

難治性小児リンパ系腫瘍の分子プロファイリングとその臨床応用

研究分担者 森 鉄也（独）国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 腫瘍科医長

研究要旨： 全国規模の多施設共同治療研究である日本小児白血病リンパ腫研究グループ（Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group: JPLSG）リンパ腫登録例を対象として、研究に使用可能な余剰検体の保管情報について調査した結果、約15%程度の症例で検体が保存されていることが明らかとなった。これらの症例のうちT細胞性リンパ腫の症例に対し、包括的な分子プロファイリング解析の一環として、22例で細胞マーカー検査結果の詳細な解析を行ない、11例についてマイクロアレイによる発現遺伝子解析を行なった結果、T細胞性リンパ腫の場合でも、その約2割弱はEarly T-cell precursor に相当する表面形質と発現遺伝子の特徴を示すことが明らかとなった。

研究協力者

鶴澤正仁*（愛知医科大学医学部）
： JPLSG 運営委員会委員長
JPLSG BNHL-03 研究代表者
堀部敬三（国立名古屋医療センター）
： JPLSG 会長
ALCL99 研究代表者
角南勝介（成田赤十字病院）
： JPLSG LLB/ALB-03 研究代表者
菊地陽（帝京大学医学部）
： JPLSG リンパ腫委員
中澤温子*（国立成育医療研究センター）
： JPLSG リンパ腫中央診断担当
大島孝一（久留米大学医学部）
： JPLSG リンパ腫中央診断担当
小川誠司*（東京大学医学部）
： リンパ腫のゲノム構造解析
林泰秀*（群馬県立小児医療センター）
： リンパ腫のゲノム構造解析
大喜多肇*（国立成育医療研究センター）
： リンパ腫のエピゲノム解析
清河信敬*（国立成育医療研究センター）
： リンパ腫の発現遺伝子解析
*；当該研究班の分担研究者

A. 研究目的

小児リンパ腫の治療成績は改善し、長期生存率は80-90%に達している。一方で、治療抵抗を示し致命的な結果に至る例が10-20%存在し、また、治療合併症により致命的な結果に至る例、治療毒性等により重篤な障害を残し生存する例が存在する。小児リンパ腫に対する治療は多剤併用化学療法が標準的であ

り（ホジキンリンパ腫では放射線照射の併用）、既知の予後因子（病理組織型、病期、全身状態、初期治療反応性など）に基づき、それぞれの患者のリスクに応じた治療が選択されている。

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

そこで、本研究では、日本小児白血病リンパ腫研究グループ（Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group: JPLSG）による小児リンパ腫に対する臨床研究登録例を対象として、包括的な分子プロファイリング解析を目指す。包括的な分子プロファイリング解析により得られた小児リンパ腫の生物学的特性と、臨床研究により得られた小児リンパ腫の臨床情報を統合しデータベースを作成する。データベースの活用により、新たな予後因子の検出、治療標的の検出を行い、治療成績の向上に貢献することを目指す。今年度は、既登録症例について、詳細な細胞マーカー検査の実施状況、利用可能な余剰検体の保管状況の調査と試料の収集を行い、解析可能な試料について発現遺伝子解析に着手した。

B. 研究方法

1. 対象

JPLSG リンパ腫臨床研究に登録された小児

リンパ腫で、中央診断にリンパ腫標本が提出され、解析可能な余剰検体が保存されている症例 (JPLSG リンパ腫臨床研究中央診断、および余剰検体の研究利用について、患者、あるいは代諾者から書面による同意が取得されている症例) を対象とした。中央診断施設の記録を調査し、詳細な細胞マーカー検査の実施状況とその結果について解析した。

2. 試料

JPLSG リンパ腫中央診断施設に保存されている解析可能な余剰検体 (新鮮凍結検体、パラフィン固定検体、凍結浮遊細胞検体など) について調査した。

3. 解析

JPLSG リンパ腫中央診断施設に保存されている解析可能な余剰検体の一部から、常法に従って DNA、RNA の解析試料を調整した。このうち、RNA を用いて Affimetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array で発現遺伝子を網羅的に解析した。各 RNA 50ng から Ovation システム™ により cDNA を合成、増幅し、蛍光標識した後、約 45,000 の遺伝子に対する合成遺伝子配列が搭載された GeneChip と反応させる。結合しなかった余剰 cRNA を洗浄して除去したのち、各合成遺伝子配列に対する被検遺伝子断片の結合を蛍光強度としてスキャナーで読み込み、得られた結果を専用開発されたソフト GeneSpring を用いた解析によって各病型のリンパ腫細胞の RNA 発現パターンを解析した。

(倫理面への配慮)

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

い。検体提供患者の診療施設において、JPLSG リンパ腫研究の倫理審査が行われ、承認されていることを必須としている。本研究の分子解析の結果は、現時点で対象患者の治療を変更するための明確な根拠にはなり得ず、対象患者の治療に介入するものではない。したがって本研究が対象患者の治療に危険を及ぼすことはない。

C. 研究結果

1. JPLSG と関連施設での研究の承認

JPLSG および関連施設における研究に対する倫理審査等、実施に必要な手続きを終了し、研究に着手した。

2. 余剰検体保存状況の調査と試料の収集

中央診断施設のうち、成育医療研究センター (病理中央診断およびマーカー中央診断) における、本研究に使用可能な余剰検体の保管状況について調査した。リンパ芽球性リンパ腫 (LBL) については、ALB-NHL03 および LLB-NHL03 への登録症例 176 のうち、細胞あるいは組織の新鮮凍結検体の保存が確認されたものが 28 例 (15.9%)、逆に保存されていないことが確認されたものが 129 例 (73.3%) であった。また、成熟 B 細胞性リンパ腫 (B-NHL) については、B-NHL03, 04 への登録症例 346 例のうち、利用可能な検体の保存が確認されたものが 37 例 (10.7%)、保存されていないことが確認されたものが 109 (31.5%) 例であった。ただし、今後成育以外の中央診断施設での余剰検体の保管状況についての調査が進行することにより、試料保存の割合が高くなる可能性が期待される。

3. T 細胞性(T)-LBL の発現分子解析

成育医療研究センターのマーカー中央診断の記録から、ALB-NHL03、LLB-NHL03、B-NHL03, 04 登録症例のフローサイトメトリーによるマーカー解析結果を抽出した。このうち、2008 年 11 月までの登録分で、T-LBL の該当症例が 22 例あった。European Group for the Immunologic Classification of Leukemia (EGIL) による、分化段階に応じた分類では、もっとも未分化な T-I (cyCD3+, CD7+) に該当する症例はなく、T-II (T-I に加えて他の T 細胞抗原が 1 つ以上陽性) が 9 例 (40.9%) と最も頻度が高く、T-III (CD1a+) 8 例 (31.8%)、T-IV (CD1a-/sCD3+) 4 例 (18.2%) で、この他に γ δ T-細胞型が 2 例 (9.1%) 認められた (図 1)。この割合は、T-細胞性のリンパ芽球性白血病 (ALL) とほぼ同等の数値であっ

た。Aberrant な抗原の発現では、T-II のうち 5 例に Myeloid 抗原の発現を認め、そのうち 4 例 (T-LBL 全体の 18.2%) は Early T-cell precursor (ETP-)ALL (清河の報告書参照) に相当するマーカー所見を示していた。この結果から、本邦の T-LBL 症例のうち、ETP に相当する症例が ALL の場合と同様に 2 割弱存在することが明らかとなった。

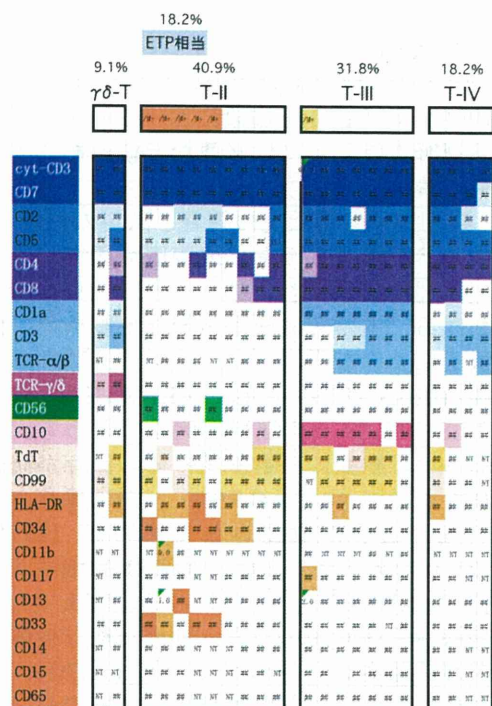


図 1 T-LBL のマーカー所見
T-LBL のマーカーの陽性率をヒートマップで示した。

上記症例のうち、解析可能な試料が保管されていた 11 症例、T-II 5 例 (うち ETP 相当 4 例)、T-III 3 例、T-IV 1 例、 $\gamma\delta$ T 2 例について、網羅的遺伝子発現解析を行なった。その結果、リンパ腫の場合でも、ETP 様のマーカー所見を示す症例は、*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、ALL の場合と同様な発現遺伝子の特徴を示すことが明らかとなった。

D. 考察

今回の研究の実施によって、本邦における全国統一的な小児リンパ腫の網羅的体系的な分子情報解析を、組織的・包括的

に推進する端緒が開かれた。既登録症例に関しては、網羅的な分子解析に利用可能な試料の保存状況は全体の 2 割弱程度であることが明らかとなった。しかし、全体の 2 割弱であっても、丹念に解析することによって、示唆に富む情報が得られることが十分に期待される。実際に、今回の検討の結果、本邦の T-LBL の症例の一部に、ETP-ALL に相当する症例が 2 割弱存在することが明らかとなり、その遺伝子発現プロファイルも同様の特徴を有することが明らかとなった。今後、予後や治療反応性などの臨床情報と相関解析を行なうことによって、現行のリンパ腫に対する治療プロトコルが ETP 様のリンパ腫に対してどの程度有効であるのか、また、リンパ腫プロトコルにおいて ETP 様のリンパ腫を層別化する必要性があるのか、といった点について明らかになることが期待される。また、その他のリンパ腫も含め、今後、遺伝子発現のみでなく、様々な分子解析を行なっていく。

既登録症例に関して検体保存が十分ではなかった要因としては、リンパ腫の場合、最終的な診断はパラフィン切片の免疫病理組織学的診断によるので、新鮮組織の提出は必須ではなく、限られた特定の施設からのみしか送付されなかったことが考えられる。また、リンパ腫の場合、その発生部位によっては腫瘍本体からの生検が困難であり、ホルマリン標本以外に検体を保存する余裕がない場合も少なくないと推測される。しかし、マーカー解析を含め、新鮮試料を用いた遺伝子解析によって、リンパ腫の各亜型の病態や発症に関わる詳細な情報が得られることが期待されることから、今後、前方視的な包括的分子プロファイリング解析と一体化した治療プロトコルの実施を計画中である。その実施体制が整うことにより、成果を応用した、診断・治療開発の推進が期待される。

E. 結論

全国規模の小児造血器腫瘍の多施設共同治療研究グループである JPLSG のリンパ腫登録例を対象とした、包括的な分子プロファイリング解析情報と、臨床研究により得られた小児リンパ腫の臨床情報を統合したデータベース構築を目指した研究を開始した。これは、本邦における小児腫瘍の全国規模の組織的・包括的な分子情報解析の先駆けであり、その成果を応用した、診断・治療開発の推進が期待される。既登録症例については、利用可能な余剰検体の保存が限られており、詳細な分子プロファイリングは一部の症例でしか実施できないが、今後は前方視的に、全例で同プロファイリングを実施可能な臨床研究を計画している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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) 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) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

難治性小児固形がんのエピゲノムを中心とした生物学的特性解析と新規診断・ 治療法開発への応用

大喜多 肇（独）国立成育医療研究センター研究所 小児血液・腫瘍研究部 室長

研究要旨：小児の腎腫瘍である腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍のメチル化解析により、腫瘍ごとに特異的なメチル化パターンを明らかとした。それぞれの腫瘍はメチル化パターンによりクラスタリング可能であった。小児の主要な腎腫瘍を解析することにより、単一の遺伝子の CpG island メチル化状態解析により腎明細胞肉腫を他の主要な小児腎腫瘍全てを鑑別することが可能であった。この方法は、臨床応用可能で、しばしば困難な小児腎腫瘍の鑑別に応用しうると考えられた。

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍 3 例ずつと対照として非腫瘍部腎組織を用い 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。Infinium Assay の結果を確認するために 10 遺伝子の CpG island のメチル化状態を EpiTYPER assay(SEQUENOM)にて各腫瘍 6 例ずつで確認した。EpiTYPER assay では、それぞれのバイサルファイト変換した CpG island 領域を PCR で増幅し、in vitro transcription で合成した核酸を酵素で分解、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分析で核酸断片を検出し、断片の質量よりメチル化状態を判定した。腎明細胞肉腫に特徴的な遺伝子に関しては、特異性を確認するために腎芽腫、間葉芽腎腫、Ewing 肉腫のメチル化状態も確認した。さらに、より簡便な方法でメチル化状態を判定するために、同遺伝子の CpG island の COBRA assay 法を確立した。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、そのバンドのパターンでメチル化状態を解析した。腎芽腫 41 例、腎明細胞肉腫 21、腎横紋筋肉腫様腫瘍、間葉芽腎腫各 6 例を用いて行い、本遺伝子のメチル化の感度と特異度を検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍、非腫瘍部腎組織の網羅的メチル化解析を Infinium DNA メチル化アッセイを用いて行い、階層的クラスタリングを行った。本アッセイでは、27,578 か所(約 14,000 以上の遺伝子)の CpG サイトを 1 塩基の解像度で解析可能で、各 CpG 部位のメチル化の程度は、メチル化検出用のプローブと非メチル化プローブの蛍光強度の比率 (β -value, 0-1 の値で示される) によって表され、0 は全くメチル化されていない状態、1 は完全にメチル化されている状態である。全プローブを用いた階層的クラスタリング、あるいは、非腫瘍部腎組織と比較して、 β 値が 0.3 以上高い CpG サイトを高メチル化、0.3 以上低いサイトを低メチル化と定義し、高および低メチル化プローブを用いた階層的クラスタリングを行ったところ、腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍、非腫瘍腎組織がそれぞれクラスターを形成し、それぞれの腫瘍に特徴的なメチル化パターンの存在が示唆された。

次に腫瘍特異的なメチル化パターンを示すプローブ及び腫瘍抑制遺伝子から 10 遺伝子 (ALDOC, PKN1, CREG1, ADRA1D, PTEN, WT1, VHL, MEST, THBS1, MGMT) 選択し、CpG island のメチル化状態を MassARRAY 法にて解析したところ、Infinium assay の結果とよく相関し、Infinium assay の結果を確認することができた。そのうち特徴的なパターンを示す 4 遺伝子の CpG サイトを用いても腫瘍のクラスタリングが可能であった。さらに 1 遺伝子の CpG サイトが CCSK で特徴的に高メチル化を示したことから着目した。小児の腫瘍な腎腫瘍すべて(腎芽腫、間葉芽腎腫、腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍)におけるメチル化パターンを解析したところ、腎明細胞肉腫以外の腫瘍全てにおいて低メチル化を示し、本遺伝子の CpG island メチル化が腎明細胞肉腫に特異的であると考えられた。さらに臨床的に応用しうる診断法を開発するために、同遺伝子のメチル化状態を COBRA 法にて判定する方法を確立した。本方法を用いて症例数を増やして解析したところ、腎明細胞肉腫では、同遺伝子は全例メチル化してお

り (21/21)、腎芽腫(0/41)、腎横紋筋肉腫様腫瘍(0/6)、間葉芽腎腫(0/6)、Ewing 肉腫(0/6)であり、本遺伝子のメチル化状態の解析は、高い感度と特異度を有し、かつ、十分実用的に安価にできる方法であった。

D. 考察

腎明細胞肉腫は、遺伝子異常がほとんど明らかになっておらず、腫瘍発生の機序や発生母地がほとんど不明である。本解析の結果より、CpG island の高メチル化が多く認められ、腫瘍発生にエピジェネティックな異常が大きく関与している可能性が示唆され、今後、エピジェネティクスの観点から腫瘍発生機序を解析する必要があると考えられた。

腫瘍において高メチル化・低メチル化を示すプローブを用いたクラスター解析で各腫瘍組織型のクラスター分けが可能であった。遺伝子を選択することにより、より少数のプローブでクラスター分けが可能であったが、特に、単一の遺伝子の CpG メチル化状態のみで、腎明細胞肉腫を他の腎腫瘍からはっきりと鑑別することが可能であった。このメチル化状態は、COBRA 法でも鑑別可能で、比較的安価に行うことが可能と考えられた。網羅的な遺伝子発現解析によって小児の腎腫瘍の鑑別が可能との報告もあるが、メチル化解析は DNA をベースにしていることからより安定であり、臨床的に応用しうると考えられた。小児の腎腫瘍は症例数が少ないことと、しばしば組織型の鑑別が難しい症例があることから、本方法のような遺伝子解析が、確定診断上有用と考えられた。

E. 結論

小児の腎腫瘍である腎明細胞肉腫、腎横紋筋肉腫様腫瘍の網羅的なメチル化解析を行ない、CCSK が高メチル化を示す腫瘍であることを明らかにした。さらに、特定の遺伝子の CpG island のメチル化によって CCSK を他の腎腫瘍と鑑別することが可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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, 齊藤正博, 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.
- 7) 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, 齊藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 土田昌宏, 小原明. TCCSG ALL 登録症例の細胞抗原とキメラ遺伝子との関連性についての検討. 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.
- 8) 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, 中舘尚也, 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.
- 9) 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, 齊藤正博, 康勝好, 真部淳. 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が急性白血病の 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.
- 10) 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.
- 11) 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, IGF1R 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.
- 12) 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.
- 13) 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

小児がんの臨床特性にかかわる遺伝子変異解析とその診断治療への応用

研究分担者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨： 近年の分子遺伝学の進歩による小児がん発症と進展の分子メカニズムの解明は、新規治療薬剤の開発につながる。今年度は我々は小児の急性骨髄性白血病(AML)の AML99 プロトコールにおける *DNMT3A* 遺伝子と *NUP98-NSD1* 融合遺伝子を解析し臨床像との関係を明らかにした。*DNMT3A* 遺伝子の解析では、AML149 例全例で変異はみられなかった。*DNMT3A* 遺伝子変異は小児 AML の発症・進展には関与しないものと思われた。*NUP98-NSD1* 融合遺伝子は 157 例中6例(3.8%)にみられ、この6例は正常核型が多く、有意に予後不良であった。GeneChip による発現アレイの解析では、*HOXA9*、*A10* が高発現であり、さらに一部の *HOXB family* も陽性で、同一の発現パターンがみられ、同様の発現パターンを示す *NUP98-NSD1* 陰性例も予後不良であった。今後、AML の risk 層別化の際には、*NUP98-NSD1* 融合遺伝子陽性例や同一発現パターンを示す症例を考慮する必要があると思われた。

A. 研究目的

近年、小児急性骨髄性白血病(AML)はクロシンキナーゼに関連する遺伝子の活性化変異と予後との関連が報告されている。我々はこれまで小児 AML 共同治療研究会で行われた AML99 プロトコールにより治療された 157 症例の遺伝子異常(*FLT3*, *KIT*, *MLL*, *RAS*, *NPM1*, *CEBPA*, *WT1* 遺伝子)と予後との相関を明らかにしてきた。今年度は *DNMT3A* 遺伝子と *NUP98-NSD1* 融合遺伝子の解析を行ない、臨床像との関係を検討した。

B. 研究方法

< *DNMT3A* 遺伝子の解析 >

AML はヘテロな疾患であり、発症に関わる遺伝子異常や染色体転座が、すでに多数明らかにされているが、正常核型の中にはまだ遺伝子変異が明らかにされていない症例が数多く存在している。近年、成人AMLで、DNAメチルトランスフェラーゼをコードする *DNMT3A* 遺伝子の体細胞変異が同定された。*DNMT3A* 遺伝子変異は中リスクの細胞遺伝学的プロファイルを有する新規AML患者(特に正常核型)で高頻度に認められ、変異例では有意に予後が不良であると報告されている。今回我々は、AML99 研究(Down 症候群は除く)で治療された AML149 例(年齢 0 才～15 才、FAB 分類では M0 5 例、M1 23 例、M2 44 例、M3 13 例、M4 22 例、M5 21 例、M6 1 例、M7 17 例、分類不能 3 例)において、RNA を用いて *DNMT3A* 遺伝子のエクソン 17 からエクソン 23 までを RT-PCR 法にて増幅後、直

接塩基決定法で変異解析を行った。

< *NUP98 - NSD* 転座の解析 >

近年、造血器腫瘍における *NUP98* 再構成を有する症例の報告が集積されつつあり、*NUP98* 再構成を有する症例は有意に予後が不良であるとの報告もみられるが、小児造血器腫瘍における臨床像は明らかでなく、多数例の検討はされていない。今回我々は、AML99 研究で治療された AML157 例の RNA を用いて、*NUP98* 遺伝子ならびに *NSD1*, *NSD2*, *NSD3* 遺伝子それぞれに複数のプライマーを設定し、RT-PCR 法にて増幅後、電気泳動でバンドを確認し、直接塩基決定法で解析を行った。

発現アレイの解析は Affymetrix 社の GeneChip を用いて行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

DNMT3A 遺伝子変異の検討では、AML149 例全例で変異は見られなかった。

米国の成人の解析では AML281 例中 62 例(22.1%)に *DNMT3A* 遺伝子の変異が認められ、変異例の 70%以上が正常核型で、*FLT3*, *NPM1*, *IDH* 遺伝子変異を高頻度に伴っており、FAB 分類の M4, M5 に比較的高頻度に認められたと報告されている(N Engl J Med 363: 2424 -33, 2010, Nat Genet 43:309-15, 2011)。しかし、今回の我々の検討では変異例は1例もみられず、本邦

の小児 AML では、欧米の報告と同様 *NPM1*、*IDH* 遺伝子変異と同じように *DNMT3A* 遺伝子変異はまれであり、年齢に依存することが示唆された。

NUP98-NSD1 融合遺伝子の検討では、AML 157 例のうち6例 (3.8%) に融合遺伝子を認めた (図1)。*NUP98-NSD2*、*NUP98-NSD3* の融合遺伝子はみられなかった。

融合遺伝子がみられた6例のうちわけは、2才～15才、M1 1例、M4 2例、M5 2例、分類不能1例で6例中4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) は同定できなかった。6例中 *FLT3-ITD* が4例、*WT1* 変異が2例、*RAS* 変異が2例、*KIT* 変異が1例みられた。発現アレイの解析では *HOXA9*、*HOXA10* の高発現に加え、一部の *HOXB* の発現もみられ、*MLL* 再構成陽性例とは異なる発現パターンを示した。

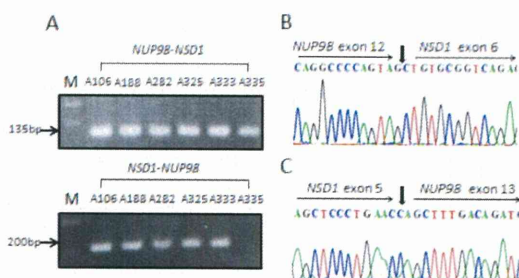


図1 *NUP98-NSD1* 融合遺伝子
A. RT-PCR による検出バンド
B. 融合点の塩基配列

D. 考察

小児 AML では、t(8;21)、t(15;17)、inv(16)が多くみられ、その予後は良好とされる一方、*KIT* 遺伝子変異、*FLT3-ITD* を有する症例は予後不良とされている。しかし、そのいずれにも属さない症例が数多く存在する。

DNMT3A 変異は成人では約20%にみられると報告されているが、今回の検討では 149 例全例で変異はみられなかった。*DNMT3A* 変異は年齢に依存することが示唆された。また民族差も考えられ、今後多数例での解析が待たれる。

NUP98-NSD1 融合遺伝子を有する 6 例は正常核型が多くみられ (図2)、有意に予後不良であった。また *HOXA9*、*A10* が高発現であり、さらに一部の *HOXB* family も陽性で、同一の発現パターンがみられ、同様の発現パターンを示す *NUP98-NSD1* 陰性例も予後不良であった。今後、AML の risk 層別化の際には、*NUP98-NSD1* 融合遺伝子を考慮する必要があると思われる。

さらに小児 AML における *NUP98-NSD1* 融合遺伝子の臨床的意義を検討するためには、より多数例での解析が必要である。現在 AML-05 プロトコール 380 症例の解析を行っている。

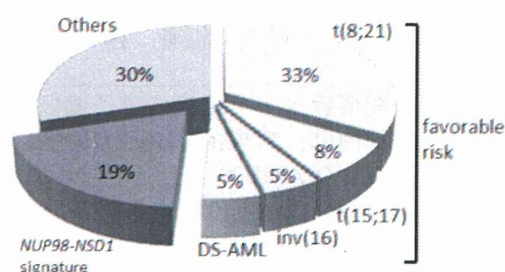


図2 小児 AML 124 例における *NUP98-NSD1* 様発現を示す例の割合

E. 結論

AML99 に登録された小児 AML 149 例と 157 例で *DNMT3A* 遺伝子変異と *NUP98-NSD1* を検討し、臨床像との相関を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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*. 2012 (in press)
- 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* 2011(in press)
- 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)
- 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
- 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.

6. 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)
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Science* 2011 Feb;102(2):302-308.
2. 学会発表
- 1) 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
 - 2) 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
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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量の推移について. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.13
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) Inukai T, Kiyokawa N, Ohara A, Takahashi H, Koh K, Manabe A, Kumagai M, Ikuta K, Hayashi Y, Tsuchida M, Campana D, Sugita K. 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, 2011.10.15
 - 12) Kiyokawa N, Iijima K, Inukai T, Takahashi H, Fukushima T, Koh Y, Sugita K, Manabe A, Kikuchi A, Kumagai M, Ohara A, Fujimoto J, Hayashi Y. Molecular characteristics of early T-cell precursor (ETP) ALL and T-ALL treated in TCCSG trials. 第 73 回日本血液学会学術集会,

- 名古屋, 2011.10.15
- 13) 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
 - 14) Yoshida K, Toki T, Park MJ, Nagata Y, Wang R, Shiraiishi 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
 - 15) 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
 - 16) 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
 - 17) 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 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, 2011.11.27
 - 18) 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, 伊藤悦朗. 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
 - 19) 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
 - 20) 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
 - 21) 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
 - 22) 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
 - 23) 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
 - 24) 飯島一智, 清河信敬, 小林健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 三春昌嗣, 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, 2011.11.25
 - 25) 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
 - 26) 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
- 27) 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
- 28) 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)の全エクソシーケンス. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 29) 清河信敬, 林 泰秀, 小原 明. Gene expression profiles of early T-cell precursor (ETP-) ALL and T-ALL treated in TCCSG trials. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.27
- 30) 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
- 31) 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
- 32) Hanada I, Terui K, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Ito E. JAK2 mutations and CRLF2 rearrangements in down syndrome associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011
- 33) Shimada A, Tomizawa D, Kinoshita A, Hamamoto K, Tsukimoto I, Ogawa A, Taga T, Imamura T, Tawa A, Horibe K, Taki T, Hayashi Y, Adachi S. Heterogeneity in infants with acute myeloid leukemia : retrospective analysis of a Japanese nationwide survey. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 2011
- 34) Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, Wang RN, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adach S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Ito E. GATA1 mutants lacking Rb-binding motif observed in transient abnormal myelopoiesis in down syndrome. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 9-13, 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

難治性リンパ系腫瘍に対する分子MRD量に基づく治療法の開発研究

分担研究者 鶴澤 正仁 愛知医科大学医学部小児科 教授

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

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

研究協力者

堀 壽成

愛知医科大学医学部小児科特任准教授

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. MRD 遺伝子再構成ターゲットの検出：これまでわれわれはMRD遺伝子再構成ターゲットの検出に、Ig/TCR遺伝子のうちIg κ 鎖、IgH鎖、TCR γ 鎖、TCR δ 鎖、TCR β 鎖を用いてきたが、新たにIgH鎖におけるDH-JH、さらにSIL-TALを追加し、再構成検出率の向上を図った。具体的にはそれぞれの遺伝子上に設定された複数のプライマーを用いて、遺伝子再構成のスクリーニングPCRを施行、heteroduplex analysisを施行してクロナリテイを確認し、得られたPCR産物についてその塩基配列を解析した。

2. MRD 定量：従来われわれは上記の解析結果より、症例特異的な塩基配列から設計したプライマーを用いて半定量的なnestedPCR法を行ってきたが、さらなる高感度な定量

と世界標準の定量精度の実現を目指しTaqman-probe法によるRQ-PCRを導入した。その過程において2010年に欧州のMRD専門研究機関(EuroMRD)への正式参加を承認され(アジアではシンガポールに次いで2番目、国内の研究施設では初)、定量技術の向上と精度管理を目的として、同機関主催による年2回のquality control roundに参加している。本研究ではこのように国際的に標準化されたMRD定量法を用いてMRD測定を実施した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 対象：平成23年4月から11月に解析された再発ALL23例、再発リンパ腫2例、乳児白血病21例の計46例を研究の対象とし、その年齢は1才未満19例、1-9才17例、10-15才6例、16才以上3例であった。再発ALLは全例がB cell precursor ALLで、Ph+ALLが1例、再発部位の内訳は骨髄再発19例、髄外再発2例、中枢神経再発1例であった。再発リンパ腫は骨髄再発1例、髄外再発1例であった。

2. MRD再構成ターゲット：再発例においてMRDスクリーニングが完了した21例中MRD再構成ターゲット検出例は19例

(90.5%)で2例が検体不足による検出不能であった。検体は21例中骨髄18例、組織(精巣)1例、髄液1例、心嚢液1例で、検体不足は精巣組織と髄液の2例であった。また検出可能であった骨髄検体中の芽球比率は90%以上6例、50~89%5例、50%未満は3例で、最低値は13%であった。検出された再構成ターゲットの総数は61で、その内訳はIgH 19(31.1%)、Igκ 12(19.7%)、TCRγ 12(19.7%)、TCRδ 11(18.0%)、TCRβ 7(11.5%)であった。症例ごとの検出可能な再構成ターゲット数は3個以上が14例、2個が4例、1個が1例であった。MRD定量が完了した症例は10例で、その定量感度は 10^{-4} 以下9例、 10^{-3} 未満10例で、 10^{-3} 以上はなかった。定量値は 10^{-3} 未満7例、 10^{-3} 以上は2例であった。

一方乳児白血病については現段階では再構成スクリーニングのみが行われ、完了19例中13例でターゲットの検出が可能で、うち6例では2個以上の再構成が検出できた。

D. 考察

小児再発ALL、再発リンパ腫における腫瘍細胞のIg/TCR遺伝子再構成は90%を超える高い頻度で検出が可能であり、十分な検体が得られれば芽球比率に関わらず複数の再構成を検出できる可能性が高いことが示された。しかしながら髄液からの再構成検出には、細胞数の確保の面から良好な結果を得られなかった。またMRD定量においては、RQ-PCRの導入により定量感度 10^{-4} 以下90%という高感度での定量が可能であった。定量値については 10^{-3} 未満の陰性例が多くを占め、今後それらの定量値と予後との相関についての評価が本研究の主眼とするところである。一方乳児白血病については、再発症例と比較して再構成検出率が低く、より幼若なクローンの存在が示唆されると同時に、本疾患においてはこの定量法の適応が限られる可能性が考えられた。

いずれの症例においても多くの症例で複数の再構成が確認され、本定量法におけるターゲット選択やoligocloneに対する配慮、また各疾患におけるサブクローンの検討が今後の課題と考えられた。

E. 結論

本年度われわれは、再発ALL、リンパ腫症例において免疫受容体遺伝子再構成を90%以

上の症例で検出し、世界標準であるRQ-PCRを用いた高感度のMRD定量を達成した。この手法の精度管理と、定量値と予後との相関についての評価、またoligocloneについての検討が今後の課題となるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

G. 研究発表

1. 原著論文

- 1) Tsurusawa M. Standard therapy and current research topics for childhood/adolescent acute lymphoblastic leukemia. Rinsho Ketsueki. 2011 Oct;52(10):1585-93.
- 2) Iwamoto S, Tsurusawa M. et al. 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) Sekimizu M, Tsurusawa M. et al. 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):612-7.
- 4) Shima H, Tsurusawa M. et al. 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.
- 5) Taga T, Tsurusawa M. et al. 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.
- 6) Shimomura Y, Tsurusawa M. et al. Assessment of late cardiotoxicity of pirarubicin (THP) in children with acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer. 2011 Sep;57(3):461-6.

- 7) Ohta H, Tsurusawa M, et al.
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、著書

- 1) 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
- 2) 鶴澤 正仁 小児ALL治療でのMRD測定 of 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

難治性小児腫瘍のゲノムプロファイリングによる臨床病態・予後指標の探索

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

研究要旨： *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ることが判明している。神経芽腫の約10%に変異や増幅が報告されているが、肺がんやリンパ腫で検出されている転座など他の異常は報告されていない。我々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。そこで、本研究では短縮型 *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。以上の結果より、変異や増幅に加えて短縮型 *ALK* は、神経芽腫における発がんメカニズムに寄与し、治療の標的となりうることが示された。

研究協力者

滝田順子（東京大学 無菌治療部・小児科）

A. 研究目的

神経芽腫は主として乳幼児期に発症する神経提由来の小児固形腫瘍であり、小児がんの中では白血病、脳腫瘍について頻度が高い。自然消退する例も一部にはあるものの、1歳以上に発症する例は極めて予後不良であり、全小児がん死亡数の約15%を占める。

近年、ゲノム解析技術の進歩により、神経芽腫の標的として *ALK* 遺伝子が同定された。*ALK* は肺がんやリンパ腫でも転座や逆位により発がんに関与する膜貫通型のチロシンキナーゼであり、生理的機能としては神経組織の分化に関与すると推定されている。神経芽腫の約10%に *ALK* の変異または増幅が見出されているが、転座など他の異常は報告されていない。我々はこれまでに、*ALK* 蛋白の発現解析により神経芽腫細胞株 NB-1 において208kDaの短縮型 *ALK* を見出したが、この短縮型 *ALK* の意義は解明されていない。そこで、本研究では新規に検出された短縮型 *ALK* の構造解析ならびに機能解析を行い、発がん機構への関与を明らかにする。

B. 研究方法

1. SNP アレイ、RT-PCR、直接塩基決定法による短縮型 *ALK* の構造解析

神経芽腫細胞株 NB-1 より抽出したゲノム

DNA を適切な制限酵素で消化し、断端に共通のアダプターを付加した後、PCR により増幅した。PCR 産物を精製し biotin ラベルをした後、GenChip 50K/250K アレイ上でハイブリダイゼーションを行った。我々が開発した CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いてデータを分析した。また NB-1 より RNA を抽出し、cDNA を作成したのち、*ALK* exon1 と 4 にプライマーを設定し、RT-PCR により増幅したのち、サンガーシークエンサーによりシークエンス解析を行った。また新鮮腫瘍 70 例を用いて、RT-PCR により短縮型 *ALK* のスクリーニングを行った。

2. 短縮型 *ALK* における機能解析

はじめに NB-1 細胞株より RNA を抽出し、Long-PCR を用いて *ALK* 全長を増幅した。増幅した転写産物を pcDNA3 ベクターに挿入し、短縮型 *ALK* を強制発現させるベクターを構築した。これをマウス線維芽細胞株 NIH3T3 に導入し、短縮型 *ALK* の自己リン酸化、ERK、STAT3 および AKT など下流分子の活性化に関する検討を行った。次に軟寒天培地を用いて、短縮型 *ALK* 発現細胞のコロニー形成能を評価した。

3. ノードマウスを用いた移植実験

短縮型 *ALK* を発現する NIH3T3 細胞を 5 匹のノードマウスの背部に各 2 か所ずつ移植して 21 日後の腫瘍形成能を観察した。陽性コントロールとして *ALK*1174 変異陽性細

胞を用いた。

4. 神経芽腫細胞における ALK 阻害剤および siRNA による短縮型 ALK の抑制効果

ALK を特異的にノックダウンする二十鎖 siRNA を用いて、NB1-細胞株および野生型 ALK を発現する NH-12 における増殖抑制効果を検討した。また TAE684 を用いて、NB-1、NH-12 および ALK1174 変異、ALK1275 変異を有する SK-N-SH 細胞株と TGW 細胞株における IC50 値を測定し、各細胞に対する阻害剤の増殖抑制効果を解析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 短縮型 ALK の構造解析：NB-1 ゲノムを用いた SNP アレイ解析により、ALK 領域の高度増幅が検出された。増幅領域の中の ALK intron 1 から 4 に位置する連続する SNP(Chr2: 29,911,541 to 29,912,210)のシグナル低下が見出され、この領域内に切断点を有する欠失アレルが優位に増幅していることが推測された。また RT-PCR 解析およびサンガーシークエンスの結果 exon2、3 の in-frame deletion が確認された。これらの結果から、ALK intron 1 から 4 のゲノム上の欠失により exon 2、3 の in-frame deletion が生じることが短縮型 ALK の要因である可能性が示唆された。新鮮腫瘍 70 例における短縮型 ALK のスクリーニングでは、同様の転写産物は検出されなかった。

2. 短縮型 ALK における機能解析：短縮型 ALK を強制発現された NIH3T3 細胞では、短縮型 ALK の強い自己リン酸化が検出された。下流分子の活性化の検討では、ERK および AKT のリン酸化は検出されなかったものの、STAT3 のリン酸化が検出された。またコロニーアッセイでは、野生型 ALK を発現する細胞と比べて短縮型 ALK を発現する細胞において有意なコロニー形成能が観察された。

3. ノードマウスを用いた移植実験：短縮型 ALK を発現する NIH3T3 細胞を移植したヌー

ドマウスでは 21 日後に 100%の腫瘍形成がみられたが、野生型 ALK を発現する細胞を移植したマウスでは腫瘍は形成されなかった。ALK1174 変異陽性細胞を陽性コントロールとしたが、短縮型 ALK 発現細胞を移植した場合と腫瘍の大きさに有意差はみられなかった。5 匹のうち 3 匹のマウスでは肝臓、腎臓などに多発転移巣を形成していることが判明した。

4. 神経芽腫細胞における ALK 阻害剤および siRNA による短縮型 ALK の抑制効果：siRNA を、NB1-細胞株および野生型 ALK を発現する NH-12 細胞株に導入して ALK の発現抑制効果を観察したところ、導入後 2 日から 5 日までの期間強い抑制効果が認められた。NB1-細胞株では siRNA 導入後 2 日目から有意な増殖抑制がみられたが NH-12 細胞株では増殖抑制がみられなかった。次に ALK 阻害剤である TAE684 を用いて、神経芽腫細胞株における IC50 値を検討したところ、ALK1174 変異を有する SK-N-SH 細胞株と NB-1 細胞株で著明に増殖抑制効率がよく、IC50 値も低値であった。しかし 1275 変異を有する TGW 細胞株や野生型細胞株では増殖抑制は軽度であった。

D. 考察

神経芽腫細胞株 NB-1 で見出された短縮型 ALK の頻度は少ないものの、点突然変異や増幅に加えて神経芽腫における新たな活性型変異であることが明らかとなった。短縮型 ALK では exon2 と 3 が欠失しているが、この領域は細胞外ドメインであり、リガンド結合部位に近接している。従って、exon2 と 3 の欠失によるリガンド結合部位周辺の構造異常が生じ、リガンドの結合を阻害している可能性が考えられる。ALK と同じ膜貫通型のチロシンキナーゼである EGFR、RON および MET でも細胞外ドメインの欠失が報告されており、これらの短縮型キナーゼはリガンド非依存的に活性化されていることが判明している。EGFR や RON は、リガンド非依存的に二量体を形成し、下流のアダプター蛋白の活性化を促すことが報告されている。短縮型 ALK の活性化のメカニズムは解明されていないものの、短縮型 EGFR や RON と同様のメカニズムを有する可能性が示唆された。

E. 結論

神経芽腫細胞株で見出された短縮型 ALK

は、ゲノムの欠失が原因で生じており、神経芽腫における新活性型変異体であることが明らかとなった。ALK における短縮型活性変異体の報告は他のがん腫ではこれまでになく、新規のものである。この活性型変異体の頻度は少ないものの新たな治療の標的となりうることを示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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*. 2012 Jan 16. doi: 10.1038/onc.2011.616. [Epub ahead of print]

2) 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*.156: 672-674, 2012

3) Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y and Ogawa S: Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Science*. 102:1645-1650, 2011

4) 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

5) Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y: Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 102:302-308, 2011

6) 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

2. 学会発表

1) Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Nomoto J, Hayashi Y, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Ishikawa Y, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S: Genome-Wide Analysis Identified Frequent Inactivation of A20 in B-Cell Type Malignant Lymphomas. 7th Congress of Asian Society for Pediatric

Research, Denver Colorado, April 30-May 3, 2011

2) Adachi M, Takita J, Nishimura R, Sanada M, Hiwatari M, Oki K, Okubo J, Hayashi Y, Ogawa S, Igarashi T: Exon Targeted Resequencing of Neuroblastomas. 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Denver Colorado, April 30-May 3, 2011

3) Nishimura R, Takita J, Kato M, Yuan C, Sanada M, Kikuchi A, Hayashi Y, Ogawa S, Igarashi T. Genome-Wide Copy Number Analysis in Rhabdomyosarcoma Using SNP-Genotyping Microarray. 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Denver Colorado, April 30-May 3, 2011

4) 大木健太郎, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力, 大久保淳, 安達正時, 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 dehydrogenase1/2 の変異解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011 年 8 月 12 日~14 日

5) 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 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 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011 年 8 月 12 日~14 日

7) 大久保淳, 滝田順子, 大木健太郎, 西村力, 安達正時, 加藤元博, 真田昌, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆: 神経芽腫における部分欠損型 ALK の造腫瘍性に関する検討. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011 年 8 月 12 日~14 日

8) 西村力, 滝田順子, 大木健太郎, 金兼弘和, 大多喜肇, 藤本純一郎, 加藤元博, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆: ユーイング肉腫発症における ALK の役割. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011 年 8 月 12 日~14 日

9) 西村力, 滝田順子, 加藤元博, 陳玉彦, 真田昌, 菊地陽, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆: 横紋筋肉腫における ALK 遺伝子の関与についての検討. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011 年 8 月 12 日~14 日

10) 安達正時, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力, 大木健太郎, 大久保淳, 真田昌, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆: 小児固形腫瘍における NOTCH シグナルの発現様式と遺伝子変異の解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011 年 8 月 12 日~14 日

11) 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 年 8 月 12 日 ~ 14 日

12) 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 年 8 月 12 日 ~ 14 日

13) 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 年 10 月 3 日 ~ 5 日

14) 大久保淳, 大木健太郎, 滝田順子, 樋渡光輝, 西村力, 真田昌, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司: 小児固形腫瘍における IDH 変異の解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日 ~ 5 日

15) 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 年 10 月 3 日 ~ 5 日

16) 大西伸幸, サンペトラオルデア, 杉原英志, 滝田順子, 西村力, 田沼延公, 小川誠司, 佐谷秀行: 神経幹細胞を用いたマウス脳腫瘍モデルの構築. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日 ~ 5 日

17) 柴徳生, 滝智彦, 朴明子, 加藤元博, 真田昌, 樋渡光輝, 滝田順子, 金澤崇, 長澤正之, 大西宏明, 荒川浩一, 小川誠司, 林泰秀: 小児白血病 245 例における CBL 遺伝子の解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日 ~ 5 日

18) 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 年 10 月 14 日 ~ 16 日

19) Hiwatari M, Ohki K, Takita J, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: Mutational 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 年 10 月 14 日 ~ 16 日

20) 滝田順子: 神経芽腫における ALK pathway の解析とその阻害剤. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011 年 11 月 25 日 ~ 27 日

21) 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 年 11 月 25 日 ~ 27 日

22) 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, 林泰秀, 五十嵐隆, 宮野悟, 小川誠司: 次世代シーケンサによる神経芽腫のエクソーム解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011 年 11 月 25 日 ~ 27 日

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

ゲノム・遺伝子発現情報からみた小児がんの臨床的特性の解明と治療への応用

研究代表者 大平 美紀 千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室 室長

研究要旨：骨肉腫、肝芽腫、腎芽腫などの難治性小児がんの新規治療法の開発につながる標的遺伝子の同定と腫瘍層別化システムの構築を目標として、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析とゲノムコピー数異常解析による腫瘍の悪性度や患者予後に強く関わる分子的特徴の検索を行っている。今年度は小児骨肉腫の予後ならびに化学療法感受性に関わる分子プロファイルの解明を目的に、治療前のバイオプシーサンプルを用いたゲノムコピー数解析を行った。予後に強く関連すると期待される染色体領域が複数見いだされたほか、治療感受性の異なる3つのグループにそれぞれ相関するゲノム異常プロファイルが抽出された。今後これらのマーカー候補について症例数を加えた検証を進める。

A. 研究目的

近年の化学療法の進展により、小児がんの予後は飛躍的に向上したものの、一部の小児がんについては依然として予後不良であり、早期層別化と新たな治療法の開発が望まれる。また、小児がんの臨床においては、治療後の生活の質を重視した治療戦略の選択は特に重要であり、その観点からも精度の高い腫瘍リスク分類システムの構築が急務である。そこで本研究では、骨肉腫、肝芽腫、腎芽腫などの難治性小児がんを対象に、悪性度などの臨床的特性の異なる小児がん由来組織の遺伝子発現やゲノム異常等の分子プロファイルを検索し、背景にある分子的特徴を明らかにすることにより、治療標的候補の同定と腫瘍層別化による効率的な治療システムの構築に応用することを目的とする。

本年度は骨原発性悪性腫瘍の中で最も多い骨肉腫を主な対象として研究を進めた。骨肉腫は近年多剤併用化学療法と手術等による局所療法を組み合わせにより5年生存率は約80%に達するようになったが、化学療法が奏効しない症例もしばしば見られ、その5年生存率は約30%と未だに予後不良である。現在の化学療法に対する感受性予測のためのマーカーの同定を目的に、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル、アレイCGH解析、遺伝子変異検索によるゲノム異常の情報と予後情報の統計解析により層別化

に必要な因子の絞り込みを行い、治療後のQOL改善と治癒率向上を目標とした化学療法奏効性予測法の構築と新規リスク分類の提示を目指す。

B. 研究方法

1. 症例の収集と選択：

千葉県がんセンター整形外科では10年以上前より骨軟部腫瘍臨床検体の保存を行っており、凍結された組織は同センターがんバイオバンクに適切に保管管理されている。本研究では当センターにおいて治療を受け、バイオバンクに腫瘍組織が保存された骨肉腫患者68例の中から、均一な背景、すなわち初診時に転移がなく、四肢発生であり、同一Neoadjuvant化学療法プロトコールNECO-95J治療を受け、広範切除以上の外科的治療を施行した症例群22例（生存：14例、死亡：8例）を抽出し、解析を行った。核酸抽出には全例化学療法施行前のバイオプシーサンプルを用いた。

2. ゲノムコピー数異常解析：

上記骨肉腫生検試料由来のゲノムDNA500ngを出発材料に、ヒトオリゴアレイ（アジレント社 Whole Human Genome oligo DNA microarray, 4x44k フォーマット）を用いてアレイCGH解析を行った。対照コントロールにはヒト胎盤由来DNA500ngを全例について用いた。ハイブ