

20118026A

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略 研究事業

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

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清河 信敬

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

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

II. 分担研究報告

1. 臨床応用を目的とした難治性小児がんの発症・治療モデルの構築 ----- 11
清河信敬
2. 小児がんの分子病理所見に基づく悪性度の判定とその治療への応用 ----- 16
中川温子
3. 難治性小児リンパ系腫瘍の分子プロファイリングとその臨床応用 ----- 20
森鉄也
4. 難治性小児固形がんのエピゲノムを中心とした生物学的特性解析と
新規診断・治療法開発への応用 ----- 24
大喜多肇
5. 小児がんの臨床特性にかかわる遺伝子変異解析とその診断治療への応用 ----- 27
林泰秀
6. 難治性小児リンパ系腫瘍に対する分子 MRD 量に基づく治療法の開発研究 ----- 32
鶴澤正仁
7. 難治性小児腫瘍のゲノムプロファイリングによる臨床病態・予後指標の探索 ----- 35
小川誠司
8. ゲノム・遺伝子発現情報からみた小児がんの臨床的特性の解明と治療への応用 ----- 39
大平美紀
9. 腫瘍細胞特異的遺伝子発現の経時的変化と治療の有効性についての研究 ----- 42
福島敬

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 48

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 51

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

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

研究要旨： 難治性小児がんの治療予後向上を目的に、臨床的特性に関する分子情報の網羅的体系的解析を組織的・包括的に継続した。これまでの成果の臨床応用に向けた研究、特に難治性小児がんの治療層別化法の確立に重点を置いて検討を進めた。1) 分子情報に基づく治療層別化法の臨床応用： B 前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病(ALL)の難治例の層別化に有用な分子情報に基づく MRD 量のモニタリングに関し、Immunoglobulin/T cell receptor 遺伝子再構成を利用した定量 PCR 法、10 カラーフローサイトメトリー法、キメラ遺伝子を標的とした定量 PCR 法の3つの方法の確立と臨床的有用性についての解析を行い、実用化に向けた検討を進めた。本邦の Early T-cell precursor ALL の詳細な発現遺伝子解析を行ないその特性を明らかにし、現行の治療に対する予後について解析した。骨肉腫においてゲノムプロファイル化学療法感受性のマーカーとなる可能性を明らかにし、神経芽腫群腫瘍 (NB) のより有用な予後予測法開発を目指してゲノム分類と病理組織分類における関連性について検討した。2) 小児がん発症、治療モデルの構築と解析：先行研究の成果に基づき、短縮型 ALK の構造解析ならびに機能解析を行い、NB の発がんメカニズムに寄与している可能性を示した。Burkit リンパ腫特異的因子 ZNF385B の機能解析を行ない、アイソフォームに依存して、アポトーシスに対する抑制と促進の双方向への作用を有することを示した。3) 難治性小児がんの分子プロファイリングと標的因子探索：小児腎肉腫のエピゲノム解析を行い、鑑別診断に有用なメチル化プロファイルを明らかにした。AML の NUP98-関連キメラに関して検討し、正常核型と考えられる症例の一部に NUP98-NSD1 再構成を有する症例が含まれ、予後不良の可能性を示した。今後、これまでに得られた知見に基づく治療層別化法の臨床応用に関する研究を重点的に進める。

研究分担者

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

A. 研究目的

小児がんは小児期死亡の主要原因の上位を占め、成育医療分野では非常に重要な疾患である。近年小児がんの治療成績は著しく向上し、多くの症例で治癒が望

める状況にある。しかし、一部に依然として治療抵抗性で再発を繰り返す亜群が存在し、分子標的療法などのより有効な治療法の開発が望まれている。逆に、治療反応例については、高い治療効果を維持しつつも、晩期障害の軽減と QOL 向上を目指した、治療の軽減が重要な課題となっている。その克服には、全ゲノム構造やエピゲノム異常、遺伝子・蛋白発現等の網羅的解析による包括的な分子異常解明を行って、難治性症例や治療反応例を事前に鑑別可能な層別化法の確立や、新規治療法の標的となる病因分子の探索が必須である。また、小児がんは種類が多いため、病型ごとの症例数は非常に少ないものもあり、上記目的達成のためには、組織的・包括的な取り組みが不可欠である。

そこで本研究では、全国規模の研究グループで、ほぼすべての小児がんを網羅

する日本小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG、造血器腫瘍）および小児固形がん臨床試験共同機構（6つの小児固形がん臨床研究グループが共同で運営する臨床試験の共通部分に関する共同機構）と密接に連携し、Ewing肉腫、横紋筋肉腫、Wilms腫瘍、神経芽腫、難治例や再発例を含む小児白血病等について、臨床検体に対する包括的・体系的な生体分子情報解析（オミックス）手法を用いて、その臨床的特性に関する分子情報プロファイルを網羅的に明らかにし、得られた知見に基づいて培養細胞やモデル動物を用いた小児がんの発症・治療モデルを構築、解析して、層別化を含む新規診断法や、新規治療法開発を行い、臨床応用することを目的とする。特に、我国の小児がん関連の臨床・基礎の研究組織と相互補完的に研究を進め、他で実施されていない分野において現在臨床の場で早急に実用化が求められている治療層別化法の開発や、これまで検討が遅れていた疾患についての集中的な網羅的分子特性解析などを進めるとともに、先行研究の成果を治療研究に反映させることに重点をおく。

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

B. 研究方法

1. 対象：倫理的手続きを経て、研究への使用について同意が得られた小児がん患児の臨床検体を用いた。
2. DNA異常の解析：腫瘍試料から抽出したゲノムDNAにつき、GenChip 50K/250K Array、(Affimetrix社)、ヒトオリゴアレイ(Agilent社)あるいはBACアレイ(UCSF製)を用いて網羅的ゲノムコピー数解析を行った。
3. 抽出したDNAに対して、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、

Bioconductor in Rを用いて、階層的クラスタリングを行った。上記解析により選択された10遺伝子のCpG islandのメチル化状態をEpiTYPER assay(SEQUENOM)によって、さらに詳細に解析した。一部の遺伝子については、バイサルファイトしたゲノムDNAを用いてCpG island内の特定の領域をPCRで増幅し、CpGサイトを認識する制限酵素であるHpyCH4IVで消化してそのバンドのパターンでメチル化状態を解析するCOBRA assay法を確立した。

4. 網羅的遺伝子発現解析とRNA異常の解析：小児腫瘍細胞検体からtotal RNAを抽出し、WT-Ovation Pico RNA Amplification System(NuGen社)によりcDNAを合成、増幅し、Affimetrix社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayにより網羅的遺伝子発現を行った。得られたデータはGeneSpring(Agilent社)を用いて解析した。

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

5. 分子MRD量解析：初発時のALL細胞から抽出したDNAにIg/TCRのmultiplex PCRによってMRDターゲットを検出し、直接塩基配列によりプライマーを設定して、定量PCRを行った。

6. 小児ALLのマーカー解析：10カラー全血法の蛍光染色を行いフローサイトメトリーにより解析した。

7. 分子病理学的解析：パラフィン切片HE染色標本の病理診断に加え、各病型や組織型に応じた免疫組織化学染色およびRT-PCR, FISH法による分子病理学的解析をおこなった。

8. 標的遺伝子の機能解析：テトラサイクリン依存的な発現誘導系を用いて、培養細胞に標的遺伝子を発現させ、その機能解析を行なった。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 分子情報に基づく治療層別化法の臨床応用：これまでの成果に基づく難治性小児がんの治療層別化法の確立と、その臨床応用に向けた研究を継続した。

i) B 前駆細胞性 (BCP-) 急性リンパ芽球性白血病 (ALL) を代表とする小児リンパ系腫瘍は最も頻度が高い小児がんであり、全般的な治療成績の向上に伴って、依然として一部に存在する治療抵抗性の難治例への対処が重要な課題となっている。これに対して近年治療経過中の残存白血病細胞の数が独立した予後因子であることが報告され、微小残存病変 (MRD) 量のモニタリングによって難治例を層別化し治療法を強化することが、難治例の予後向上に有効であることが国際的に確立されつつある。治療法の違いや人種差による影響により、有効な検出法や、層別化における閾値の設定が異なると考えられることから、我が国独自の検討が必要である。そこで本研究では、急性リンパ性白血病 (ALL) およびリンパ芽球性リンパ腫 (LBL) を対象とし、分子情報に基づく MRD 量のモニタリングによる治療層別化法の臨床応用に向けた研究を行なっている。

鶴澤は、再発 ALL/LBL、乳児白血病に対する免疫受容体 Immunoglobulin/T cell receptor (Ig/TCR) 遺伝子再構成を利用した定量 PCR による「分子 MRD 法」による腫瘍細胞のクロナリティの変化及び治療後の骨髄 MRD 量の定量解析の研究を進めた。本年度は 46 例 (再発 ALL 23 例、再発 LBL 2 例、乳児白血病 21 例) の解析を実施し、49 種類のプライマーを用いて 32 例で MRD 解析の標的となる再構成の検出が可能であった。現在解析中および検体待ちの症例を除き 10 例において MRD 定量が可能であった。定量における MRD レベルは 10^3 未満が 8 例、 10^3 以上が 2 例であった。

MRD 検出では、上記定量 PCR 法が最も確立された方法であるが、コストが高く高度な技術を必要とし、標的となる遺伝子再構成を検出できない場合がある。そこで、本研究では、これを補完する他の解析法についても検討を行っている。清河は、昨年確立した 10 カラーフローサイトメトリーを用いた MRD 検出法につい

て検討を進めた。今年度、のべ 289 例

(同一症例の治療経過中の異なる病日の解析を含む) について解析した結果、正常細胞の場合は、B 細胞の分化段階に応じて CD58/CD38/CD44/CD45RA の 4 つの抗原の発現量が常に一定であるのに対して、白血病細胞ではこのうちの少なくとも一つ以上の抗原の発現量が正常の値からはずれることが明らかになり、上記抗原の発現を同時に測定することで、ほぼ全例で正常と白血病細胞を区別し、MRD 検出が可能と考えられた。この方法では、初発時の情報がなくても MRD 検出が可能である利点が明らかとなった。

福島は、キメラ遺伝子を標的とした定量 PCR による MRD 定量法について検討を進め、今年度 172 例の初発診断時スクリーニングによって 48 例にキメラ遺伝子 (TEL-AML1 29、E2A-PBX 6、Minor/major BCR-ABL 5、MLL-AF4/AF9/ENL 5、SIL-TAL1 3) が検出された。前年度から MRD を追跡している症例を加えた全 193 例について治療後のキメラ遺伝子定量解析を実施した結果、キメラ遺伝子ごとに消失時期の分布は異なり、予後不良因子である BCR-ABL や MLL キメラでは消失が遅い傾向を認め、また同一リスク群でもキメラ消失時期に多様性を認めた。

ii) Early T-cell precursor (ETP-) ALL は、近年、発現遺伝子プロファイリングによって同定された T-ALL の亜群であるが特徴的なマーカー蛋白の発現によって区別可能で、極めて予後不良な一群として報告されていることから、本邦の ALL の治療プロトコールのリスク分類の中でのその位置づけについて早急に決定する必要性が求められている。清河は昨年度、マーカー所見の解析から、本邦における ETP-ALL の発症頻度が T-lineage ALL の 20.5% と欧米よりもやや高いことを明らかにしたが、本年度は上記症例のうち ETP-ALL 18 例と T-ALL 68 例等の網羅的な発現遺伝子プロファイリングを行い、特徴を比較した。その結果、1) ETP-ALL と診断された症例では、幹細胞関連遺伝子の高発現と T 細胞関連遺伝子の低発現など、欧米の症例で報告されている遺伝子発現の特徴が確認された。新たな所見として、2) 上記遺伝子群の発現でみた場合、ETP-ALL、 $\gamma \delta$ -T-ALL、NK 白血病、AML は

類似した遺伝子発現様式を示し、T-ALLとは異なった特徴を示すこと、3) ETP-ALLとAML M0は時に鑑別が困難であるが、T細胞関連遺伝子の発現に着目すると両者の鑑別が可能と考えられた。4) T-ALLのうちETP-ALL様であるがCD5が強陽性である5例（以下、ETP-likeと表記）が存在し、遺伝子発現の特徴もETP-ALLに類似していた。上記症例のうち、観察期間4年以上の41例（ETP-ALL 9例、ETP-like 5例を含む）について、予後について解析した結果、ETP-ALLは、最高リスク群に分類される症例が多く、再発率、死亡率ともT-ALLと比較して予後不良の傾向を認めた。一方、ETP-likeは全例が無病生存中であった。

iii) 大平は、ゲノムおよび発現遺伝子プロファイリングを基盤とした難治性小児がんの治療層別化法の開発を行っており、昨年度までに肝芽腫に対する簡便な層別化法のプロトタイプを確定している。今年度は、骨肉腫に対する層別化法開発を目指し、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、アレイCGH法によるゲノムプロファイル解析を進めた。治療法は世界標準治療に基づき、1stラインのMAP療法により奏効を確認した後、レスポンス不良であった症例群に対しては2ndライン治療としてIFOを使用した。MAP療法奏効群8例、IFO奏効群6例、最終的な不奏効群8例の3群間でゲノムコピー数変化のプロファイルの比較を行った結果、昨年度抽出した12q領域に加え、5p、9q領域がさらなる候補として抽出された。

iv) 中澤は、神経芽腫群腫瘍（NB）におけるゲノム分類と病理組織分類における関連性について検討した。NBのINPC国際神経芽腫病理分類は予後因子としても重要であり、MYCN遺伝子増幅とともに治療の層別化に用いられている。一方、近年の網羅的な遺伝子解析によるゲノム分類により、神経芽腫群腫瘍の予後予測が試みられている。そこで、ゲノム分類が行われたNB症例で治療前の病理組織診断が可能であった92例を対象に、両者の関連性について検討した。ゲノムのパターンにより、1) N-myc増幅を除く異常を認めないS群ではFavorable Histology (FH)とUnfavorable Histology (UH)が5:3であった

が、2) 部分的に異常を認めるP群ではUHが44/49例と多く、逆に3) ゲノム全体に異常を認めるW群ではFHが27/35と多く、ゲノム分類とINPC病理分類との相関が有意に認められることが判明した。

2. 小児がん発症、治療モデルの構築と解析:これまでの成果および現在進めている研究の成果をもとに、小児がん発症、治療モデルの構築と解析を目指している。

i) ALKは神経細胞に特異的に発現する膜受容型チロシンキナーゼであり、神経芽腫の標的分子の一つであり、その約10%に変異や増幅が報告されているが、転座等の異常は報告されていない。小川はこれまでに神経芽腫細胞株30株におけるALK蛋白の発現解析を行いNB-1細胞株で短縮型ALKを見出したため、短縮型ALKの構造解析ならびに機能解析を行った。SNPアレイおよびRT-PCRにより、NB-1ではintron 1と4に切断点を有し、exon2、3が欠失するアレルが優位に高度増幅していることが判明した。短縮型ALKをマウスの線維芽細胞(NIH3T3)に強制発現させると自己リン酸化や下流分子の活性化が見出された。また短縮型ALK発現細胞では有意なコロニー増生能が観察され、さらにin vivoにおいても造腫瘍能が認められた。

ii) 清河は、これまでの分子プロファイリング解析の過程で、バーキットリンパ腫（BL）特異的な発現分子としてジंकフィンガー（ZF）型蛋白ZNF385Bを同定しており、この分子をテトラサイクリン存在化で誘導可能なB細胞株を樹立し、その機能を検討した。ZNF385Bには、ZFドメインを4つ有するタイプ1と、N末側の1つを欠き3個有するタイプ2,3のアイソフォームが同定されている。検討の結果、タイプ1はそれ自体がアポトーシス誘導性に作用するが、タイプ2,3に相当するタイプ1のN末側欠損変異体は、逆にB細胞のアポトーシス誘導を抑制することが明らかとなった。

3. 難治性小児がんの分子プロファイリングと標的因子探索:これまで網羅できなかった難治性小児がんについて新たな解析手法を用いた分子プロファイリングを行い、新規標的因子の探索を行っている。

i) 小児期に好発する腎の肉腫性病変である腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍、

Ewing 肉腫は、予後や治療法が全く異なるが、病理学的診断による鑑別が困難な場合がある。大喜多は、上記腫瘍と正常腎組織各 3 例について、BeadChip を用いた網羅的メチル化解析を行って各病型のエピゲノムの特徴を明らかにした。さらに、それぞれの腫瘍に特異的に高メチル化、低メチル化な 16 プローブを抽出したところ、腫瘍特異的なメチル化パターンのみで各腫瘍を分類可能であった。特に、この中から選択した一遺伝子のプロモーター領域近傍の CpG アイランドのメチル化解析のみで、高い感度と特異度で腎明細胞肉腫を他の小児腎腫瘍から鑑別可能であった。

ii) 林は、小児急性骨髄性白血病 (AML) 138 例について、成人 AML で予後不良因子として報告された DNA メチルトランスフェラーゼ *DNMT3A* 遺伝子の変異について、エクソン 17 からエクソン 23 までの RT-PCR-直接塩基決定法で解析を行ったが、変異は全く見られなかった。一方、*NUP98* 再構成を有する症例は有意に予後不良との報告があることから、*NUP98-NSD1,2,3* の転座について PCR 法と直接塩基決定法で解析を行った結果、5/138 (3.6%) に *NUP98-NSD1* 転写産物を認めたが、*NUP98-NSD2*、*NUP98-NSD3* の転写産物はみられなかった。5 例中 3 例は正常核型 (いずれも死亡)、2 例は 9q- の症例 (いずれも生存) であり、全例、染色体 G-banding では t(5;11) は同定不可能であった。

D. 考察

1. 分子情報に基づく治療層別化法の臨床応用:

本研究で検討を進めている分子 MRD 法による残存腫瘍細胞定量に基づいた予後層別化は、海外ではその臨床的有用性がすでに確認されており、わが国でも治療研究への早期導入が期待されている。これまでに、本邦の実情に合わせた MRD 検出の方法論とその有用性についての検討が進んでおり、最も確立された方法である Ig/TCR 遺伝子再構成を利用した定量 PCR 法に、10 カラーフローサイトメトリーを用いた MRD 検出法やキメラ遺伝子を標的とした定量 PCR 法を組み合わせることで、対象症例のほぼすべての MRD 定量が可能

になり、本法による予後層別化の導入によって、難治性 ALL/LBL の治療予後の向上が期待される。研究期間内の臨床研究への導入を目指してさらに検討を進める。

これまでの検討で、我国の T-ALL のうち約 2 割程度に、欧米で報告されている ETP-ALL と同一の分子特性を有する疾患群が存在することが明らかとなった。症例数が少ないため、予後に関する検討は十分ではないが、本邦の治療プロトコルは現状でも ETP-ALL に対して一定の治療効果を示している可能性が考えられる。一方、ETP-like の症例は全例が無病生存中であり逆に予後良好の亜群の可能性が考えられた。双方を区別する、CD5 の発現が、予後予測の上で非常に重要と考えられる。今後、症例数を増やし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ついては、特に不奏効群を特化する可能性が高い 9q 欠失と 12q 増加の組み合わせは治療方針の決定に非常に有用であると期待される。今後さらに新規症例を加え、評価を進め、骨肉腫の治療層別化法の確立を目指す。

NB におけるゲノム分類と病理組織分類における関連性については、今後両者を組み合わせることで、さらに有用な層別化法の確立が期待される。

2. 小児がん発症、治療モデルの構築と解析:

神経芽腫の病態における ALK の解析では、従来明らかにされていた変異や増幅に加えて短縮型 ALK も、その発がんメカニズムに寄与し、治療の標的となりうることを示された。

BL 特異的に発現する ZNF385B はアイソフォームに依存してアポトーシス制御に対して抑制と促進の双方向に作用する分子であることが明らかになった。今後さらに解析を進め、同分子の BL の病態における意義について検討を行なう。

3. 難治性小児がんの分子プロファイリングと標的因子探索:

小児腎肉腫のエピゲノム解析については、特定の遺伝子の CpG アイランドのメチル化解析のみで、腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍、Ewing 肉腫、Wilms 腫瘍を鑑別可能であり、さらに、この遺伝子のメチル化は COBRA 法でも検出可能で

あることから、新たな鑑別診断法として応用可能と考えられ、さらに検討中である。

AML の *NUP98*-関連キメラに関しては、正常核型の症例の一部に *NUP98-NSD1* 再構成を有する症例が含まれ、またこれらの症例は予後不良の可能性があることから、今後、AML のリスク分類において、*NUP98-NSD1* 異常を層別化因子として考慮する必要があると考えられ、さらに検討中である。

E. 結論

先行研究で得られた知見をもとに、分子情報に基づく治療層別化法の臨床応用に関する研究を進め、ALL の分子 MRD 法による層別化法や、ゲノムプロファイル解析に基づく骨肉腫の化学療法感受性予測法について実用化に向けた検討を行った。また、難治性小児がんの分子プロファイリングを進めて診断・治療の標的因子を探索し、同定された標的因子候補について小児がんの発症、治療モデル構築を目的とした解析を行なった。今後さらに、これまでの研究成果の臨床への応用の実現に力を注ぎ、難治性小児がんの治療予後向上に寄与することを目指して、研究を進める。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohta H, Iwamoto S, Kiyokawa N, Tsurusawa M, Deguchi T, Takase K, Fujimoto J, Horibe K, Komada Y. Flow cytometric analysis of de novo acute myeloid leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* 2011 Jan;93(1):135-7.
- 2) Iwamoto S, Deguchi T, Ohta H, Kiyokawa N, Tsurusawa M, Yamada T, Takase K, Fujimoto J, Hanada R, Hori H, Horibe K, Komada Y. Flow cytometric analysis of de novo acute lymphoblastic leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* 2011 Aug;94(2):185-92.
- 3) Inukai T, Kiyokawa N, Campana D, Coustan-Smith E, Kikuchi A, Kobayashi M, Takahashi H, Koh K, Manabe A, Kumagai M, Ikuta K, Hayashi Y, Tsuchida M, Sugita K, Ohara A. Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results of the

Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Brit J Haematol.* 2012 Feb;156(3):358-365.

- 4) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol.* 2011 ;11:22.
- 5) Nakagawa A, Matsuoka K, Okita H, Iwafuchi H, Hori H, Kumagai M. Neuroblastoma with discordant genotype-phenotype relationship: Report of four cases with MYCN amplification and favorable histology. *Pediatr Devel Pathol* 14:87-92, 2011
- 6) Akter J, Takatori A, Hossain MS, Ozaki T, Nakagawa A, Ohira M, Suenaga Y, Nakagawara A. Expression of NLR3 orphan receptor gene is negatively regulated by MYCN and Miz-1, and its downregulation is associated with unfavorable outcome in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2011 Nov 1;17(21):6681-92.
- 7) Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanazaki R, Park MJ, Kanno Y, Takahara T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. *Blood.* (in press)
- 8) Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene* (in press)
- 9) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia. *Blood* (in press)
- 10) Shiba N, Taki T, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012 Feb;156(3):413-414.
- 11) Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2011 (in press)
- 12) Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Sci* 2011 Sep;102(9):1645-1650.
- 13) 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* 2011 Aug;25(8):1356-1358.

14) Sekimizu M, Sunami S, Nakazawa A, Hayashi Y, Okimoto Y, Saito AM, Horibe K, Tsurusawa M, Mori T. Chromosome abnormalities in advanced stage T-cell lymphoblastic lymphoma of children and adolescents: a report from Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) and review of the literature. *Br J Haematol.* 2011 Sep;154(5):612-617.

15) 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):382-384.

16) Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Science* 2011 Feb;102(2):302-308.

17) Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koeffler HP, Ogawa S. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia.* 25:184-186, 2011

18) Tsurusawa M. Standard therapy and current research topics for childhood/adolescent acute lymphoblastic leukemia. *Rinsho Ketsueki.* 2011 Oct;52(10): 1585-93.

19) Shima H, Tokuyama M, Tanizawa A, Tono C, Hamamoto K, Muramatsu H, Watanabe A, Hotta N, Ito M, Kurosawa H, Kato K, Tsurusawa M, Horibe K, Shimada H. Distinct impact of imatinib on growth at prepubertal and pubertal ages of children with chronic myeloid leukemia. *J Pediatr.* 2011 Oct;159(4):676-81.

20) 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.* 2011 Jul 15;57(1):36-40.

21) Shimomura Y, Baba R, Watanabe A, Horikoshi Y, Asami K, Hyakuna N, Iwai A, Matsushita T, Yamaji K, Hori T, Tsurusawa M; Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group (JCCLSG). Assessment of late cardiotoxicity of pirarubicin (THP) in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Sep;57(3):461-6.

22) 鶴澤正仁 小児のリンパ腫 416-418 頁 血液専門医テキスト 2011年 日本血液学会編 南江堂

23) 鶴澤正仁 小児 ALL 治療でのMRD測定役割は何か 34-35 頁「小児

白血病リンパ腫の診療ガイドライン 2011年版」編集責任者・日本小児血液学会編 金原出版

24) Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A. ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer* 75(1):66-72, 2012.

25) Takahashi A, Tokita H, Takahashi K, Takeoka T, Murayama K, Tomotsune D, Ohira M, Iwamatsu A, Ohara K, Yazaki K, Koda T, Nakagawara A, Tani K. A novel potent tumour promoter aberrantly overexpressed in most human cancers. *Sci Rep.* 1:15, 2011.

26) Isogai E, Ohira M, Ozaki T, Oba S, Nakamura Y, Nakagawara A. Oncogenic LMO3 collaborates with HEN2 to enhance neuroblastoma cell growth through transactivation of Mash1. *PLOS One* 6(5):e19297, 2011.

27) 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. 学会発表（主要なもののみ記載）

1) 清河信敬, 三春晶嗣, 山田浩之, 橋本互, 飯島一智, 森鉄也, 斎藤正博, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 10 カラーフローサイトメトリーを用いた小児白血病 MRD 検出の試み. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会, 京都, 6 月 25 日-26 日, 2011.

2) 山田浩之, 清河信敬, 橋本互, 飯島一智, 嶋晴子, 嶋田博之, 森鉄也, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 小児白血病における CD66c 発現の意義. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会, 京都, 6 月 25 日-26 日, 2011.

3) 清河信敬, 山田浩之, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 土田昌宏. 10 カラーフローサイトメトリー解析による小児白血病のマーカー診断. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 8 月 12 日-14 日, 2011.

4) 福島敬, 南木融, 清河信敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. TCCSG 登録例における小児 ALL 関連キメラ遺伝子発現の推移について. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 8 月 12 日-14 日, 2011.

5) 大喜多肇, 飯島一智, 上野瞳, 藤本純一郎, 清河信敬. バイオフラボノイドによる Ewing 肉腫細胞に対するアポトーシス

- 誘導効果に関する検討. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10 月 3 日-5 日, 2011 .
- 6) 清河信敬, 飯島一智, 加藤元博, 藤本純一郎, 林泰秀, 小原明. MLL 関連キメラが検出されない CD10 陰性 ALL のマーカーと発現遺伝子の特徴. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10 月 3 日-5 日, 2011 .
- 7) 飯島一智, 山田浩之, 三春晶嗣, 中澤温子, 藤本純一郎, 大喜多肇, 清河信敬. バーキットリンパ腫特異的分子 ZNF385B は p53 を介してアポトーシスを制御する. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 10 月 14 日-16 日, 2011 .
- 8) 清河信敬, 飯島一智, 犬飼岳史, 高橋浩之, 福島敬, 康勝好, 杉田完爾, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 小原明, 藤本純一郎, 林泰秀, 土田昌宏. 東京小児がん研究グループ(TCCSG)治療研究における Early T-cell precursor ALL と T-ALL の発現分子特性. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 10 月 14 日-16 日, 2011 .
- 9) 犬飼岳史, 清河信敬, 小原明, 高橋浩之, 康勝好, 真部淳, 熊谷昌明, 生田孝一郎, 林泰秀, 土田昌宏, Dario Campana, 杉田完爾. Clinical significance of ETP-ALL in childhood T-ALL; the TCCSG L99-15 study. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 10 月 14 日-16 日, 2011 .
- 10) 大木健太郎, 大喜多肇, 小林健一郎, 清河信敬, 朴明子, 新井心, 外松学, 柴徳生, 福島敬, 康勝好, 花田良二, 真部淳, 菊地陽, 小原明, 土田昌宏, 林泰秀. TCCSG の小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における CRLF2 と IKZF1 の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .
- 11) 小林 健一郎, 福島敬, 南木融, 清河信敬, 三春晶嗣, 山田浩之, 飯島一智, 大喜多肇, 森鉄也, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. TCCSG ALL 登録症例のキメラ遺伝子発現と細胞マーカーとの関連に関する検討. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .
- 12) 三春晶嗣, 清河信敬, 小林 健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 飯島一智, 森鉄也, 福島敬, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 10 カラーフローサイトメトリーを用いた B 前駆細胞急性リンパ芽球性白血病の MRD 検出. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .
- 13) 飯島一智, 清河信敬, 小林 健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 三春晶嗣, 森鉄也, 福島敬, 南木融, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 東京小児がん研究グループ(TCCSG)ALL 治療研究登録症例の網羅的遺伝子発現解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .
- 14) 山田浩之, 田口智子, 小林健一郎, 三春晶嗣, 飯島一智, 大喜多肇, 清河信敬. B 前駆細胞性 ALL 細胞に対する IGF-1、IGFBP の作用の検討. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .
- 15) Gene expression profiles of early T-cell precursor (ETP-) ALL and T-ALL treated in TCCSG trials . Kiyokawa N, Ohara A, Hayashi Y. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .
- 16) Katagiri YU, Kiyokawa N. The human CD10 lacking an N-glycan at Asn628 is deficient in surface expression and neutralendopeptidase activity . 第 40 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 11 月 27 日-29 日, 2011 .
- 17) Iijima K, Yamada Y, Miharu M, Nakazawa A, Fujimoto J, Kobayashi K, Okita H, Kiyokawa N. Burkitt Lymphoma Specific Zinc Finger Protein ZNF385B Is Involved in Regulation of B Cell Apoptosis . 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, CA, December 10-13, 2011 .
- 18) Sekimizu M, Maeda N, Moritani S, Ichihara S, Nakazawa A, Takita H, Matasusita C, Takeda M, Goto M, Minowa S, Horibe K : Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in teenage siblings. 73th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2011 Oct.14. Nagoya.
- 19) Osumi T, Miharu M, Tanaka R, Fujimura E, Yamazaki F, Kanazaki S, Nakazawa A, Mori T, Shimada H : EBV-related DLBCL presenting with facial palsy in immunocompetent children : report of two cases. 73th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2011 Oct.14. Nagoya.
- 20) 岡松千都子, 中澤温子, 大平美紀, 上條岳彦, 中川原 章 : 神経芽腫におけるゲノム分類と国際病理分類(INPC) との比較検討. 第 53 回 日本小児血液・がん学会学術集会 前橋 2011.11.27.
- 21) 大喜多肇, 秦順一, 柴田理恵, 高田礼子, 菊池春人, 藤本純一郎, 金子安比古, 堀江弘, 田中祐吉, 福澤正洋, 清河信敬. 日本における WT1 遺伝子変異を有するウィルムス腫瘍の臨床病理学的検討. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 4 月 28 日-30 日, 2011.

- 22) 廣瀬衣子, 犬飼岳史, 菊池次郎, 古川雄祐, 伊川友活, 河本宏, S. Helen Oram, Berthold Gottgens, 清河信敬, 宮川世志幸, 大喜多肇, 赤羽弘資, 張曉春, 黒田格, 大城(本名)浩子, 加賀美恵子, 合井久美子, 黒澤秀光, A. Thomas Look, 松井啓隆, 稲葉俊哉, 杉田完爾. Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19). 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011.
- 23) 大島淳二郎, 春田雅之, 渡辺直樹, 新井康仁, 寺下友佳代, 長祐子, 井口晶裕, 有賀正, 大喜多肇, 越永従道, 大植孝治, 樋之津史郎, 中館尚也, 堀江弘, 福澤正洋, 金子安比古. がん抑制遺伝子 RASSF1A のプロモーターメチル化は Wilms 腫瘍の予後不良因子である. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011.
- 24) 大喜多肇, 近森穰, 宮川世志幸, 秋元信吾, 小林健一郎, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. ユーイング肉腫ファミリー腫瘍における Dickkopf ファミリー分子の発現制御とその意義. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011.
- 25) 上野瞳, 大喜多肇, 清河信敬. 小児腎肉腫における DNA メチル化解析. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 13 日-16 日, 2011.
- 26) 小川誠司, 加藤元博, 林泰秀. TAM における遺伝学的基盤探索. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
- 27) 滝田順子, 西村 力, 安達正時, 大木健太郎, 大久保 淳, 樋渡光輝, 真田昌, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐 隆. 革新的ゲノム解析技術を用いた難治性小児固形腫瘍における発症分子機構の解明. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
- 28) 安達正時, 滝田順子, 西村 力, 真田 昌, 樋渡光輝, 大木健太郎, 大久保淳, 林泰秀, 五十嵐 隆, 小川誠司. 神経芽腫における全エクソン領域のシーケンス解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
- 29) 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 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
- 30) 樋渡光輝, 滝田順子, 真田 昌, 西村 力, 大久保淳, 井田孔明, 外松 学, 菊地 陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 乳児白血病における IDH 1/2 遺伝子の変異解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.3
- 31) 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 川幡亮一郎, 永田安伸, 大久保淳, 真田 昌, 五十嵐隆, 林泰秀, 宮野 悟, 小川誠司. 次世代シーケンサーによる神経芽腫のエクソーム解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.4
- 32) 朴 明子, 清河信敬, 小田 慈, 真部 淳, 小原 明, 花田良二, 土田昌宏, 小川誠司, 堀部敬三, 林泰秀. 小児 T 細胞性急性リンパ性白血病における LEF1 遺伝子の異常と臨床像について. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.4
- 33) Hiwatari M, Ohki K, Takita J, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Mutation analysis for IDH1 and IDH2 in infantile leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.14
- 34) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in CMML secondary to familial platelet disorder with propensity to develop AML. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 35) Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Koike T, Endo M, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Ito E. Novel GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 36) Yoshida K, Toki T, Park MJ, Nagata Y, Wang R, Shiraishi Y, Sanada M, Nagasaki M, Miyano S, Kanegane H, Kawakami K, Kato K, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Whole exome analysis of transient abnormal myelopoiesis and acute megakaryocytic leukemia with Down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 37) Motomura A, Oki K, Takita J, Nishimura R, Okubo J, Hiwatari M, Sanada M, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of DNMT3A in pediatric myeloid malignancies. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 38) Park MJ, Kiyokawa N, Oda M, Manabe A, Hara J, Ohara A, Hanada R, Tsuchida M, Ogawa S, Horibe K, Hayashi Y. The clinical significance of LEF1 mutation in childhood acute lymphoblastic leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 39) 花田 勇, 照井君典, 土岐 力, 工藤 耕, 佐藤知彦, 神尾卓哉, 佐々木伸也, 高橋良博, 林泰秀, 杉田完爾, 小島勢二, 小池健一, 小阪嘉之, 小林正夫, 伊藤悦明. ダウン症候群関連 ALL の発症における JAK2, および CRLF2 遺伝子異常の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.27
- 40) 嶋田 明, 富澤大輔, 木下明俊,

浜本和子, 月本一郎, 小川 淳, 多賀 崇, 今村俊彦, 多和昭雄, 堀部敬三, 滝 智彦, 林泰秀, 足立壮一. 乳児 AML の後方視的解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

41) 柴 徳生, 朴 明子, 村田知里, 嶋田 明, 滝 智彦, 外松 学, 田渕 健, 足立壮一, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 荒川浩一, 林泰秀. 小児急性白血病における DNMT3A 遺伝子変異の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

42) 木下明俊, 宮地勇人, 滝 智彦, 松下弘道, 矢部はるみ, 清河信敬, 照井君典, 太田秀明, 出口隆生, 高橋浩之, 多賀 崇, 林泰秀, 多和昭雄, 足立壮一. JPLSG AML-05 臨床試験における WHO 分類に基づいた小児急性骨髄性白血病の中央診断. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

43) 柴 徳生, 朴 明子, 村田知里, 嶋田 明, 滝 智彦, 外松 学, 田渕 健, 足立壮一, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 荒川浩一, 林泰秀. 小児急性骨髄性白血病における NUP98-NSD 転座の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

44) 竹谷 健, 滝 智彦, 日向瑞貴, 安部真理子, 福田誠司, 山口清次, 林泰秀. 染色体 11p15 異常を有する造血器腫瘍における遺伝子変異と臨床像の関連. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

45) 朴 明子, 清河信敬, 小田 慈, 真部 淳, 原 純一, 小原 明, 花田良二, 土田昌宏, 小川誠司, 堀部敬三, 林泰秀. T 細胞型小児急性リンパ性白血病における遺伝子異常の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

46) 堤 修一, 王 凌華, 朴 明子, 照井君典, 佐々木伸也, 伊藤悦朗, 林泰秀, 油谷浩幸. MLL 再構成陽性の小児急性リンパ性白血病のエクソーム解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

47) 樋渡光輝, 大木健太郎, 滝田順子, 西村 力, 真田 昌, 大久保淳, 外松 学, 菊地 陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司. 乳児白血病における IDH1 および IDH2 遺伝子の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

48) 吉田健一, 土岐 力, 朴 明子, 永田安伸, 王 汝南, 白石友一, 真田 昌, 昆 彩菜, 佐藤亜依子, 長崎正朗, 宮野 悟, 金兼弘和, 川上 清, 加藤剛二, 小島勢二, 林泰秀, 伊藤悦朗, 小川誠司. ダウン症候群

に合併した一過性骨髄増殖症(TAM)および急性巨核芽球性白血病(AMKL)の全エクソーム解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

49) Shiba N, Taki T, Park M, Murata C, Oki K, Ichikawa H, Shimada A, Kanazawa T, Sotomatsu M, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. NUP98-NSD1 fusion gene is strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML99 Cooperative Study Group. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011

50) Taketani T, Taki T, Fukuda S, Hyuga M, Onishi C, Yamaguchi S, Hayashi Y. The Concurrent mutations in hematological malignancies with NUP98-fusion genes are associated with clinical prognosis. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

臨床応用を目的とした難治性小児がんの発症・治療モデルの構築

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

研究要旨： 1) 小児 ALL の新たな予後層別化因子として期待される微小残存病変 (MRD) について、10 カラーフローサイトメトリー (FCM) での細胞マーカーによる検出法の有用性を確認し、臨床応用を目指した検討を進めた。2) T 細胞性 (T-) 急性リンパ芽球性白血病 (ALL) の中の予後不良亜群として欧米で注目されている Early T-cell precursor (ETP-) ALL に関し、本邦の症例について発現遺伝子解析を行い ETP-ALL の特徴を確認するとともに、類縁疾患と比較してそれぞれの特性を明らかにした。また、予後情報が得られている症例について、本邦の治療プロトコールにおける T-ALL と ETP-ALL の予後の比較を行なった。3) B 前駆細胞性 (BCP-) ALL 難治例に特徴的な発現遺伝子の探索を進め、Burkit リンパ腫特異的因子 ZNF385B の診断への有用性と機能についての解析を行なった。

A. 研究目的

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

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

今年度は、1) BCP-ALL の新たな予後層別

化法として期待されている微小残存病変 (MRD) についてマルチカラーフローサイトメトリー (FCM) による検出法の開発を進め、2) 最近予後不良な疾患亜群として報告され本邦での治療層別化について早急な検討が必要となっている Early T-cell precursor (ETP-) ALL の本邦の症例についての分子特性と予後の解析を行い、3) BCP-ALL 難治例の発現遺伝子特性についての解析を進めるとともに、Burkit リンパ腫 (BL) 特異的因子として同定した ZNF385B の診断的有用性や機能についての解析を行なった。

B. 研究方法

1. 網羅的発現遺伝子解析：白血病細胞検体から total RNA を RNeasy Plus kit (Qiagen 社) で抽出し、各 50 ng を用いて WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NuGen 社) により cDNA を合成、増幅し、Biotin 標識した後、Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array により網羅的遺伝子発現を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring (Agilent 社) を用いて解析した。

2. 細胞マーカー解析：骨髓液あるいは末梢血液について、FITC, PE, ECD, PC5.5, PC7, APC, APC-Alexa-700, APC-Alexa-750, Pacific-Blue, Krome-Orange の 10 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる全血法の蛍光染色を行った。溶血後、FCM (Gallios, Beckman-Coulter 社) を用いて 10 カラー解析を行った。

3. 培養細胞株を用いた標的因子の機能解

析：標的遺伝子の cDNA は RT-PCR により増幅し、クローニングした。培養細胞への遺伝子導入と発現誘導は、Retro-X Tet On システム (pRetroX Tight および pRetro-X Tet on advanced) を用いて、テトラサイクリン依存性の発現誘導系をレトロウイルスベクターにより目的細胞に導入した。

(倫理面への配慮)

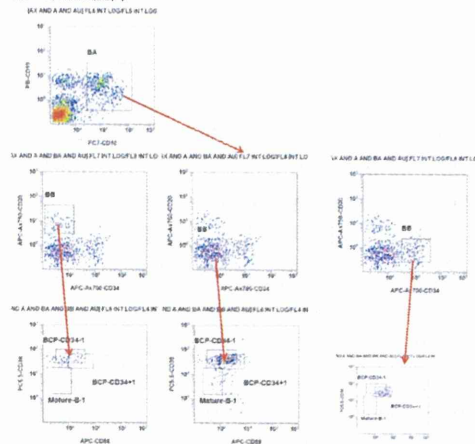
本研究で行った臨床検体を用いた研究は、関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

C. 研究結果

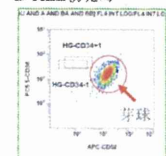
1. マルチカラー-FCM による小児白血病

MRD の検出：近年、MRD の検出が、小児 ALL の難治例を予測可能な新たな予後層別化因子として期待されている。Ig/TCR 遺伝子再構成を利用した定量 PCR 法 (鶴澤の分担研究報告書参照) が最も確立された方法であるが、一部適応できない症例もあること、コストが高い等の問題点もあることから、これを補完する解析法として 10 カラー-FCM を用いた MRD 検出法について検討を行っている。昨年度確立した non-B-lineage/CD45 gate → CD19+CD10+ → CD20/CD34 → CD58/CD38/CD44/CD45RA、の組み合わせを用いて、のべ 289 例 (同一症例の治療経過中の異なる病日の解析を含む) について解析を行った。

A 非ALL症例



B ALL初発時



C ALL治療経過中

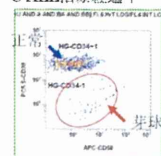


図1 マルチカラー-FCMによるMRD検出

リンパ腫の非浸潤性骨髄、T-ALL や急性骨髄性白血病 (AML) 寛解導入後の骨髄等について検討した結果、非腫瘍性の B 前駆細胞では、CD20/CD34 の発現の組み合わせによる分化段階に応じて CD58/CD38/CD44/CD45RA の 4 つの抗原の発現量が一定であることが示唆された (図 1A)。これに対して、初発時の BCP-ALL を解析した結果、このうちの少なくとも一つ以上の抗原の発現量が正常の値からはずれること (図 1B,C)、特に CD38 の発現が弱く CD58 の発現が強い場合が多いことが明らかとなり、上記抗原の発現を同時に測定することで、ほぼ全例で正常と白血病性の B 前駆細胞を区別することができ、治療経過を追って経時的に MRD をモニタリングすることが可能と考えられた。

2. 本邦における ETP-ALL の発症状況と分子特性解析：Early T-cell precursor (ETP-)ALL は、発現遺伝子プロファイリングによって近年同定された T-lineage ALL の亜群で、特徴的なマーカー蛋白の発現、すなわち CD8 陰性 CD1a 陰性 CD5 陰性～弱陽性かつ幹細胞/骨髄系抗原陽性という特徴によって区別可能であり、極めて予後不良な一群として報告されていることから、本邦の ALL 治療プロトコルのリスク分類の中での位置づけについて早急に決定する必要性が求められている。昨年度、マーカー所見の解析から、本邦における ETP-ALL の発症頻度が T-lineage ALL の 20.5% (161 例中 33 例) と欧米よりもやや高いことを明らかにしたが、本年度は上記症例のうち ETP-ALL 18 例と T-ALL 68 例 (γ δ-T 8 例を含む) に加え、NK 白血病 2 例、T 細胞性骨髄性混合型白血病 1 例、最末分化型 AML (AML M0) 3 例の網羅的な発現遺伝子プロファイリングを行い、特徴を比較した (図 2)。その結果、1) マーカー所見から ETP-ALL と診断された症例では、CD44, CD34, KIT, GATA2, CEPBA, SPI1, ID2, MYB 等の幹細胞関連遺伝子の高発現と CD1, CD3, CD4, CD5, CD8, RAG1, NOTCH3, PTCRA, LEF1, TCF12, LAT, LCK, TCF7, ZAP70 の T 細胞関連遺伝子の低発現など、欧米の症例で報告されている ETP-ALL の遺伝子発現の特徴が確認された。さらに新たな所見として、2) 上記遺伝子群の発現でみた場合、ETP-ALL、γ δ-T-ALL、NK 白血病、AML は類似した遺伝子発現様式を示し、T-ALL とは異なった特徴を示すことが明らかとなった。3) 特に ETP-ALL と AML M0 はマーカー発現の観点

からも類似性を示し、時に鑑別が困難であるが、LEF1, TCF7/12, LCK, IL7R 等の T 細胞関連遺伝子の発現に着目すると、ETP-ALL では弱いながらも発現を認めるのに対し、AML M0 では発現していないことから、両者の鑑別が可能と考えられた。4) T-ALL のうち 5 例は CD5 が強陽性であることを除けば ETP-ALL のマーカーの診断基準を満たしており (以下、ETP-like と表記)、遺伝子発現の特徴も ETP-ALL に類似していた。

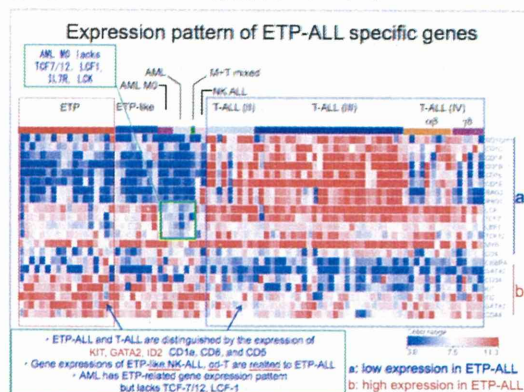


図 2 ETP-ALL と類縁疾患の発現遺伝子解析

上記症例のうち、観察期間 4 年以上の 41 例 (ETP-ALL 9 例、ETP-like 5 例を含む) について、予後について解析した結果、ETP-ALL は、最高リスク群に分類される症例が多く、再発率、死亡率とも 40.0% で T-ALL (各 18.8%、21.2%) と比較して予後不良の傾向を認めた。一方、ETP-like は全例が無病生存中であった。

3. 小児がんの網羅的発現遺伝子解析と標的因子候補の機能解析：観察期間 4 年以上の B 前駆細胞性 ALL 約 250 例について、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行なった。現在、治療反応性や予後情報との相関解析を行っており、難治性症例に特徴的に発現する遺伝子の探索に着手している。

昨年度までに、成熟 B リンパ腫の中で、BL に特異的に発現する遺伝子としてジンクフィンガー (ZF) 型蛋白をコードする ZNF385B を同定した。今年度、同蛋白に対する抗体を用いた免疫染色について検討したところ、BL の標本では陽性であったが、同じ成熟 B リンパ腫である瀰漫大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) では陰性であった。

ZNF385B には ZF ドメインを 4 つ有する 1 型と、3 つしか保たない 2,3 型の 3 つのアイソフォームが報告されている。昨年度、ZNF385B を発現していない DLBCL 由来細胞

株 BJAB にテトラサイクリン依存性の発現誘導系を用いて同遺伝子 1 型を発現させるとアポトーシスの誘導が認められたことから、今年度同 2,3 型に相当する 1 型の欠失変異体を発現させたところ、逆にアポトーシスの抑制が起ることが判明した。

D. 考察

1. マルチカラーFCM による小児白血病 MRD の検出：マルチカラーFCM が MRD の検出に有用であることが確認された。他の分担研究者が検討している MRD 検出法と合わせてほぼすべての対象症例で MRD 検出が可能と考えられる。この方法では初発時の情報がなくても MRD 検出が可能であり、簡便で、コストも安いなどの利点がある。現在、治療経過を追った MRD のモニタリングを行っており、今後他の MRD 検出法との相関性や治療反応性との関係について検討する。

2. 本邦における ETP-ALL の発症状況と分子特性解析：今回の検討により、マーカー所見から ETP-ALL と診断された本邦の症例が遺伝子発現の面でも欧米の報告例と一致していることが確認され、我国においても正に ETP-ALL に相当する疾患亜群が存在することが確認された。ETP-ALL は、T 細胞と骨髄系の双方に分化可能な未分化な前駆細胞に由来する白血病と想定されており、AML M0 や、Myeloid/NK-T 白血病等と近縁の疾患であると推測され、その異同や鑑別が今後の課題である。今回の検討で、これらの疾患が、非常に類似した発現遺伝子プロファイルを有することが明らかとなり、遺伝子発現の面からも類縁性が示唆された。しかし、類似はしてはいるものの、例えば ETP-ALL と AML M0 では T 細胞関連遺伝子の発現に明らかな差があることが判明し、今後これらの疾患概念を整理分類していく上で非常に有用な所見と考えられる。また、現時点では予後情報が整っている症例が少ないものの、本邦の ETP-ALL も一般の T-ALL に比較して予後不良であることが示唆された。しかし、欧米での報告ほど圧倒的な予後の差ではなく、本邦の治療プロトコールは現状でも ETP-ALL に対して一定の治療効果を示している可能性が考えられる。一方、ETP-like の症例は形質的には ETP-ALL に非常に近いものの、予後の面では良好な亜群で区別して考えるべき可能性が示唆され、両者を区別する CD5 の発現が予後予測の上で非常に重要であると考えられた。

昌宏. 東京小児がん研究グループ(TCCSG)治療研究における Early T-cell precursor ALL と T-ALL の発現分子特性. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 10 月 14 日-16 日, 2011 .

9) 犬飼岳史, 清河信敬, 小原明, 高橋浩之, 康勝好, 真部淳, 熊谷昌明, 生田孝一郎, 林泰秀, 土田昌宏, Dario Campana, 杉田完爾. Clinical significance of ETP-ALL in childhood T-ALL; the TCCSG L99-15 study. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 10 月 14 日-16 日, 2011 .

10) 大木健太郎, 大喜多肇, 小林健一郎, 清河信敬, 朴明子, 新井心, 外松学, 柴徳生, 福島敬, 康勝好, 花田良二, 真部淳, 菊地陽, 小原明, 土田昌宏, 林泰秀. TCCSG の小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における CRLF2 と IKZF1 の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .

11) 小林 健一郎, 福島敬, 南木融, 清河信敬, 三春晶嗣, 山田浩之, 飯島一智, 大喜多肇, 森鉄也, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. TCCSG ALL 登録症例のキメラ遺伝子発現と細胞マーカーとの関連に関する検討. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .

12) 三春晶嗣, 清河信敬, 小林 健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 飯島一智, 森鉄也, 福島敬, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 10 カラーフローサイトメトリーを用いた B 前駆細胞急性リンパ芽球性白血病の MRD 検出. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .

13) 飯島一智, 清河信敬, 小林 健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 三春晶嗣, 森鉄也, 福島敬, 南木融, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 熊谷昌明, 藤本純一郎, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. 東京小児がん研究グループ(TCCSG)ALL 治療研究登録症例の網羅的遺伝子発現解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .

14) 山田浩之, 田口智子, 小林健一郎, 三春晶嗣, 飯島一智, 大喜多肇, 清河信敬. B 前駆細胞性 ALL 細胞に対する IGF-1、IGFBP の作用の検討. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .

15) Gene expression profiles of early T-cell precursor (ETP-) ALL and T-ALL treated in TCCSG trials. Kiyokawa N, Ohara A, Hayashi Y. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011 .

16) Katagiri YU, Kiyokawa N. The human CD10 lacking an N-glycan at Asn628 is deficient in surface expression and neutralendopeptidase activity. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 11 月 27

日-29 日, 2011 .

17) Iijima K, Yamada Y, Miharuru M, Nakazawa A, Fujimoto J, Kobayashi K, Okita H, Kiyokawa N. Burkitt Lymphoma Specific Zinc Finger Protein ZNF385B Is Involved in Regulation of B Cell Apoptosis. 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, CA, December 10-13, 2011 .

18) 大喜多肇, 秦順一, 柴田理恵, 高田礼子, 菊池春人, 藤本純一郎, 金子安比古, 堀江弘, 田中祐吉, 福澤正洋, 清河信敬. 日本における WT1 遺伝子変異を有するウィルムス腫瘍の臨床病理学的検討. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 4 月 28 日-30 日, 2011.

19) 廣瀬衣子, 犬飼岳史, 菊池次郎, 古川雄祐, 伊川友活, 河本宏, S. Helen Oram, Berthold Gottgens, 清河信敬, 宮川世志幸, 大喜多肇, 赤羽弘資, 張曉春, 黒田格, 大城(本名)浩子, 加賀美恵子, 合井久美子, 黒澤秀光, A. Thomas Look, 松井啓隆, 稲葉俊哉, 杉田完爾. Aberrant induction of LMO2 by the E2A-HLF chimeric transcription factor and its implication in leukemogenesis of B-precursor ALL with t(17;19). 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011.

20) 大喜多肇, 近森穰, 宮川世志幸, 秋元信吾, 小林健一郎, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. ユーイング肉腫ファミリー腫瘍における Dickkopf ファミリー分子の発現制御とその意義. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日, 2011.

21) 上野瞳, 大喜多肇, 清河信敬. 小児腎肉腫における DNA メチル化解析. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 13 日-16 日, 2011.

22) Park MJ, Kiyokawa N, Oda M, Manabe A, Hara J, Ohara A, Hanada R, Tsuchida M, Ogawa S, Horibe K, Hayashi Y. The clinical significance of LEF1 mutation in childhood acute lymphoblastic leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15

23) 木下明俊, 宮地勇人, 滝 智彦, 松下弘道, 矢部はるみ, 清河信敬, 照井君典, 太田秀明, 出口隆生, 高橋浩之, 多賀 崇, 林泰秀, 多和昭雄, 足立壮一. JPLSG AML-05 臨床試験における WHO 分類に基づいた小児急性骨髄性白血病の中央診断. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

小児がんの分子病理所見に基づく悪性度の判定とその治療への応用

研究分担者 中澤 温子 (独)国立成育医療研究センター 病理診断部 部長

研究要旨：神経芽腫群腫瘍において INPC 病理国際分類は、FH と UH の2つの予後グループを区別している。UH には MYCN 増幅腫瘍と MYCN 増幅のない腫瘍が含まれており、UH で MYCN 増幅のない群についてのさらなる予後因子の解析が今後の課題である。本研究では、ゲノム分類と INPC 分類との関連を明らかにすることができた。すなわち、W 群と FH は年齢分布が一致し、1.5 歳未満に多く、MYCN 増幅のみられない予後良好群であった。最も予後の悪い群は、Sa, Ps-ALK, Wa, Pa, Pa-ALK といった MYCN 増幅群で、ゲノム分類 3 群すべてが含まれており、ゲノム分類に関係なく MYCN 遺伝子増幅が強力な予後不良因子であることが判明した。P 群の大部分は UH で、年齢分布も UH と同様の予後不良群と考えられた。さらに MYCN 増幅のない Ps 群は、P4s 群とそれ以外の P2s, P3s, P5s の2つの予後グループに分けることができ、1p loss and /or 11q loss を持つ群がより予後が不良であった。

A. 研究目的

神経芽腫群腫瘍は、脳腫瘍について頻度の高い小児固形腫瘍であり、生物学的性格、予後の異なるヘテロな腫瘍とされている。自然退縮や分化・成熟を示す予後良好群と造血幹細胞移植を含めた強力な化学療法を行っても 30 ~ 40 %の生存率しか得られない予後不良群とに大別される。発症時年齢、DNA 指数、臨床病期、MYCN 遺伝子増幅、国際神経芽腫病理分類 (INPC)などが予後因子とされ、これらの予後因子に基づいた治療の層別化が行われている。予後良好群の治療の軽減が行われ、日本でも予後良好群を検出する確立の高い乳児マススクリーニングは休止された。一方、予後不良群に対する新たな予後因子の検索、新規治療法の開発が今後の課題となっている。

本研究では、新たな予後因子として注目されているゲノム分類と INPC 病理分類との関連について検索し、INPC で予後不良群に分類される腫瘍について、さらなる層別化の可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

本研究班の分担研究者である大平らのグループは、アレイ CGH によるゲノム異常を分類し、予後との相関に基づくゲノム異常を大きく3つの群、1) MYCN 遺伝子増幅以外の染色体増幅・喪失のない群 (Silent; S)、2) 部分的に染色体増幅・喪失を見る群 (Partial chromosomal gain/loss; P)、3) 染色体全体にわ

たる増幅・喪失のある群 (Whole chromosomal gain/loss; W)に分けた。さらに 1p loss, 11q loss, 17q gain および MYCN 遺伝子増幅の有無から、表のような亜群に分類した (Oncogene 2008, 24(4):441-9)。

	MYCN amp	1p loss	11q loss	17q gain	17 whole gain
Sa	+	-	-	-	-
Ss	-	-	-	-	-
P1a	+	+	-	+	-
P2a	+	+	+	+	-
P2s	-	+	+	+	-
P3s	-	-	+	+	-
P4s	-	-	-	+	-
W3s	-	-	+	+	+
W4s	-	-	-	+	+
W5s	-	-	-	±	-

アレイ CGH によりゲノム分類がなされている 314 例の神経芽腫群腫瘍のうち INPC による組織学的評価が可能であった神経芽腫 (neuroblastoma; NB) 92 例を対象とし、病理組織学的に詳細な検討を行った。サンプリングエラーを避けるため、Stroma- Rich/Dominant tumor (ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma, intermixed subtype), multiple clone からなる NB は対象外とした。対象症例の年齢、予後、ゲノム分類と INPC との関連について検討し、統計学的解析を加えた。

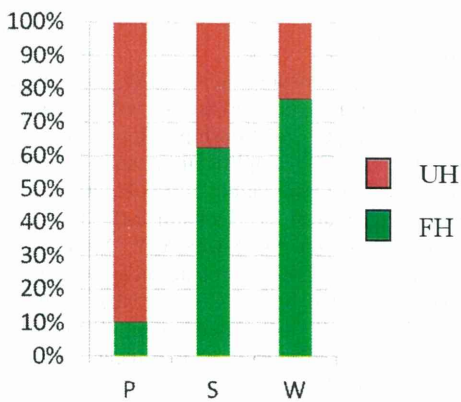
(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、

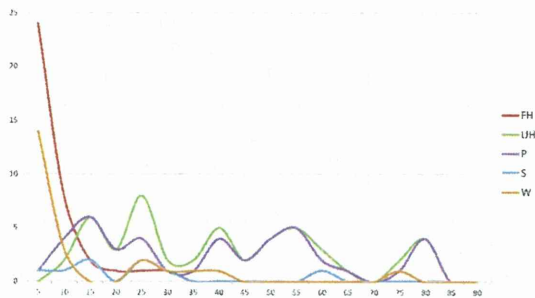
関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

C. 研究結果

1. ゲノム分類別症例数は、P 群 49 例（53 %）、W 群 35 例（38 %）、S 群 8 例（9 %）であった。INPC では、予後不良群 Unfavorable Histology; UH 55 例（62 %）、予後良好群 Favorable Histology; FH 37 例（38 %）で、P 群 49 例のうち UH は 44 例、FH は 5 例、W 群 35 例のうち UH は 8 例、FH は 27 例、S 群 8 例のうち UH は 3 例、FH は 5 例であった。



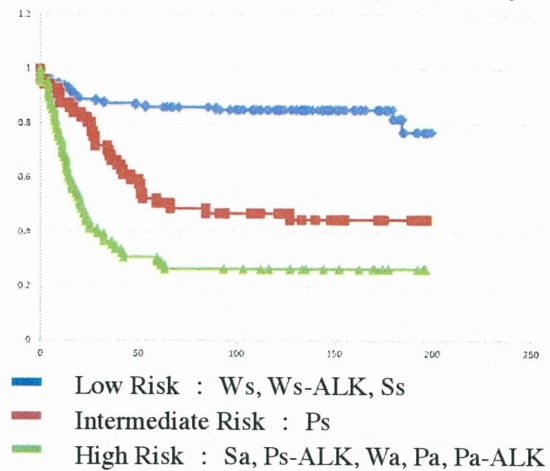
平均発症月例は、P 群 48 ヶ月、S 群 21 ヶ月、W 群 9 ヶ月で、P 群と W 群との間で有意差を認めた。発症月齢について、UH、FH、P 群、W 群、S 群についてグラフに表すと、P 群は UH と、W 群は FH とほぼ一致した形状のカーブを描いた。



ゲノム解析をされた 314 例のうち、MYCN 遺伝子の検索が行われた症例は 311 例で、増幅

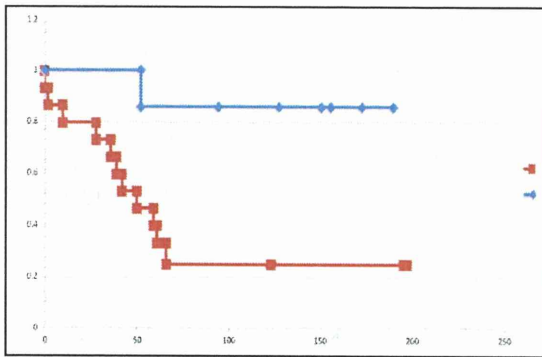
例は 73 例（23 %）、非増幅例は 238 例（77 %）であった。これは従来言われている神経芽細胞腫群における MYCN 増幅群の比率とほぼ同率であった。生存率についてもこれまでの報告と同様で、MYCN 増幅群 27.7 %、MYCN 非増幅群 66.5 %と MYCN 増幅群で有意に低下していた。

ゲノム異常のパターンと生存率についての検討では、Low risk 群（Ws, Ws-ALK, Ss）生存率 76.7 %、Intermediate 群（Ps）生存率 44.6 %、High risk 群（Sa, Ps-ALK, Wa, Pa, Pa-ALK）生存率 26.5 %の 3 群に分けられた。



High Risk 群と Low risk 群、Low risk 群と Intermediate 群（ $p < 0.001$ ）、Intermediate 群と High Risk 群（ $p < 0.005$ ）の生存率には有意差が認められた。MYCN 遺伝子増幅とは独立した予後因子になると考えられた。

P 群で MYCN 非増幅である Ps 群の亜分類では、P2s 群 2 例（9 %）、P3s 群 12 例（55 %）、P4s 群 7 例（32 %）、P5s 群 1 例（5 %）であった。P2s 群は、1p loss、11q loss、17q gain があるもの、P3s 群は、11q loss、17q gain があるもの、P4s 群は 17q gain のみがあるもので、P5s 群はそれ以外である。Ps 群について、亜分類別、すなわち P4s 群を Low Risk 群、P2s, P3s, P5s 群を High Risk 群として生存曲線を描き、予後を比較してみるとこれら 2 群間に有意差を認めた（ $p < 0.005$ ）。



病理組織像についての検討では、P2s, P3s に大型の腫瘍細胞を散見する **pleomorphic** な組織像が認められ、今後さらに詳細に解析する予定である。

D. 考察

神経芽腫を含めて、小児がんの治療成績は近年向上し、多剤併用化学療法、放射線治療、さらに造血幹細胞移植を組み合わせることにより、その生存率は平均 70 %に達している。それぞれの腫瘍の生物学的特徴に基づいた治療の層別化という治療戦略は、治療成績の向上だけでなく、治療合併症の軽減という意味でも重要である。神経芽腫においては、年齢、臨床病期、MYCN 増幅、INPC 国際病理分類により、治療の層別化が行われている。INPC 分類は、FH と UH の 2 つの予後グループを区別し、FH は自然退縮や分化・成熟を示し、MYCN 増幅のない群である。一方 UH には MYCN 増幅腫瘍と MYCN 増幅のない腫瘍が含まれており、UH で MYCN 増幅のない群についてのさらなる予後因子の解析が今後の課題である。本研究では、ゲノム分類と INPC 分類との関連を明らかにすることができた。すなわち、W 群と FH は年齢分布が一致し、1.5 歳未満に多く、MYCN 増幅のみられない予後良好群であった。最も予後の悪い群は、Sa, Ps-ALK, Wa, Pa, Pa-ALK といった MYCN 増幅群でゲノム分類 3 群すべてが含まれていた。さらに MYCN 増幅がない Ps 群で ALK 変異のあるもの (Ps-ALK) もこの中に包括された。ゲノム分類に関係なく MYCN 遺伝子増幅が強力な予後不良因子であることが判明した。P 群の大部分は UH で、年齢分布も UH と同様の予後不良群と考えられた。さらに MYCN 増幅のない Ps 群は、P4s 群とそれ以外の P2s, P3s, P5s の 2 つの予後グループに分けることができ、1p loss and /or 11q loss を持つ群がより予後が不良であった。

この群は、組織学的に **pleomorphism** が目立ち、これがゲノム異常の病理学的指標となるかどうか、症例を増やしてさらに検討中である。

E. 結論

ゲノム分類と予後予測因子である INPC 分類、MYCN 増幅との間には相関が認められた。MYCN 増幅のない UH 群腫瘍において、ゲノム分類における P2s, P3s といった予後不良群が抽出され、1p loss, 11q loss が予後予測因子となり、更なる治療層別化に役立つ可能性が示された。

研究協力者：岡松千都子

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagawa A, Matsuoka K, Okita H, Iwafuchi H, Hori H, Kumagai M, Neuroblastoma with discordant genotype-phenotype relationship: Report of four cases with MYCN amplification and favorable histology. *Pediatr Devel Pathol* 14:87-92, 2011
- 2) Akter J, Takatori A, Hossain MS, Ozaki T, Nakagawa A, Ohira M, Suenaga Y, Nakagawara A. Expression of NLRP3 orphan receptor gene is negatively regulated by MYCN and Miz-1, and its downregulation is associated with unfavorable outcome in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Nov 1;17(21):6681-92.
- 3) Sekimizu M, Sunami S, Nakazawa A, Hayashi Y, Okimoto Y, Saito AM, Horibe K, Tsurusawa M, Mori T. Chromosome abnormalities in advanced stage T-cell lymphoblastic lymphoma of children and adolescents: a report from Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) and review of the literature. *Br J Haematol*. 2011 Sep;154(5):612-617.

2. 学会発表

- 1) Sekimizu M, Maeda N, Moritani S, Ichihara S, Nakazawa A, Takita H, Matasuta C, Takeda M, Goto M, Minowa S, Horibe K : Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in teenage siblings. 73th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2011 Oct.14. Nagoya.
- 2) Osumi T, Miharuru M, Tanaka R, Fujimura E, Yamazaki F, Kanazaki S, Nakazawa A, Mori T, Shimada H : EBV-related DLBCL presenting with facial palsy in immunocompetent children : report of two cases. 73th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2011 Oct.14. Nagoya.
- 3) 岡松千都子, 中澤温子, 大平美紀, 上條岳彦, 中川原 章 : 神経芽腫におけるゲノム分類と国際病理分類(INPC) との比較検討. 第 53 回 日本小児血液・がん学会学術集会 前橋 2011.11.27.

- 4) 飯島一智, 山田浩之, 三春晶嗣, 中澤温子, 藤本純一郎, 大喜多肇, 清河信敬. バーキットリンパ腫特異的分子 ZNF385B は p53 を介してアポトーシスを制御する. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 10 月 14 日-16 日, 2011
- 5) Iijima K, Yamada Y, Miharu M, Nakazawa A, Fujimoto J, Kobayashi K, Okita H, Kiyokawa N. Burkitt Lymphoma Specific Zinc Finger Protein ZNF385B Is Involved in Regulation of B Cell Apoptosis . 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, CA, December 10-13, 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