス肝臓における遺伝子発現とプロモーター領域のDNAメチル化を網羅的に解析するため、

MIAMI 法 (Oncogene 25: 3059-3064, 2006) を導入し、反応条件を最適化した。

(倫理面への配慮)

実験に用いた動物に対しては、動物愛護上の配慮として、長時間にわたり強い苦痛をもたらす方法を適用する時には、しかるべき鎮痛、鎮痛剤、または麻酔剤を獣医学的に認められた方法を用い、あるいは適切な麻酔剤を用いて安楽死させた。

研究結果

1. SREBP1c および GPAT1, FAS, SCD1 mRNA の mRNA の発現は新生仔ではほとんど検出されないが、成獣では著しく増加した。GPAT1 プロモーター領域には、SREBP1c 応答配列 (SRE) が 3 カ所あり、その SRE を含む約 0.5kb について bisulfite 法によりメチル化を検討した。新生仔では高い DNA メチル化が検出されたが、成獣ではほとんどメチル化が確認できず、GPAT1 プロモーター領域のメチル化と mRNA の発現は逆相関していた。DNA メチル化の変化は GPAT1 遺伝子プロモーターに特異的であり、他の脂肪合成遺伝子には認められなかった。
2. GPAT1 プロモーター領域には、SREBP1c 応答配列 (SRE) が 3 カ所あり、その SRE を含む領域についてクロマチン免疫沈降(ChIP)法により、ヒストン修飾状態を検討した。転写活性型のヒストン修飾である H3K4me3 (ヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化) および H3K9Ac (ヒストン H3 の 9 番目のリジンのアセチル化) は新生仔で低く、成獣で顕著に増加した。一方、転写抑制型のヒストン修飾である H3K9me2 (ヒストン H3 の 9 番目のリジンのジメチル化) は新生仔で高く、成獣で低下した。
3. GPAT1 プロモーターの SRE 領域について ChIP 法により、SREBP1c と DNA メチル化酵素のリクルート量を検討した。SREBP1c のリクルート量は新生仔で低く、成獣で顕著に増加した。一方、新規 DNA メチル化酵素である Dnmt3b が新生仔で顕著にリクルートされ、成獣においては GPAT1 プロモーターから解離することが明らかになり、DNA メチル化

が Dnmt3b によって制御される可能性が示唆された。

4. ゲノム DNA をメチル化感受性制限酵素 HpaII およびメチル化非感受性制限酵素 MspI で処理後、PCR 法により 2 サンプル間で切断に差異のある領域を増幅し、DNA アレイにより検出する系を確立した。さらに、コンピュータープログラムを改良し、ゲノムワイドな DNA メチル化解析を可能とした。新生仔および成獣肝臓サンプルを用いて解析を開始している。

考察

肝脂肪合成の律速酵素グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素 (GPAT1) 遺伝子プロモーターにおける DNA メチル化の程度は遺伝子発現と逆相関していた。DNA メチル化の変化は GPAT1 遺伝子プロモーターに特異的であり、他の脂肪合成遺伝子には認められなかった。In vitro の検討により、DNA メチル化およびヒストン修飾により転写因子 SREBP1c と DNA メチル化酵素複合体の GPAT1 遺伝子プロモーターへのリクルート量が変化し、転写活性が制御されることが示された。以上より、DNA メチル化により GPAT1 遺伝子はエピジェネティクス制御を受けることが示唆された。

結論

本研究により、*de novo* 脂質合成の律速酵素である GPAT1 遺伝子はエピジェネティクス制御を受けることが示唆された (図)。今後、新生仔～成獣マウスの肝臓サンプルについて DNA メチル化と遺伝子発現を網羅的に解析する予定である。

*健康危険情報

なし

研究発表

論文発表

1. M. Ichioka, T. Suganami, N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, N. Satoh-Asahara, Y. Shimoda, M. Tanaka, M. Kim-Saijo, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, Y. Ogawa. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. *Diabetes* 60: 819-826, 2011.
2. N. Satoh-Asahara, T. Sugamami, T. Majima, K.

Kotani, Y. Kato, R. Araki, K. Koyama, T. Okajima, M. Tanabe, M. Oishi, A. Himeno, S. Kono, A. Sugawara, M. Hattori, Y. Ogawa, A. Shimatsu; The Japan Obesity Metabolic Syndrome Study (JOMS) Group. Urinary cystatin C as a potential risk marker for cardiovascular disease and chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 265-273, 2011.

3. M. Tanaka, T. Suganami, M. Kim-Saijo, C. Toda, M. Tsuiji, K. Ochi, Y. Kamei, Y. Minokoshi, Y. Ogawa. Role of central leptin signaling in the starvation-induced alteration of B cell development. *J. Neurosci.* 31: 8373-8380, 2011.

4. S. Sugita, Y. Kamei, F. Akaike, T. Suganami, S. Kanai, M. Hattori, Y. Manabe, N. Fujii, T. Takai-Igarashi, J. Oka, H. Aburatani, T. Yamada, H. Katagiri, S. Kakehi, Y. Tamura, S. Takasuga, T. Sasaki, H. Kubo, K. Nishida, S. Miura, O. Ezaki, Y. Ogawa. Metabolic analysis of transgenic mice overexpressing RXR γ in skeletal muscle: increased glucose tolerance and suppression of

obesity-induced fatty liver. *PLoS ONE* 6: e20467, 2011.

5. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida, Y. Ogawa. Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Am. J. Pathol.* 179: 2454-2463, 2011.

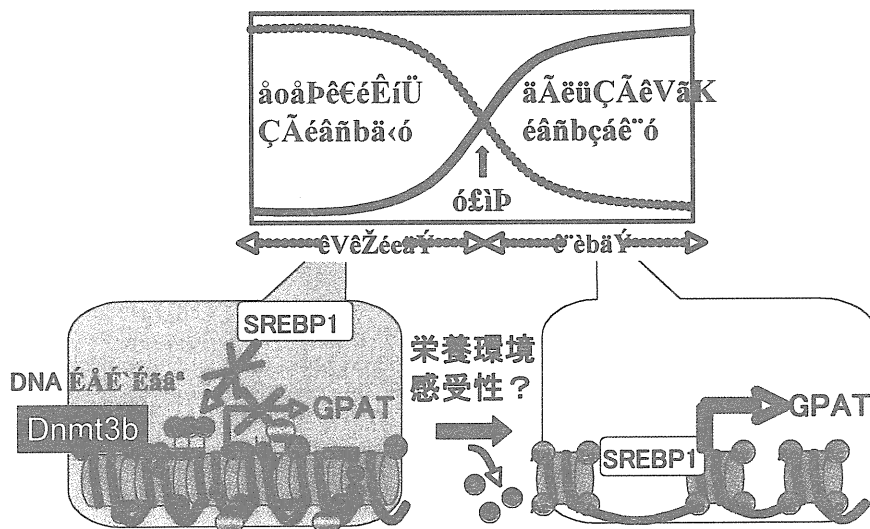
学会発表

1. Yoshihiro Ogawa : Epigenetic Regulation of Metabolic Diseases : THE ENDOCRINE SOCIETY'S 93RD ANNUAL MEETING & EXPO(ENDO2011), 2011.6.4-7, Boston
2. 江原達弥、亀井康富、金井紗綾香、高橋真由美、袁勳梅、菅波孝祥、小川佳宏 : 「グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素 (GPAT1) 遺伝子の DNA メチル化による発現制御」第 32 回日本肥満学会学術大会, 2011.9.23-24, 淡路

知的財産権の出願・登録状況

なし

図



(図)本研究のまとめ(仮説)

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakaoka H, Cui T, <u>Tajima A</u> , Oka A, Mitsunaga S, Kashiwase K, Homma Y, Sato S, Suzuki Y, Inoko H, Inoue I	A systems genetics approach provides a bridge from discovered genetic variants to biological pathways in rheumatoid arthritis	PLoS One	6(9)	e25389	2011
Namba F, Ina S, Kitajima H, Yoshio H, Mimura K, Saito S, <u>Yanagihara I</u> .	Annexin A2 in amniotic fluid: Correlation with histological chorioamnionitis, preterm premature rupture of membranes, and subsequent preterm delivery.	J Obstet Gynaecol Res.	38(1)	137-144	2012
Hayashi M, Saito-Miwa N, Tanuma N, <u>Kubota M</u>	Brain vascular change in Cockayne syndrome. Neuropathology	Neuropathology	doi:10.1111/j.14401789.2011.01241.x.	[Epub ahead of print]	2011
Mimura K, Tomimatsu T, Minato K, Jugder O, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Nozaki M, <u>Yanagihara I</u> , Kimura T.	Ceftriaxone preconditioning confers neuroprotection in neonatal rats through glutamate transporter 1 upregulation.	Reprod Sci	18(12)	1193-1201	2011
Nakai A, Minakami H, Unno N, <u>Saito S</u> , Morikawa M, Yoshimura Y, Terao T	Characteristics of pregnant Japanese women who required hospitalization for treatment of pandemic (H1N1) 2009.	J Infect	62	232-233	2011
<u>Saito S</u> , Nakashima A, Ito M, Shima T	Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology	Expert Rev Clin Immunol	7	649-657	2011
Matsuda M, Kawamichi Y, Shiozaki A, <u>Saito S</u> , Hayashi H	Comparison of risk factors for placental abruption and placenta previa: case-cohort study	J Obstet Gynecol Res	37	538-546	2011

O'Doherty AM, Rutledge CE, Sato S, Thakur A, Lee-Murdock DJ, <u>Hata K</u> , Walsh CP	DNA methylation plays an important role in promotor choice and protein production at the mouse Dnmt3L locus	Dev Biol	356	411-420	2011
Swallowwood SA, Tomizawa S, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-Pichon A, Sato S, <u>Hata K</u> , Andrewes SR, Kelsey G	Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos	Nat Genet	43	811-814	2011
Yamada Y, Nishi A, Ebara Y, Kato M, Yamamoto H, Morita H, Nomura I, <u>Matsumoto K</u> , Hirato J, Hatakeyama SI, Suzuki N, Hayashi Y.	Eosinophilic gastrointestinal disorders in infants: a Japanese case series.	Int Arch Allergy Immunol.	155 Suppl 1	40-45	2011
Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, <u>Kubota M</u> , Saito Y, Takanashi JI, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M	Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes.	Brain Dev	PMID: 2192457	[Epub ahead of print]	2011
<u>Hashimoto K</u> , Miyamura K, Honda M.	Evaluation of Ability for Basic Movement Scale for Children Type T (ABMS-CT) for disabled children	Brain & Development	in press		
Shigeta N, Ozaki K, Hori K, Ito K, Nakayama M, Nakahira K, <u>Yanagihara I</u>	First report of <i>Arthrobacter</i> spp. bacteremia with intrauterine fetal death (IUFD) and maternal disseminated intravascular coagulopathy (DIC).	Fetal and Pediatric Pathology	in press		

Vujaklija DV, Gulic T, Susic S, Nagata K, Ogawa K, Laskarin G, <u>Saito S</u> , Haller H, Rukavina D	First trimester pregnancy decidual natural killer cells contain and spontaneously release high quantities of granulysin.	Am J Reprod Immunol	66	363-372	2011
<u>Watanabe N</u> , Suzuki T, Ogawa K, Kubo T, Sago H.	Five-year study assessing the feasibility and safety of autologous blood transfusion in pregnant Japanese women	The Journal of Obstetrics and Gynaecology Reseach	Dec;37(12)	1773-1777	2011
Nomura I, Morita H, Hosokawa S, Hoshina H, Fukuie T, Watanabe M, Ohtsuka Y, Shoda T, Terada A, Takamasu T, Arai K, Ito Y, Ohya Y, Saito H, <u>Matsumoto K</u> .	Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms.	J Allergy Clin Immunol.	127	685-688e1-8	2011
<u>Saito S</u> , Nakashima A, Shima T	Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies	J Reprod Immunol	90	91-95	2011
Fukami M, Muroya K, Miyake T, Iso M, Kato F, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, Ogata T.	GATA3 abnormalities in six patients with HDR syndrome.	Endocr J.	58	117-121	2011

<p>Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H.</p>	<p>Genome-Wide Association Study Identifies HLA-DP as a Susceptibility Gene for Pediatric Asthma in Asian Populations.</p>	<p>PLoS Genet.</p>	<p>7</p>	<p>e1002170</p>	<p>2011</p>
<p><u>Matsumoto K</u>, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H.</p>	<p>Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro.</p>	<p>Int Arch Allergy Immunol.</p>	<p>155Suppl1</p>	<p>34-39</p>	<p>2011</p>
<p>Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, <u>Horikawa R</u>, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K. Japan Growth Genome Consortium.</p>	<p>Identification and functional analysis of novel human growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) gene mutations in Japanese subjects with short stature.</p>	<p>Clin Endocrinol (Oxf)</p>	<p>74</p>	<p>223-233</p>	<p>2011</p>
<p>Nakabayashi K, <u>Taiima A</u>, Yamamoto K, Takahashi A, Hata K, Takashima Y, Koyanagi M, Nakaoka H, Akamizu T, Ishikawa N, Kubota S, Maeda S, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Sasazuki T, Shirasawa S</p>	<p>Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population.</p>	<p>J Hum Genet</p>	<p>56(11)</p>	<p>772-778</p>	<p>2011</p>