

FIG E2. The 46 patients definitively diagnosed with non-IgE-mediated food allergies were analyzed for 5 variables by using an agglomerative (bottom-up) approach and Ward's linkage, and a dendrogram was generated.

688.e4 LETTERS TO THE EDITOR

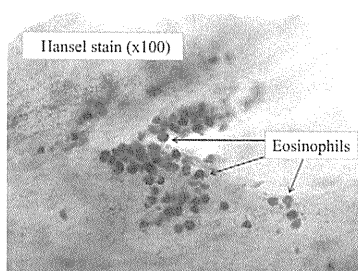


FIG E3. Detection of accumulations of eosinophils in the stool mucus. The mucous part of the stool was thinly smeared on a glass slide and stained by using Hansel stain. The stool sample was taken from a patient in cluster 2 after a positive food challenge test. Representative images were found in a total of 13 patients (Table I).

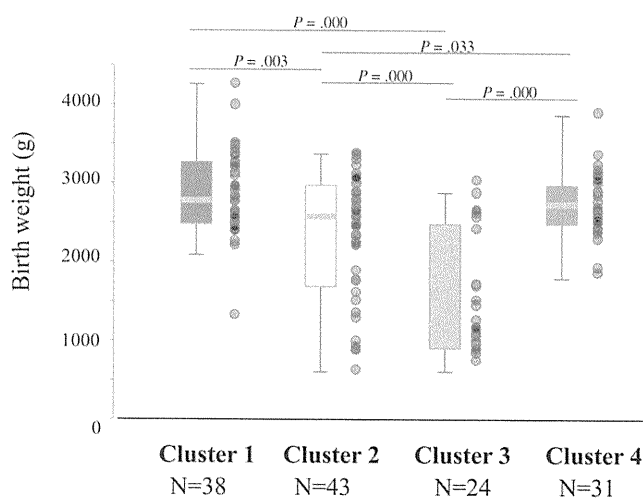


FIG E4. The birth weights in each cluster of the 136 patients who fulfilled 3 elements of the Powell criteria for a non-IgE-mediated allergy are shown.^{E2} The birth weights in cluster 3 were significantly lower than in the other clusters. Moreover, 2 subgroups seem to be identified in cluster 3: a lower birth weight group and a normal birth weight group.

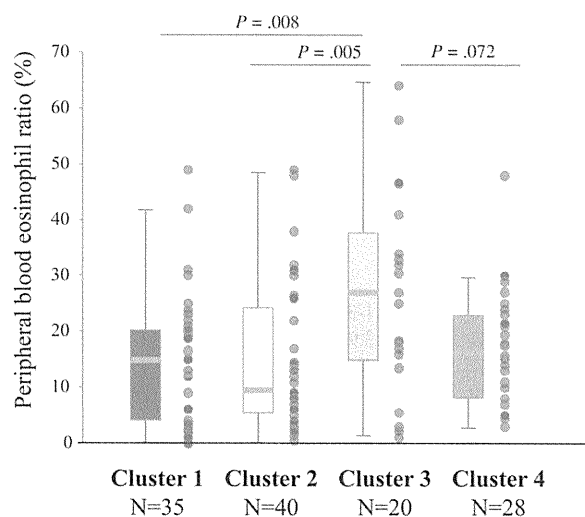


FIG E5. The peripheral blood eosinophil ratios in each cluster of the 136 patients who fulfilled 3 elements of the Powell criteria are shown.^{E2} Although eosinophilia was found in all 4 clusters, the eosinophil ratios of the patients in cluster 3 were significantly higher than those of the patients in clusters 1 and 2.

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 127, NUMBER 3

LETTERS TO THE EDITOR 688.e7

TABLE E1. Clinical features of most severe cases of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies*

Patient no.	Sex	Cluster	Complication	Day of onset	Diet right before the onset of complications	Remarks
1	F	1	Ileus	8	Cow's milk 7 d	
2	M	1	Ileus	5	Cow's milk 3 d, breast milk 6 d	Relieved by surgical operation
3	F	1	Ileus	8	Breast milk 9 d	Relieved by surgical operation
4	F	1	Shock	2	Cow's milk 2-3 times	Massive bloody stool, blood infusion required
5	F	1	Shock	21	Breast milk 18 d	Massive bloody stool, disseminated intravascular coagulation
6	F	2	Ileus	14	Breast milk 2 d	
7	F	2	Shock	36	Breast milk 30 d	Apnea, vomiting
8	M	2	Shock	30	Cow's milk 50 mL by chance	Vomiting
9	M	2	Shock	241	Soy food 2-3 times	Vomiting and diarrhea, ICU admission
10	M	3	Ileus	61	Breast milk 45 d	Cholestasis
11	F	3	Shock	22	Cow's milk 21 d, breast milk 21 d	ICU admission
12	F	3	Severe weight loss	12	Breast milk several months	Developmental retardation
13	M	3	Severe weight loss	46	Cow's milk 30 d, breast milk 30 d	Developmental retardation
14	F	4	Ileus	2	Cow's milk 6 d, breast milk 3 d	Stenosis of sigmoid colon
15	F	4	Ileus	7	Cow's milk 10 d	

F, Female; ICU, intensive care unit; M, male.

*These patients fulfilled 3 elements of the Powell criteria,^{E2} but oral challenge tests were not performed.

TABLE E2. Demographics of the 136 patients who fulfilled 3 elements of the Powell criteria^{E2}

Clinical characteristics	Cluster 1 (n = 38)	Cluster 2 (n = 43)	Cluster 3 (n = 24)	Cluster 4 (n = 31)	P value
Birth weight (g)	2823 (2501-3267)	2581 (1779-3016)	1363 (1023-2611)	2778 (2512-3100)	.000 *
Male/female	19/19	28/15	13/11	12/19	.16
Initial presentation					
Day of onset	6 (4-8)	29 (7.5-52)	16.5 (9.5-37.5)	7 (2-35)	.01*
Vomiting (%)	100	100	0	0	.000*
Bloody stool (%)	100	0	0	100	.000*
(Laboratory data)†	n	n	n	n	
Blood eosinophil ratio (%)	35	40	20	28	.005*
WBC ($\times 10^3$ /mL)	15 (3.5-21.0)	9 (5.3-25.0)	26 (14.1-39.3)	17 (8.5-23.8)	.16
Total IgE (IU/mL)	32	40	22	28	.001*
Positive for milk-specific IgE (class ≥ 1) (%)	5.2 (4.1-23.1)	5.8 (4.0-17.8)	13.2 (5.5-122.9)	5.0 (3.3-6.0)	.24
C-reactive protein (% positive, ≥ 0.5)	31	38	20	27	.69
	36	40	20	27	

WBC, White blood cell count.

Data are shown as the median and the interquartile range.

* $P < .05$.

†n, Number with medical records.

Aberrations of *NEGR1* on 1p31 and *MYEOV* on 11q13 in neuroblastoma

Junko Takita,^{1,2,6} Yuyan Chen,² Jun Okubo,² Masashi Sanada,³ Masatoki Adachi,² Kentaro Ohki,² Riki Nishimura,² Ryoji Hanada,⁴ Takashi Igarashi,² Yasuhide Hayashi⁵ and Seishi Ogawa³

Departments of ¹Cell Therapy and Transplantation Medicine, ²Pediatrics, and ³Cancer Genomics Project, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo; ⁴Division of Hematology/Oncology, Saitama Children's Medical Center, Saitama; ⁵Gunma Children's Medical Center, Maebashi, Japan

(Received February 9, 2011/Revised May 12, 2011/Accepted May 25, 2011/Accepted manuscript online May 30, 2011/Article first published online July 4, 2011)

MYEOV and *NEGR1* are novel candidate gene targets in neuroblastoma that were identified by chromosomal gain in 11q13 and loss in 1p31, respectively, through single nucleotide polymorphism array analysis. In the present study, to assess the involvement of *MYEOV* and *NEGR1* in the pathogenesis of neuroblastoma, we analyzed their mutation status and/or expression profiles in a panel of 55 neuroblastoma samples, including 25 cell lines, followed by additional functional studies. No tumor-specific mutations of *MYEOV* or *NEGR1* were identified in our case series. Expression of *MYEOV* was upregulated in 11 of 25 cell lines (44%) and in seven of 20 fresh tumors (35%). The siRNA-mediated knock-down of *MYEOV* in NB-19 cells, which exhibit high expression of *MYEOV*, resulted in a significant decrease in cell proliferation ($P = 0.0027$). Conversely, expression studies of *NEGR1* revealed significantly lower expression of this gene in neuroblastomas at an advanced stage of the disease. Exogenous *NEGR1* expression in neuroblastoma cells induced significant inhibition of cell growth ($P = 0.019$). The results of these studies provide supporting evidence for *MYEOV* and *NEGR1* as gene targets of 11q13 gains and 1p31 deletions in a neuroblastoma subset. In addition, the findings suggest a possible prognostic value for *NEGR1* in neuroblastoma. (*Cancer Sci* 2011; 102: 1645–1650)

Neuroblastoma is one of the most common forms of solid tumors in childhood and accounts for approximately 15% of all pediatric cancer deaths.⁽¹⁾ Despite recent advances in chemoradiotherapy, the prognosis for advanced neuroblastoma remains poor, with an approximate 40% 5-year survival, underscoring the importance of developing novel therapeutic modalities on the basis of an understanding of the pathogenesis of neuroblastoma.⁽¹⁾ Conversely, knowledge of the molecular pathogenesis of neuroblastoma is largely limited in terms of targets, except for the role of *MYCN* amplifications in advanced neuroblastoma.⁽²⁾ Thus, the recent discovery of *ALK* mutations/amplifications in 6–8% of neuroblastomas^(3–6) represents a major development in neuroblastoma research because it not only unravels a novel molecular mechanism involved in neuroblastoma development, but could also be a basis for the development of molecular-targeted therapies using *ALK* inhibitors.^(3–6) Similar to a number of novel genetic targets discovered recently in other human cancers, *ALK* mutations were identified through genome-wide analyses of copy numbers using high-throughput technologies, including high-density single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping microarrays.^(3–6) A number of recurrent copy number changes other than those of the *ALK* locus have been identified by genome-wide copy number analysis of neuroblastoma, including losses of 1p31, 3q13, 9p24, 15q11, and 16p13, and high-grade amplifications of 1p36, 7q21, 7q31, 11q13, and 15q13,⁽³⁾ which may provide important clues for the identification of novel target genes. In fact, several candidate target genes of these common deletions and amplifications have been identified, including *MYEOV* as the target of gains/amplifi-

cations in 11q13⁽⁷⁾ and *NEGR1* as a candidate tumor suppressor in 1p31 deletions.⁽⁸⁾ Previously, *MYEOV* was reported as a putative transforming gene within the 11q13 amplicons in multiple myeloma,⁽⁹⁾ whereas *NEGR1* was described as a member of the IgLON (limbic system-associated membrane protein [LAMP]/opioid-binding cell adhesion molecule [OBCAM]/neurotrimin subgroup of the immunoglobulin superfamily) family of cell adhesion molecules.⁽⁸⁾ However, the involvement of these genes aberrations in the pathogenesis of neuroblastoma remains unknown. Therefore, in the present study we focused on the abnormalities in both genes and assessed their role, both genetically and functionally, in the pathogenesis of neuroblastoma.

Materials and Methods

Specimens. Primary neuroblastoma specimens were obtained at the time of surgery or biopsy from patients who had been diagnosed with neuroblastoma and had been admitted to Tokyo University Hospital, Saitama Children's Medical Center, or various other hospitals between November 1993 and October 2006. Patients were staged according to the International Neuroblastoma Staging System,⁽¹⁰⁾ with five patients classified as Stage 3 and 25 classified as Stage 4. The clinicopathological findings for all patients are listed in Table 1. Twenty-five neuroblastoma cell lines were also used in the present study (Table 2). The SCMC-N2 series was established in our laboratory,⁽¹¹⁾ the SJNB series and UTP-N-1⁽¹²⁾ were generous gifts from Drs A.T. Look (Department of Pediatric Oncology, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, USA) and A. Inoue (Department of Molecular Biology, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan), respectively; all other cell lines were obtained from the Japanese Cancer Resource Cell Bank (<http://cellbank.nibio.go.jp/www/jcrbj.htm>, accessed 7 Sep 2008). All cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from the 25 cell lines and 20 frozen stocked tumors using Isogen reagent (Nippon Gene, Osaka, Japan) according to the manufacturer's instructions and was subjected to reverse-transcription reactions to synthesize cDNA using the SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA synthesis (Life Technologies, Rockville, MD, USA). Semi-quantitative RT-PCR analysis for *MYEOV*, *CCND1*, and *NEGR1* gene expression was performed as described previously⁽¹³⁾ using the primer sets listed in Table S1, available as an accessory publication to this paper. The concentration of the cDNA was normalized against that of β -actin, used as an internal control. The signal intensity of *MYEOV* and *CCND1* expression was estimated using NIH

⁶To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jtakita-ky@umin.ac.jp

Table 1. Clinical data for the neuroblastoma cases in the present study

Case no.	Age	Stage	Diagnosis	Histology	MYCN amplification	Outcome
1	4 years 2 months	4	C	NBL poorly dif.	+	Alive
2	2 years 4 months	4	C	NBL poorly dif.	+	Alive
3	4 years	4	C	NBL poorly dif.	+	Alive
4	3 years	4	C	NBL poorly dif.	-	Alive
5	1 year 5 months	4	C	NBL poorly dif.	-	Alive
6	10 day	3	C	NBL dif.	-	Alive
7	4 years	4	C	NBL poorly dif.	-	Dead
8	4 years 2 months	4	C	NBL poorly dif.	-	Alive
9	2 years	3	C	GNB well dif.	-	Alive
10	10 years	4	C	NBL	-	Dead
11	4 years	4	C	NBL	+	Dead
12	3 years	3	C	NBL	+	Alive
13	11 years 9 months	4	C	NBL poorly dif.	-	Alive
14	6 months	3	MS	GNB	-	Alive
15	7 months	4	MS	NBL poorly dif.	-	Dead
16	4 years	4	C	NBL	+	Dead
17	4 years 9 months	4	C	NBL	-	Dead
18	7 months	4	MS	NBL	-	Alive
19	2 years	4	C	NBL poorly dif.	+	Alive
20	3 years	4	C	NBL	+	Dead
21	8 years	4	C	NBL poorly dif.	-	Alive
22	2 years 3 months	4	C	NBL	+	Alive
23	4 years	4	C	NBL	+	Dead
24	5 months	4	C	NBL	-	Alive
25	5 years	4	C	NBL	-	Dead
26	4 years 10 months	4	C	NBL	-	Alive
27	7 years	4	C	NBL poorly dif.	+	Dead
28	1 year 6 months	3	C	NBL	-	Alive
29	1 year 8 months	4	C	NBL	-	Alive
30	8 months	4	C	NBL	-	Alive

C, clinical; MS, mass screening program; NBL, neuroblastoma; NBL poorly dif., poorly differentiated neuroblastoma; GNB, ganglioneuroblastoma; GNB well dif., well-differentiated ganglioneuroblastoma.

Table 2. Neuroblastoma cell lines used in the present study

Cell line	MYCN amplification
CHP-134	-
GOTO	+
IMR-32	+
LAN-1	+
LAN-2	+
LAN-5	+
NB-1	-
NB-16	+
NB-19	+
NB-69	-
NH-12	+
SCMC-N2	+
SCMC-N4	+
SCMC-N5	+
SJNB-1	-
SJNB-2	+
SJNB-3	-
SJNB-4	+
SJNB-5	+
SJNB-6	+
SJNB-7	+
SJNB-8	+
SK-N-SH	-
TGW	+
UTP-N-1	+

Image 1.61 software (Wayne Rasband; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Quantitative RT-PCR. To quantify the expression levels of *NEGR1*, real-time PCR (RQ-PCR) analysis was performed using the QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Tokyo, Japan) with an iCycler iQ real-time PCR detection system (Bio-Rad Japan, Tokyo, Japan). The primer sets used for the RQ-PCR are listed in Table S1 and the PCR conditions were as described previously.⁽¹³⁾ For the purpose of normalization, relative expression levels were calculated by dividing the expression level of the respective gene by that of β -actin.

Mutational analysis of *MYEOV* and *NEGR1* genes. Genetic screening for *MYEOV* and *NEGR1* genes in 25 cell lines was performed by denaturing HPLC (DHPLC) using the WAVE System Model 4500 (Transgenomic, Omaha, NE, USA), as described previously.⁽¹⁴⁾ The primer sets used in the present study are listed in Table S1.

Bisulfate modification and methylation-specific PCR. Bisulfate modification of genomic DNA was performed as described previously.⁽¹⁵⁾ For methylation-specific PCR (MSP), approximately 10 ng bisulfite-treated DNA was amplified with primers for both the methylated and unmethylated sequences. Reaction products were separated by electrophoresis on a 2.0% agarose gel. The primer sets for methylation-specific PCR analysis are listed in Table S1.

Knockdown of *MYEOV* using siRNA. The functional roles of the *MYEOV* gene in neuroblastoma cells was assessed using gene knockdown with siRNA.⁽¹⁶⁾ The siRNA was designed and synthesized for silencing *MYEOV* (Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA). The siRNA duplex had the following sequences: 1132 sense, 5'-UCA ACG CCC ACU CUA AAG GCU UCU C-3'; and 1132 antisense, 5'-GAG AAG CCU UUA GAG UGG GCG UUG A-3'. A chemically synthesized non-silencing siRNA duplex that had no known homology to any mammalian gene was used as a control for non-specific silencing events and had the following sequences: sense, 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdT dT-3'; and antisense, 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdT dT-3'. Gene knockdown was achieved in NB-19, CHP-134 and PF-SK-1 cells using HiPerFect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Transient transfection. The expression vector (pME18S) containing the full-length *EcoRI-XbaI* fragment of the *NEGR1* cDNA was transfected into NB-19, SJNB-7, and PF-SK-1 cells using the lipofection method according to the manufacturer's instructions (Qiagen).⁽¹¹⁾ Briefly, 1.5×10^5 cells were seeded in a six-well plate and incubated in 1.6 mL RPMI 1640 (Gibco-BRL) with 10 μ L Effectance reagent (Qiagen), 3.2 μ L Enhancer (1:8) (Qiagen), 10 μ L Effectene (Qiagen), and 0.4 μ g expression vector. Cells were counted 72 h after transfection.

Statistical analysis. Expression of the *NEGR1* gene was compared between favorable and unfavorable cases of neuroblastomas using the Mann-Whitney *U*-test. Exact 95% confidence intervals (CI) of the proportions were calculated on the basis of binomial distribution. The Kruskal-Wallis test was used to compare the functional effects of *MYEOV* inhibition and *NEGR1* expression in neuroblastoma cells.

Results

Gain and high-grade amplification of 11q13 involving the *MYEOV* locus in neuroblastoma. In the present series, gains of chromosome 11q13 were detected in multiple neuroblastoma

cases.⁽³⁾ Within this gain, a high-grade amplification was found in a single case with Stage 4 disease (Case 22; Fig. 1a). The critical amplicon that had minimum overlapping amplification/gain was found in a 340-kb region exclusively containing *MYEOV*, located 360 kb upstream from the *CCND1* locus⁽⁷⁾ (Fig. 1a). Previously, *MYEOV* had been identified as a putative transforming gene based on the NIH/3T3 tumorigenicity assay⁽⁹⁾ and was shown to be highly expressed in a subset of multiple myelomas harboring t(11;14)(q13;q32).⁽⁷⁾ We further examined the expression patterns of *MYEOV* in a total of 45 neuroblastoma samples using semi-quantitative RT-PCR analysis, in which 11 of 25 cell lines (44%) and seven of 20 fresh tumors (35%) showed higher expression levels of *MYEOV* compared with the median expression level (*MYEOV*/ β -actin signal intensity = 1.4; Fig. 1b). Although most tumors exhibited increased expression of both *CCND1* and *MYEOV*, Case 22 showed high expression of *MYEOV* but not *CCND1* (Fig. 1c). Mutational analysis of the coding region of *MYEOV* was also performed in 25 cell lines, but no tumor-specific mutations were detected.

Homozygous deletion on 1p31 detected in neuroblastoma. Detection of homozygous deletions was also of interest because they provide an important clue in pinpointing tumor suppressor loci. In an allele-specific copy number analyzer for GeneChip (CNAG) and allele-specific copy number analysis using anonymous references (AsCNAR), homozygous deletions could be identified as the loss of both parental alleles, even in the presence of significant components of normal tissues.⁽³⁾ In the present study, 70 homozygous deletions were identified at 50 independent loci in the neuroblastoma samples. Unfortunately, we were not able to completely exclude the possibility that some may represent copy number variations (CNV) rather than real homozygous deletions, because paired DNA was available only in four primary neuroblastoma cases and many homozygous deletions were found in established neuroblastoma cell

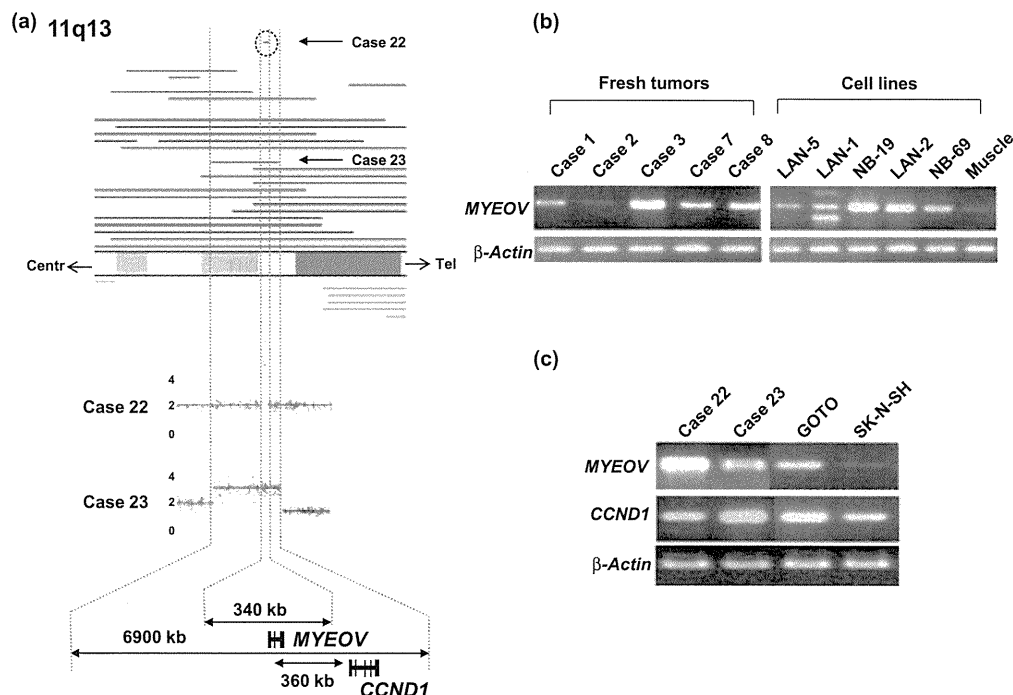


Fig. 1. Gains and high-grade amplification on chromosome 11q13 in neuroblastoma. (a) A common 340-kb region having copy number (CN) gains contains a single known gene, *MYEOV*. In addition, *CCND1* is frequently contained in CN gains at 11q13, but mapped outside the minimum region of common CN gains. Red bars, gains ($3 < CN < 5$); green bars, losses ($CN = 1$); light red bar (circled), high-grade amplification ($CN \geq 5$). (b) Representative results of *MYEOV* expression in fresh tumors and cell lines (RNA from normal muscle was used as a control). (c) Expression of *MYEOV* and *CCND1* in Cases 22 and 23 (RNA from normal muscle was used as a control). The expression of *MYEOV* in Case 22 tended to be higher than that in Case 23. tel, telomere; centr, centromere.

lines. Complete loss of genetic material at eight loci was confirmed by genomic PCR (data not shown).

Of the 70 homozygous deletions identified, we focused on a homozygous deletion involving a 370-kb region at 1p31 in NB-19. This region contains a part of *NEGR* (exon 1 and a part of intron 1), a unique candidate target gene, which was also disrupted by a translocation in another cell line, namely SJNB-6 (Fig. 2a,b). Because *NEGR1* encodes a member of the IgLON family of cell adhesion molecule and has been reported to be a putative tumor suppressor gene in ovarian cancer,⁽⁸⁾ we examined its expression in neuroblastoma cases in the present study to evaluate the clinical impact of *NEGR1* expression. As shown in Figure 2(c), *NEGR1* expression was absent or very low in 10 of 25 (40%) cell lines, as determined by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 2c). In quantitative RT-PCR analysis using fresh tumor samples (20 fresh advanced-stage tumors and an additional 20 cases of early stage tumors), the expression of the *NEGR1* gene was significantly lower in advanced-stage tumors compared with early stage tumors ($P = 0.0041$; Fig. 2c). Similarly, the expression of the *NEGR1* gene was significantly lower in patients who died compared with patients who survived ($P = 0.018$; Fig. S1). Mutation analysis was also performed in neuroblastoma cell lines, but no tumor-specific mutations were detected. Methylation analysis of the promoter region of *NEGR1* using 10 neuroblastoma cell lines without *NEGR1* expression did not reveal any tumor-specific methylation pattern in neuroblastoma cell lines or fresh neuroblastoma samples (data not shown).

Functional analyses of *MYEOV* and *NEGR1* in neuroblastoma cell lines. We further evaluated the oncogenic potential of *MYEOV* using siRNA-mediated gene knockdown in the NB-19 cell line, which highly expresses *MYEOV*. As shown in Figure 3(a,b). When *MYEOV* expression was suppressed by siRNA, NB-19 cells exhibited retarded growth compared with the growth of control cells ($P = 0.0027$), indicating that *MYEOV* positively regulates cell proliferation (Fig. 3a,b). Similar results were obtained in CHP-134 and PF-SK-1 cells (Fig. S2). To assess the tumor suppressor function of *NEGR1* in neuroblastoma cells, we generated an *NEGR1* expression vector that was transiently transfected into NB-19 cells, in which *NEGR1* is homozygously deleted. Expression of *NEGR1* significantly suppressed the proliferation of NB-19 cells compared with mock transfection ($P = 0.019$; Fig. 3c,d). In addition, the *NEGR1* expression vector was transiently transfected into SJNB-7 and PF-SK-1 cells, in which *NEGR1* expression is absent. Following transfection into these cell lines, profound inhibition of cell proliferation was observed for both SJNB-7 and PF-SK-1 cells expressing *NEGR1* (Fig. S3).

Discussion

In the present study, we showed that *MYEOV* and *NEGR1* are candidate gene targets of 11q13 gain and 1p31 deletion, respectively, in a neuroblastoma subset. To our knowledge, this is the first report to describe aberrations of *MYEOV* and *NEGR1* in neuroblastoma.

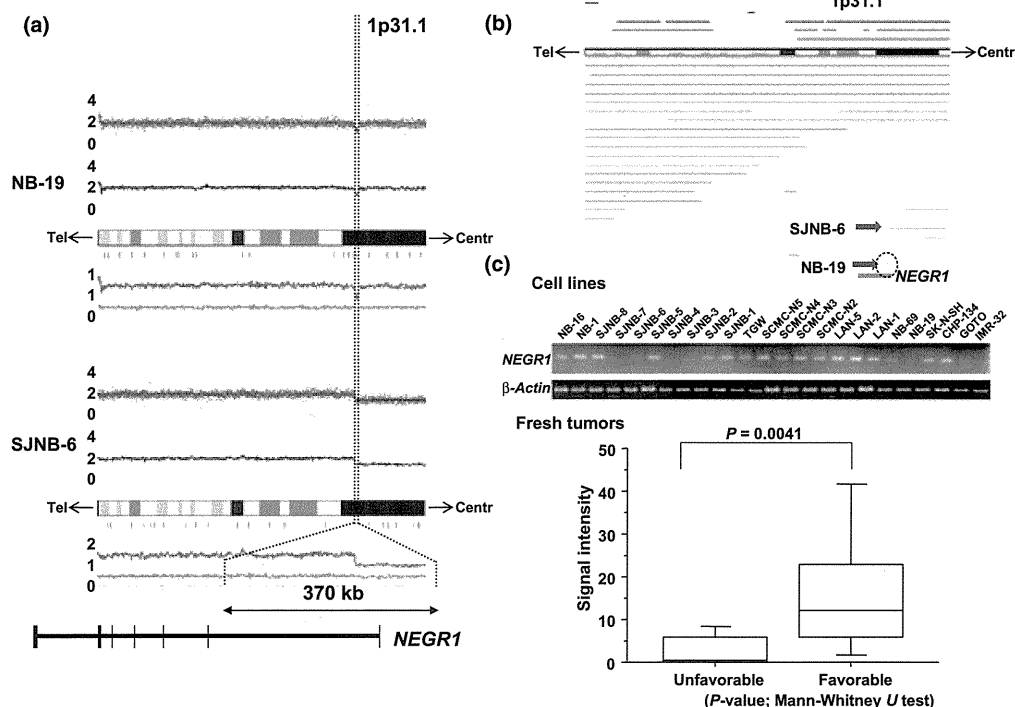


Fig. 2. *NEGR1* as a candidate tumor suppressor gene in neuroblastoma. (a) Deletion mapping of 1p31.1 disclosed a homozygous deletion spanning a 370-kb region in the NB-19 cell line, which contains part of *NEGR1* as the only structural gene. The *NEGR1* gene is also disrupted in intron 1 by the breakpoint of a segmental duplication at 1p31.1 in another neuroblastoma cell line (SJNB-6). For each panel, total copy numbers (tCN; red dots), moving averages of tCN for five consecutive single nucleotide polymorphisms (SNP; blue line), an ideogram of the relevant chromosome, the location of heterozygous SNP calls (green bars), and allele-specific copy numbers (AsCN) averaged for five consecutive SNP (red and green lines for larger and smaller alleles, respectively) are plotted. Note that the CN are expressed in terms of "observed" signal ratios between tumor and reference samples, where the baseline is adjusted to 2 for tCN plots and to 1 for AsCN. (b) Summary of CN abnormalities of 1p31.1 in neuroblastoma. Red bars, gains ($3 < CN < 5$); green bars, losses ($CN = 1$); light green bar (circled), homozygous deletion ($CN = 0$). A homozygous deletion detected in NB-19 and a chromosomal rearrangement detected in SJNB-6 are indicated by the red arrows. The location of *NEGR1* is shown by the blue line. (c) *NEGR1* expression in neuroblastoma. Top panel: representative result of *NEGR1* expression in neuroblastoma cell lines showing frequently reduced expression levels in a subset of neuroblastoma cell lines. Bottom graph: expression of the *NEGR1* gene as measured by quantitative PCR was significantly lower in tumors with an unfavorable outcome ($P = 0.0041$, Mann-Whitney *U*-test). tel, telomere; centr, centromere.

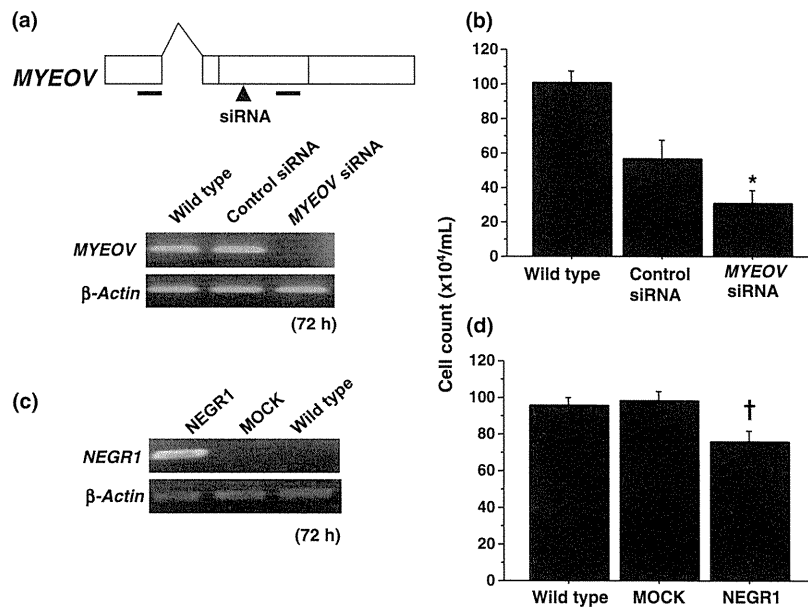


Fig. 3. Effect of *MYEOV* inhibition by siRNA on cell growth and effect of *NEGR1* on cell growth in neuroblastoma cells. (a) Confirmation of siRNA-mediated gene knockdown using semi-quantitative RT-PCR analysis. Following siRNA treatment, *MYEOV* mRNA was absent in treated cells; however, abundant *MYEOV* expression was detected in wild-type and control cells. (b) Effect of *MYEOV* inhibition by siRNA transfected into NB-19 cells on cell growth. Cell growth was impaired cell growth in siRNA-transfected cells compared with that of control cells (* $P = 0.0027$, Kruskal-Wallis test). (c) Analysis (RT-PCR) of NB-19 cells transfected with the pME18S vector. Mock-transfected and wild-type cells were used as controls. (d) The growth of cells transiently expressing *NEGR1* was impaired compared with that of mock-transfected and wild-type cells ($\dagger P = 0.019$, Kruskal-Wallis test).

Initially, *MYEOV* was reported as a gene that was possibly co-overexpressed with *CCND1* in some cases of multiple myeloma with t(11;14)(q13;q32); later, it was shown to be co-amplified and co-overexpressed with *CCND1* in a subset of esophageal squamous cell carcinomas, breast cancers, gastric cancers, and colorectal cancers.^(7,17-19) Although the major genetic targets of these rearrangements and amplifications have been shown to be *CCND1*, in some breast cancer cases the 11q13 amplicon exclusively contained *MYEOV* and not *CCND1*, suggesting a *CCND1*-independent oncogenic role for *MYEOV*.⁽⁷⁾ The oncogenic role of *MYEOV* has also been investigated in functional studies, showing that *in vitro* siRNA-mediated knockdown of *MYEOV* resulted in inhibition of proliferation, invasion, and migration of colorectal cancer cell lines.⁽¹⁹⁾ In our neuroblastoma cases, *MYEOV* was overexpressed in approximately 30% of primary neuroblastoma cases, with seven cases showing gain/amplification of *MYEOV*. We also confirmed that *MYEOV* was the only gene found in the common gain/amplicon at 11q13 and that proliferation of neuroblastoma cell lines was inhibited by siRNA-mediated *MYEOV* knockdown, supporting an oncogenic role for *MYEOV* in some neuroblastoma cases. Although several studies have revealed that *MYEOV* amplification is associated with poor prognosis in multiple myeloma, esophageal squamous cell carcinoma, and breast cancer,^(7,18,20) the clinical impact of *MYEOV* gain/amplification or overexpression in neuroblastoma is unclear and requires further evaluation.

The *NEGR1* gene is a single gene found in one of the recurrent deletions at 1p31. Although the *NEGR1* locus is known as one of the most common CNV regions,⁽²¹⁾ we also identified a neuroblastoma cell line in which *NEGR1* was disrupted in by gene rearrangement, supporting the fact that *NEGR1* is one of the target genes in neuroblastoma. In ovarian cancer, *NEGR1* is a putative tumor suppressor gene encoding one of the IgLON cell adhesion family members, namely OPCML, and it plays a central role in the establishment and remodeling of the central nervous system.⁽²²⁾ Notably, OPCML has been shown to exhibit functional characteristics of a tumor suppressor gene in epithe-

lial ovarian cancer.⁽²³⁾ In our analysis, expression of *NEGR1* was substantially reduced in 43% of advanced-stage tumors without 1p31 deletions/rearrangement. In addition, re-expression of *NEGR1* in the NB-19 cell line with homozygous deletion of *NEGR1*, as well as in other neuroblastoma cell lines that did not express *NEGR1*, resulted in the inhibition of cell growth, suggesting that *NEGR1* is a candidate tumor suppressor gene in neuroblastoma and may have possible prognostic value. Although expression of OPCML in ovarian cancers is suppressed or reduced mainly through epigenetic mechanisms,⁽²³⁾ tumor-specific methylation was not detected in neuroblastoma cells in the present study. The mechanisms for the absence of *NEGR1* in the tumors without homozygous deletion, mutation, and methylation were not clear in the present study. We cannot rule out the possibility that mutations are harbored in the promoter region of *NEGR1* with consequent gene inactivation. Furthermore, *NEGR1* was often heterozygously deleted, but not mutated or methylated, in neuroblastoma; most deletions occur in tumors at advanced stages, suggesting that *NEGR1* has haploinsufficient effects on advanced disease in neuroblastoma.

In conclusion, the results of the present study suggest that *MYEOV* at 11q13 and *NEGR1* at 1p31 are functional gene targets in a subset of neuroblastoma. Further studies on both genes will expand these pathways and provide insights into the progression of neuroblastoma, as well as possibly enabling the development of novel therapeutics based on targeting *MYEOV* and *NEGR1* in neuroblastoma.

Acknowledgments

The authors thank Mrs Matsumura M, Mrs Hoshino N, Mrs Yin Y and Mrs Saito F for their excellent technical assistance. The authors also express their appreciation to Drs A.T. Look (Harvard Medical University, Boston, MA, USA) and Dr. A. Inoue (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA), for their generous gifts of neuroblastoma cell lines. This work was supported by Research on Measures for Intractable Diseases, Health, and Labor Sciences Research Grants; the

Ministry of Health, Labor and Welfare via a grant for Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation; by the Japan Health Sciences Foundation; and by the Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest.

References

- 1 Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 203–16.
- 2 Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; **224**: 1121–4.
- 3 Chen Y, Takita J, Choi YL *et al*. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 2008; **455**: 971–4.
- 4 Mosse YP, Laudenslager M, Longo L *et al*. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008; **455**: 930–5.
- 5 Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L *et al*. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008; **455**: 967–70.
- 6 George RE, Sanda T, Hanna M *et al*. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008; **455**: 975–8.
- 7 Janssen JW, Cuny M, Orsetti B *et al*. MYEOV: a candidate gene for DNA amplification events occurring centromeric to CCND1 in breast cancer. *Int J Cancer* 2001; **102**: 608–14.
- 8 Ntougkos E, Rush R, Scott D *et al*. The IgLON family in epithelial ovarian cancer: expression profiles and clinicopathologic correlates. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 5764–8.
- 9 Brecht M, Steenvoorden AC, Luf S, Bartram CR, Janssen JW. Rearrangement and expression of myeov and hst in NIH/3T3 transfectants: a caveat for the interpretation of DNA transfection analyses. *Oncol Rep* 2007; **17**: 1127–31.
- 10 Smith EI, Haase GM, Seeger RC, Brodeur GM. A surgical perspective on the current staging in neuroblastoma: the International Neuroblastoma Staging System proposal. *J Pediatr Surg* 1989; **24**: 386–90.
- 11 Takita J, Hayashi Y, Nakajima T *et al*. The p16 (CDKN2A) gene is involved in the growth of neuroblastoma cells and its expression is associated with prognosis of neuroblastoma patients. *Oncogene* 1998; **17**: 3137–43.
- 12 Inoue HK, Shirao T. Neurite formation induced in neuroblastoma cells and genetically altered non-neuronal cells. *J Electron Microscop* 1997; **46**: 497–502.
- 13 Takita J, Ishii M, Tsutsumi S *et al*. Gene expression profiling and identification of novel prognostic marker genes in neuroblastoma. *Genes Chromosom Cancer* 2004; **40**: 120–32.
- 14 Donohoe TJ, Sintim HO, Sisangia L *et al*. Utility of the ammonia-free Birch reduction of electron-deficient pyrroles: total synthesis of the 20s proteasome inhibitor, clasto-lactacystin beta-lactone. *Chemistry* 2005; **11**: 4227–38.
- 15 Takita J, Yang HW, Chen YY *et al*. Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma. *Oncogene* 2001; **20**: 4424–32.
- 16 Moss AC, Lawlor G, Murray D *et al*. ETV4 and Myeov knockdown impairs colon cancer cell line proliferation and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **345**: 216–21.
- 17 Janssen JW, Vaandrager JW, Heuser T *et al*. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 2000; **95**: 2691–8.
- 18 Carneiro A, Isinger A, Karlsson A *et al*. Prognostic impact of array-based genomic profiles in esophageal squamous cell cancer. *BMC Cancer* 2008; **8**: 98.
- 19 Lawlor G, Doran PP, MacMathuna P, Murray DW. MYEOV (myeloma overexpressed gene) drives colon cancer cell migration and is regulated by PGE₂. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; **29**: 81.
- 20 Moreaux J, Hose D, Bonnefond A *et al*. MYEOV is a prognostic factor in multiple myeloma. *Exp Hematol* 2010; **38**: 1189–98.
- 21 Jarick I, Vogel CI, Scherag S *et al*. Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 840–52.
- 22 Funatsu N, Miyata S, Kumanogoh H *et al*. Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol-anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *J Biol Chem* 1999; **274**: 8224–30.
- 23 Sellar GC, Watt KP, Rabisz GJ *et al*. OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nat Genet* 2003; **34**: 337–43.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. *NEGR1* expression in 30 neuroblastoma cases.

Fig. S2. Effect of siRNA inhibition of *MYEOV* on cell growth in CHP-134 and PF-SK-1 cells.

Fig. S3. Effect of *NEGR1* on cell growth in the neuroblastoma cell lines PF-SK-1 and SJNB-7.

Table S1. Primer sequences used in the present study.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

特集II 好酸球性炎症の臨床

消化管における好酸球性炎症*

山田 佳之**
嶋田 秀光**

Key Words : eosinophil, eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID), eosinophilic esophagitis (EoE), eosinophilic gastroenteritis (EGE), eosinophilic colitis (EC)

はじめに

好酸球性消化管疾患 (eosinophilic gastrointestinal disorders; EGID) が近年、欧米を中心に増加している。特に好酸球性食道炎 (eosinophilic esophagitis; EoE) が欧米では多く、臨床的、基礎的研究がここ10年あまりで急速に進んだ¹⁾。そのことにより消化管での好酸球の役割、炎症形成のメカニズムなどについてさまざまなことが明らかになってきている。一方、本邦ではEoEは疾患そのものがあまり認知されていないこともあり、特に小児での患者数が少ない。また、EGIDの概念から病態を考え、診療が行われるケースも少ないと思われる。EoE患者数の欧米との違いは疾患の認知の問題だけでないことも推測され、欧米との差異が人種差や食生活、文化の違いに起因するのかなど興味深い。EGIDの主たる原因はアレルギー反応といわれていること、本邦で消化管アレルギーが増加していることから、EoEの増加があるか否かは不確定であるが、本邦でも多くのEGID患者は存在すると考えられる。本稿では、消化管の生理的好酸球、消化管好酸球性炎症のメカニズムとEGIDの臨床像、本邦での

実態について概説したい。

消化管と生理的好酸球

1980年代以降、好酸球はアレルギー性炎症の主要な炎症細胞として注目を集めてきたが、また一方で、生理的な状態での好酸球の存在が確認されている²⁾。消化管では一般に食道を除き生理的好酸球の存在が知られている。過去に生理的好酸球についての詳細な検討の報告がある³⁾。この報告では、好酸球が存在する臓器として脾臓、リンパ節、胸腺があり、さらに骨髓と胃腸では好酸球とその脱顆粒を認めていた(表1)。この報告でも食道に好酸球はほとんど存在していなかった。さらに、マウスでは胸腺、乳腺、子宮、そして消化管での生理的好酸球の存在が報告されている²⁾(表1)。これらの臓器では臓器特異的な好酸球の役割がいられている。消化管好酸球は粘膜固有層に存在しており、内因性細菌叢非依存的に胎生期にはすでに腸管にホーミングしているとされている⁴⁾。消化管好酸球の役割は古典的には寄生虫免疫であるが、好酸球のT細胞を中心としたリンパ球の制御、組織発生の段階での影響も推測されている⁵⁾。さらに、最近では好酸球からのミトコンドリアDNAが細菌に付着することによる抗細菌作用が*in vitro*あるいは腸管の細菌感染モデルで報告されている⁶⁾。消化管好酸球の自然免疫への関与と考えられ非

* Gastrointestinal eosinophilic inflammations.

** Yoshiyuki YAMADA, M.D., Ph.D. & Hidemitsu SHIMADA, B.S.: 群馬県立小児医療センターアレルギー感染免疫科[☎377-8577 群馬県渋川市北橘町下箱田779]; Division of Allergy and Immunology, Gunma Children's Medical Center, Shibukawa, Gunma 377-8577, JAPAN

表1 生理的好酸球と消化管を中心とした組織好酸球増多

生理的好酸球が存在する臓器
造血臓器(骨髄, 脾臓)
リンパ節
胸腺
乳腺
子宮
消化管(食道を除く)

(文献^{2,3})より引用改変)

	文献 ¹⁰ から引用改変	文献 ⁹ から引用改変**	EGIDの基準文献 ¹¹⁻¹³ から引用改変
食道	>0*		>15(EoE)
胃	>10	>10	>30(EG)
十二指腸	>10	>15	
小腸		>25	
上行結腸	>20	>40	
横行結腸		>25	
下行結腸	>10		
S字結腸	>10		
直腸	>10	>25	>6(EC)#

*生理的に存在しない。 **最高値を示した患者の値より大きい場合を好酸球増多とした。 #>60個/10HPFあるいは陰窩や筋層に浸潤している場合。

常に興味深い。さらには、消化管においても好酸球が抗腫瘍効果⁷⁾、抗ウイルス作用⁸⁾をも発揮している可能性が考えられる。しかし一方で、臨床的にはEGIDの診断、治療を考える場合に、特にこの生理的好酸球の扱いが問題となる。

消化管の組織好酸球増多

食道での組織好酸球増多は、最近では好酸球数>15/HPFが一般的に受け入れられている。しかしながら、それより下部の消化管ではいまだ一定の好酸球増多の基準はない⁵⁾。消化管全体としての好酸球の分布は胃から上行結腸までは下降するにつれて増加する傾向にあり⁹⁾、その後、肛門に向かうにつれて低下していく傾向にある。これまでの報告からの基準⁹⁾¹⁰⁾を表1に示した。比較的新しいDeBrosseらの報告⁹⁾では非EGIDの消化管症状を認めた小児患者で検討している。平均組織好酸球数の最高値を示した患者の値より大きい場合を好酸球増多として示した。またEoE¹¹⁾、好酸球性胃炎(eosinophilic gastritis ;

表2 平均年間患者数の欧米との比較

		EoE	EGE, EC	EoE/EGE + EC比率
米国	小児	20.2	8.9	2.27
	成人	10.7	5.9	1.81
日本	小児	2*	—	
	成人	7.2	29.8	0.24

(文献¹⁷⁻¹⁹)より引用改変と自験データ, *2011年11月時点)

EG)¹²⁾、好酸球性腸炎(eosinophilic colitis ; EC)の診断基準¹³⁾として推奨されている組織好酸球数も示した。しかしながら、組織好酸球数は必ずしも重症度を反映しているわけではないと考えられる¹⁴⁾。著しい組織好酸球増多を示した場合を除いては臨床経過、内視鏡所見やその他の炎症所見を加味して判断をすることが重要と考えている。

EGID

EGIDはアレルギーが主とされる一次性と二次性にわかれる。重要な二次性のEGIDとして好酸球増多症候群(HES)に伴うものがある。また、EGIDはIgE型と非IgE型の両方の性質を持つとされている。EoE, EG・好酸球性胃腸炎(EG/eosinophilic gastroenteritis ; EG/EGE), ECに分けられる¹⁵⁾。確立された基準はないが、診断には生検が必須である。生検により好酸球性炎症を確認する⁵⁾。また、末梢血好酸球増多が高度な例や全身状態不良例ではHESの検索が重要である。欧米では1990年代中頃と比較して、年間患者数は10倍以上とEoEが急増している(約1,900人に一人)¹¹⁾¹⁶⁾。それに対して本邦成人の検討ではEGEの報告の方が多い¹⁷⁾。本邦成人でのEoEは7.2人/年¹⁷⁾(約6,000人に一人¹⁸⁾)と欧米が10.7人/年¹⁹⁾であるのに比べるとやや少ない程度であるが、欧米ではより多くの患者が存在する小児に関しては、われわれの調査で過去5年間に二次性のEoEと思われる症例を含めても、10例あまりが確認できたのみである(表2)。また、EGE, ECに関して、小児では食物アレルギー患者の増加からEGID患者の増加が想定されるが、基準がさだまっておらず、診断に生検が必要なこと、アレルギー疾患としての診断がついた場合には生検はしないことから、実態の解明は必ずしも容易ではない。EoEを中心に、

表 3 好酸球性食道炎診断のためのポイント

1. 小児では年齢により症状が異なる	
2. アレルギー疾患の合併	
3. 疾患の家族歴	
4. GERD様症状, 嚥下困難に加え, 摂食機能障害も認めやすい.	
5. 高用量PPI(2 mg/kg/day)に反応不良(症状+好酸球数)	
6. 食道pHモニタリング正常	
7. 特有の内視鏡所見	
(1)縦走溝 (furrows)	
(2)輪状溝 (rings)	
(3)白斑 (white plaques)	
(4)白濁肥厚粘膜 (pallor)	
8. 食道粘膜上皮内好酸球>15/HPF	

(文献^{11,21)}から引用改変)

EGE, ECの各論を概説する.

1. EoE

EoEは本来, 好酸球の存在しない食道粘膜での好酸球性炎症である. 炎症により食道狭窄, 機能不全をきたす. 患者の増加に伴い調査, 研究が進み, 2007年に米国を中心にガイドラインが示された²⁰⁾. さらに, 2011年に改訂された. EoEに関する報告論文数も現在では約1,100あまりとなっている.

(1) 病態

Rothenbergらが発現アレインなどの解析をもとに, 発症・増悪のメカニズムを説明している¹⁾. 食物あるいは吸入抗原により食道上皮が損傷され, thymic stromal lymphopoietin (TSLP)の食道粘膜上皮からの産生が起こり, そのTSLPが樹状細胞に作用し, 樹状細胞からの刺激によりTh2細胞からIL-13産生がなされ, IL-13が食道粘膜上皮に作用することによりeotaxin-3が産生され, 好酸球が食道局所に集積し, 炎症を形成する. 肥満細胞の関与も確認されている. 集積した好酸球と肥満細胞からのTGF- β がIL-13とともに線維芽細胞に作用し, periostinの産生を促し, 線維化亢進に作用している. また, filaggrinの発現低下やIL-13の過剰発現が炎症の増悪に作用している可能性も考えられている.

(2) 症状

成人では食道の狭窄から生じる症状が中心であるが, 小児では年齢によって主要症状が異なる. 乳幼児では哺乳障害, 幼児から学童では嘔吐, 学童から10代前半では腹痛, 嚥下障害, さ

らに10代から若年成人では嚥下障害に加え食物圧入が主要症状とされている¹⁵⁾.

(3) 診断

生検による食道好酸球増多の確認が重要である. 臨床症状から疑い, 内視鏡検査, 生検をすすめる. 食思不振, 早期満腹感, 嚥下困難などの症状, 内視鏡所見での縦走溝, 白斑, 蒼白粗造粘膜が病理所見との相関が強いといわれている²¹⁾. また, 最近の報告でEoEを中心としたEGID患者の多くが摂食機能障害を認めているといわれており興味深い²²⁾. 最も重要な鑑別疾患は胃食道逆流症であり, アトピー素因の存在, 食道罹患部位, 食道組織好酸球数, pHモニタリングなどが鑑別に重要である. 欧米の新しいガイドラインではプロトンポンプ阻害剤(PPI)に反応して改善する食道好酸球増多とEoEとの鑑別が推奨されているが, PPI反応性食道好酸球増多をEoEと分けて考えるか否かはもう少し検討が必要と思われる. 診断のポイントを表3に示した¹¹⁾¹⁵⁾.

(4) 治療(表4)

多種抗原による食物アレルギーが主体と考えられていることから治療の基本は抗原除去である. 非IgE型のアレルギーの要素が強いのので除去食品の選択は時に困難である. 表4に示す参考検査所見に加え, 抗原リンパ球刺激試験も有用となる可能性があり²³⁾, 乳以外の抗原に対する検査の確立が望まれる. 抗原数が多い場合や原因抗原が予測できない場合は, 6種抗原除去が推奨されているが, 奏効しない場合には成分栄養も使用される. また, 局所ステロイドの治療効果

表 4 好酸球性食道炎の治療

-
1. プロトンポンプ阻害剤(PPI)
 - ・ GERDを含むPPI反応性食道好酸球増多の除外に有用
 - 単独ではEoEは完全には改善しない
 2. 食事療法
 - ・ 問診(既往), プリックテスト, アトピーパッチテスト, RASTに基づいて除去
 - ・ 主要抗原除去(ミルク, 大豆, 卵, 小麦, ナッツ類, 魚貝類, 甲殻類)
 - 65~75%に効果はあるが, 除去が多いと困難
 - ・ 成分栄養
 3. 局所ステロイド
 - ・ フルチカゾン吸入あるいはブデソニドビスカスを嚥下する
 - 効果は食事療法と同等であるが中止できない
 4. 全身ステロイド
 - 重症の嚥下障害, 体重減少などで入院患者が中心
 5. その他
 - ロイコトリエン受容体拮抗薬, 食道拡張術, 抗IL-5抗体療法
-

(文献⁵⁾¹¹⁾から引用改変)

は除去食と同等ともいわれている。除去食の継続が困難な場合に特に有効である¹¹⁾。

2. EGE

消化器症状が存在する患者において好酸球増多をきたす他疾患の除外の上で、消化管の1か所以上で生検での好酸球浸潤が証明されるか、あるいは末梢血好酸球増多と特徴的なX線所見がみられるものとしてEGEが定義されている²⁴⁾。また、食道好酸球浸潤を伴っている症例も多いといわれている。3型に分類される²⁵⁾。粘膜浸潤型はEGEの中では最多であり、食物アレルギーの関連が強い。嘔吐、下痢、吸収不全をきたし、低蛋白血症や鉄欠乏性貧血を起こす。筋層浸潤型は腸壁の肥厚があり閉塞症状をきたす。漿膜浸潤型は腹水を伴うことが特徴といわれている。多くの場合はこれらの3型が混在している。IgE型のアレルギー反応の関与も比較的強い。末梢血好酸球増多は報告により異なるがおおむね80%以上と高率である。そのためHESとの鑑別を要することも多い。治療には抗原の除去もあるが、副腎皮質ステロイド剤の全身投与を必要とすることも多い。局所ステロイドとして腸管で作用するようにデザインされたブデソニド製剤も使用されることがある。

3. EC

ECは乳児期発症群と年長発症群に大別される。年長発症のタイプはEGEに近い病態と考えられている。一方で、生後6か月頃までに発症する乳児型はアレルギー性腸炎、食物蛋白誘導性直腸結腸炎として扱われていることも多い⁵⁾¹³⁾。Nomuraらの報告²⁶⁾では急速に増加している新生児・乳児消化管アレルギーが症状により4つのクラスターに分類されている²⁶⁾。いずれのクラスターにおいても末梢血好酸球比率が高値であるなど、病態には好酸球が大きく関与しているといわれており、この中に多くのEC患者が存在すると考えられる。ECは乳児の血便の原因としては最多で、原因抗原はミルクが多く、大豆やその他が続く。症状が血便のみの場合は全身状態良好例が多い。便中の好酸球の証明や末梢血好酸球増多が参考所見になる。内視鏡所見では紅斑やリンパ濾胞過形成(増殖)を示す¹⁴⁾。病理所見が診断に重要である(表1)¹³⁾。

おわりに

生理的な好酸球の存在に加え、本稿では述べていない消化管好酸球性炎症での重要な因子としては腸内細菌叢やH. pyloriとの関係などがあげられる。今後の検討が待たれる部分である。本

邦でのEGID研究は実態把握の後は、欧米との比較が重要になると考えている。特に欧米と比べ好酸球性炎症が食道に限局しない症例が多いのか否かの解明が望まれる。

謝辞：本稿で紹介した検討の一部は、平成22～23年度厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)による助成を受けて行った。

文 献

- 1) Sherrill JD, Rothenberg ME. Genetic dissection of eosinophilic esophagitis provides insight into disease pathogenesis and treatment strategies. *J Allergy Clin Immunol* 2011 ; 128 : 23.
- 2) Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006 ; 24 : 147.
- 3) Kato M, Kephart GM, Talley NJ, et al. Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue. *Anat Rec* 1998 ; 252 : 418.
- 4) Mishra A, Hogan SP, Lee JJ, Foster PS, Rothenberg ME. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest* 1999 ; 103 : 1719.
- 5) Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol* 2004 ; 113 : 11.
- 6) Yousefi S, Gold JA, Andina N, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 2008 ; 14 : 949.
- 7) Legrand F, Driss V, Delbeke M, et al. Human eosinophils exert TNF-alpha and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. *J Immunol* 2010 ; 185 : 7443.
- 8) Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol* 2001 ; 70 : 691.
- 9) DeBrosse CW, Case JW, Putnam PE, et al. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatr Dev Pathol* 2006 ; 9 : 210.
- 10) Liacouras CA. Eosinophilic gastrointestinal disorders. *Practical Gastroenterology* 2007 ; XXXI : 53.
- 11) Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, et al. Eosinophilic esophagitis : updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol* 2011 ; 128 : 3.
- 12) Lwin T, Melton SD, Genta RM. Eosinophilic gastritis : histopathological characterization and quantification of the normal gastric eosinophil content. *Mod Pathol* 2011 ; 24 : 556.
- 13) Xanthakos SA, Schwimmer JB, Melin-Aldana H, et al. Prevalence and outcome of allergic colitis in healthy infants with rectal bleeding : a prospective cohort study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005 ; 41 : 16.
- 14) Yamada Y, Nishi A, Ebara Y, et al. Eosinophilic gastrointestinal disorders in infants : a Japanese case series. *Int Arch Allergy Immunol* 2011 ; 155 Suppl 1 : 40.
- 15) 山田佳之. 好酸球性胃腸炎—好酸球性消化管疾患 (eosinophilic gastrointestinal disorders ; EGID) について. 注目される好酸球関連疾患. *臨床免疫・アレルギー科* 2010 ; 54 : 459.
- 16) Spergel JM, Brown-Whitehorn TF, Beausoleil JL, et al. 14 years of eosinophilic esophagitis : clinical features and prognosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009 ; 48 : 30.
- 17) 好酸球性食道炎/好酸球性胃腸炎の疾患概念確立と治療指針作成のための臨床研究班. 好酸球性食道炎/好酸球性胃腸炎の疾患概念確立と治療指針作成のための臨床研究, 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)総括研究報告書. Available from : URL : <http://ee.shimane-u-internal2.jp/22.html>.
- 18) Fujishiro H, Amano Y, Kushiya Y, et al. Eosinophilic esophagitis investigated by upper gastrointestinal endoscopy in Japanese patients. *J Gastroenterol* 2011 ; 46 : 1142.
- 19) Spergel JM, Book WM, Mays E, et al. Variation in prevalence, diagnostic criteria, and initial management options for eosinophilic gastrointestinal diseases in the United States. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011 ; 52 : 300.
- 20) Furuta GT, Liacouras CA, Collins MH, et al. Eosi-

- nophilic esophagitis in children and adults : a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2007 ; 133 : 1342.
- 21) Aceves SS, Newbury RO, Dohil MA, et al. A symptom scoring tool for identifying pediatric patients with eosinophilic esophagitis and correlating symptoms with inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009 ; 103 : 401.
- 22) Mukkada VA, Haas A, Maune NC, et al. Feeding dysfunction in children with eosinophilic gastrointestinal diseases. *Pediatrics* 2010 ; 126 : e672.
- 23) Kimura M, Oh S, Narabayashi S, Taguchi T. Usefulness of lymphocyte stimulation test for the diagnosis of intestinal cow's milk allergy in infants. *Int Arch Allergy Immunol* 2011 ; 157 : 58.
- 24) Talley NJ, Shorter RG, Phillips SF, Zinsmeister AR. Eosinophilic gastroenteritis : a clinicopathological study of patients with disease of the mucosa, muscle layer, and subserosal tissues. *Gut* 1990 ; 31 : 54.
- 25) Kelly KJ. Eosinophilic gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 ; 30 Suppl : S28.
- 26) Nomura I, Morita H, Hosokawa S, et al. Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 2011 ; 127 : 685.

* * *

トピックス 1 好酸球増多症候群に見られる遺伝子異常と分子標的治療薬

群馬県立小児医療センターアレルギー感染免疫科

山田 佳之

Key words: chronic eosinophilic leukemia (CEL) — *FIP1L1* (*Fip1-like 1*)/*PDGFRA* (*platelet derived growth factor receptor alpha*) fusion gene — hypereosinophilic syndromes (HES)

はじめに

末梢血において慢性的に好酸球数が 1500/ μ l 以上、とくに 5000/ μ l を超えるような異常に高度な好酸球増多を認めた場合には好酸球増多症候群 (hypereosinophilic syndrome, HES) を念頭に置いた鑑別が必要となる。HES はまた、多臓器障害を起こすことから、免疫アレルギー科、血液内科だけでなく多くの診療科が携わる疾患である。診断においては 1975 年の Chusid らの基準¹⁾が古くから用いられている。根本的な概念は現在においても受け入れられるものであるが、分子レベルでの解析が進むにつれ新しい分類が提案されている。2001 年の WHO の分類²⁾では HES から chronic eosinophilic leukemia (CEL) を区別し、その後、2003 年に *FIP1-like-1* (*FIP1L1*)-*platelet derived growth factor receptor alpha* (*PDGFRA*) (*F-P*) 融合遺伝子が発見され³⁾、骨髄増殖性 (myeloproliferative

variant of hypereosinophilic syndrome, M-HES) 患者にて高頻度に本変異が認められたこと、*PDGFR α* のチロシンキナーゼドメインを標的として imatinib が著効したことから、HES を含めた好酸球が関連する骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms, MPN) の分子レベルでの分類の重要性はさらに高まり、2008 年の改訂 WHO 分類⁴⁾では新たに好酸球やその他の *PDGFRA*, *platelet derived growth factor receptor beta* (*PDGFRB*) や *fibroblast growth factor receptor 1* (*FGFR1*) 異常を伴う骨髄球系腫瘍という項目が付け加えられた。この分類では従来の HES (広義の HES) は HES (狭義), CEL-not otherwise specified (NOS), T 細胞性リンパ腫、好酸球やその他の *PDGFA*, *PDGFRB* や *FGFR1* 異常を伴う骨髄球系腫瘍に分かれる。また分子異常が不明でクローン性増殖が証明されず、一次性の骨髄増殖性疾患による好酸球増多が強く疑われる場合に狭義

利益相反 (conflict of interest) に関する開示：著者は本論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

GENETIC MUTATIONS AND MOLECULARLY-TARGETED DRUGS IN HYPEREOSINOPHILIC SYNDROMES

Yoshiyuki Yamada

Division of Allergy and Immunology, Gunma Children's Medical Center

Abbreviations: AML “acute myeloid leukemia”, CHIC2 “the cysteine rich hydrophobic domain 2”, CML “chronic myeloid leukemia”, CEL “chronic eosinophilic leukemia”, CMV “cytomegalovirus”, *F-P* “*FIP1L1-PDGFR α* ”, *FGFR1* “fibroblast growth factor receptor 1”, *FIP1L1* “*FIP1-Like-1*”, HES “hypereosinophilic syndromes, IL-5Tg “IL-5 transgenic”, JM “juxtamembrane”, L-HES “lymphocytic hypereosinophilic syndromes”, M-HES “myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome”, MPN “myeloproliferative neoplasms”, NOS “not otherwise specified”, *PDGFRA* “*platelet derived growth factor receptor alpha*”, *PDGFRB* “*platelet derived growth factor receptor beta*”, SCF “stem cell factor”, SCLL “stem cell leukemia/lymphoma syndrome”, SM “systemic mastocytosis”, TKI “tyrosine kinase inhibitor”

山田佳之：群馬県立小児医療センターアレルギー感染免疫科〔〒377-8577 群馬県渋川市北橘町下箱田 779〕

E-mail: yamaday@gcmc.pref.gunma.jp

表1 PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 変異と疾患

PDGFRA		PDGFRB		FGFR1	
STRN (2q22)	CEL	TPM3 (1q21)	CEL	LRRF1P1 (2q37)	SCLL
FIP1L1 (4q12)	CEL with SM	PDE4DIP (1q23)	MDS/UMP with Eos, AML	FOP (6q27)	SCLL
CDK5RAP2 (9q33)	CEL	SPTBN1 (2p21)	UMP with Ba	TIF1 (7q34)	SCLL
KIF5B (10p11)	CEL	PRKG2 (4q21)	UMP, UMP with Ba	CEP110 (9q33)	SCLL
ETV6 (12p13)	CEL	HIP1 (7q11)	CMML with Eos	FGFR1OP2-FGFR1 (12p11)*	SCLL
BCR (22q11)	CML-like MPN, T-lymphoma (blast crisis)	H4 (10q22)	UMP	CPSF6 (12q15)	SCLL
		GPIA1 (11p13)	CEL with SM	ZNF198 (13q12)	SCLL
		ETV6 (12p13)	CMML with Eos	MYO18A (17q11)	SCLL
		ERC1 (12q13)	AML	HERV-K (19q13)	SCLL
		SART3 (12q23)	UMP with Eos	BCR (22q11)	CML-like MPN
		GIT2 (12q24)	UMP with Eos		
		NIN (14q24)	UMP with Eos		
		CEV14 (14q32)	AML with Eos		
		KIAA1509 (14q32)	CMML with Eos		
		TP53BP1 (15q22)	UMP with Eos		
		NDE1 (16p13)	CMML		
		MYO-18A (17p11)	UMP with Eos		
		HCMOGT-1 (17p11)	JMML with Eos		
		RABAPTIN-5 (17p13)	CMML		
		COL1A1 (17q21)	dermatofibrosar- coma protuberans		

CEL, chronic eosinophilic leukemia ; SM, systemic mastocytosis ; CML, chronic myeloid leukemia ; MPN, myeloproliferative neoplasms ; MDS, myelodysplastic syndromes ; UMPN, unclassified-MPN ; Eos, eosinophilia ; Ba, Basophilia ; AML, Acute myeloid leukemia ; CMML, chronic myelomonocytic leukemia ; JMML, Juvenile myelomonocytic leukemia ; SCLL, stem cell leukemia/lymphoma.

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://atlasgeneticsoncology.org/>).

(文献6から引用改変)

の HES と診断される。広義の HES に関連する分子標的療法は二つに大別される。一つはチロシンキナーゼ阻害剤であり、もう一つは関連分子を標的とした抗 IL-5 抗体、抗 CD52 抗体などのヒト型抗体療法である⁵⁾。そこで本稿では *FIP1L1-PDGFR A (F-P)* 融合遺伝子陽性骨髄増殖性疾患を中心にチロシンキナーゼ活性をもつ PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 関連疾患、骨髄増殖性 HES, リンパ性 HES, CEL における分子異常と分子標的療

法について概説したい。

好酸球増多を伴う PDGFRA, PDGFRB や FGFR1 変異に関連した骨髄球系腫瘍

1) PDGFRA 関連 MPN

FIP1L1-PDGFR A 融合遺伝子陽性骨髄増殖性疾患がほとんどではあるがその他の PDGFRA 関連変異も報告されている (表1)⁶⁾。

(1) *FIP1L1-PDGFR α* 融合遺伝子の発見

慢性骨髄性白血病(CML)に ABL, c-kit, PDGFR のチロシンキナーゼを標的とする阻害薬 (TKI), imatinib mesylate が有効であることが確認されていた 2001 年, CML と HES の治療や病態での類似性 (例えば IFN- α を治療に使うことなど) から imatinib が HES にも効果を示す可能性を考え, 従来の治療が奏功しなかった HES 患者への imatinib 投与がはじめて行われた⁷⁾. その患者に imatinib は著効し, 速やかに寛解したことが報告された. その後, 2-3 年の間にいくつかのグループにより HES 患者への imatinib 投与が行われ, 40-80% と高い寛解率を示し注目を集めた⁸⁾⁹⁾. しかしながらその作用機序は不明なままであった. 2003 年になり 2 つのグループがほぼ同時に別々のアプローチによりその原因を明らかにした. Griffin らは imatinib により好酸球性細胞株 EoL-1 の増殖が抑制されることから C-末端が PDGFR α 鎖から N-末端に機能が未知の遺伝子から由来する 110kDa の新しいリン酸化融合タンパク, rearranged in hypereosinophilia (Rhe)-PDGFR α を発見した¹⁰⁾. また Cools らは imatinib が奏功した t(1;4)(q44;q12) 染色体転座をもつ患者をみつけ, imatinib の標的である c-kit や PDGF 受容体 α 鎖の遺伝子が 4 番染色体長腕 12 の領域には存在していることから *PDGFRA* 遺伝子とそれまで未知であった遺伝子 *FIP1-like 1 (FIP1L1)* の融合遺伝子 (*F-P* 融合遺伝子) を HES 患者群の中に見つけるにいたった³⁾. 結果として *F-P* 融合遺伝子と *Rhe-PDGFR α* 融合遺伝子は同一のものであった. *F-P* 融合遺伝子は 4 番染色体 12q の領域の 800 Kbp にわたる領域の欠失により生じる. 臨床的に *F-P* 融合遺伝子の存在の同定には FISH 法と RT-PCR 法が主として用いられる. 融合遺伝子の形成に伴う染色体の欠損部分に the cysteine rich hydrophobic domain 2 (CHIC2) 領域が含まれていることから FISH 法によりその欠失が同定出来る¹¹⁾. また RT-PCR 法により *F-P* 融合遺伝子の発現を確認する場合は陽性患者でも *F-P* 融合遺伝子の発現量は低いことが多く, Nested PCR や定量的 PCR が正確な診断には有用である¹²⁾.

(2) *FIP1L1-PDGFR α* 融合遺伝子による CEL 誘導のメカニズム

PDGFRA 遺伝子からの配列にチロシンキナーゼドメインが含まれていることにより *F-P* 融合タンパクはチロシンキナーゼ活性を示す. *F-P* 融合タンパクの恒常的活性化のメカニズムについても解析がなされている. 一般的に受容体チロシンキナーゼの自己活性化の調節には juxtamembrane (JM) ドメインが重要であり, 2 つのトリプトファン保存残基が JM ドメインによる抑制作用に必要とされているが, *F-P* 融合タンパクにおいては, ほとんどの患者の *PDGFRA* 遺伝子側のブレイクポイントは JM ドメインを含むエクソン 12 にあることからわかるように, *PDGFR α* の JM ドメインの 2 つのトリプトファン保存残基配列の間に切断が起こったために抑制作用が不十分であり恒常的活性化がおこっているとされている¹³⁾. また BCR-ABL と同様に Imatinib に耐性を示す *F-P* 陽性患者が報告されている³⁾. *FIP1L1-PDGFR α* の *PDGFR α* 由来の ATP 結合ドメインの T674I 変異である. これは imatinib 耐性 BCR-ABL 陽性 CML 患者の ABL 領域での T315I 変異に相当する. imatinib の効果の点からもわかるように CML の原因遺伝子として古くから研究されている BCR-ABL 融合遺伝子との類似性がある. この類似性と相違点が *F-P* 融合遺伝子関連病態の解明には重要と考えられる.

2003 年に Cools らはマウス骨髄造血幹細胞/前駆細胞にレトロウイルスベクターを用いて *F-P* 融合遺伝子を導入し, 致死量放射線照射マウスに *F-P*⁺ 骨髄造血幹細胞/前駆細胞を移植し, *F-P* 導入により CEL が発症するかどうかを検証した. レシピエントマウスは BCR/ABL 誘導性 MPN に類似した MPN を発症したが好酸球増多は軽度であった¹⁴⁾. このことから CEL 発症には別の補助的因子の存在が必要と考えられた. IL-5 の HES での重要性はよく知られており, 筆者らは IL-5 トランスジェニック (IL-5Tg) マウスをドナーに用いて IL-5 を高発現させることで *F-P* 融合遺伝子導入骨髄移植 HES/CEL 様疾患モデルの樹立に成功した¹⁵⁾. さらに IL-5 高発現と *F-P* 融合遺伝子の組み

表2 HES/CELにおける *FIP1L1-PDGFR*A 陽性患者 (これまでの主な報告)

発表年	検討疾患	% (F/P+/total)	国	参考文献
2003	HES/CEL	56 (9/16)	US, EU	Cools et al.
2003	HES	56 (5/9)	US	Klion et al.
2003	SM + Eos	60 (3/5)	US	Pardanani et al.
2004	M-HES	100 (7/7)	US	Klion et al.
2004	HES/CEL	47 (8/17)	Belgium	Vandenberghe et al.
2004	HES	67 (2/3)	US	Smith et al.
2005	HES	17 (6/35)	France	Roche-Lestienne et al.
2005	HES, un-Eos	38 (10/26)	Italy	La Starza et al.
2006	un-Eos	10 (4/40)	Germany	Bacher et al.
2006	HES/CEL	25 (2/8)	Poland	Helbig et al.
2006	HES, un-Eos	11 (31/270)	UK	Score et al.
2006	HES	4 (32/830)	US	Pardanani et al.
2007	HES	57 (4/7)	Tunisia	Menif et al.
2007	HES	20 (2/10)	Japan	Miyazawa et al.
2007	HES	14 (27/196)	Italy	Baccarani et al.
2007	HES/CEL	13 (3/24)	Japan	Sada et al.
2009	HES	14 (6/42)	Poland	Helbig et al.
2009	HES	26 (6/23)	Italy	Intermesoli et al.
2010	HES	21 (16/77)	Poland	Helbig et al.
2010	HES	11 (18/161)	US, EU	Ogbogu et al.

HES, hypereosinophilic syndromes ; CEL, chronic eosinophilic leukemia ; SM+Eos, systemic mastocytosis with eosinophilia ; M-HES, myeloproliferative variant of HES ; un-Eos, unclassified hypereosinophilia ; US, United States of America ; EU, european countries

(文献 12 から引用改変, 追加)

合わせがマウス HES/CEL 様疾患発症に特異的かどうかについて検討している。IL-5Tg マウスをドナーとして *p210-BCR-ABL* 融合遺伝子を導入したが、IL-5 高発現と *BCR-ABL* 融合遺伝子との組み合わせでは *F-P* 融合遺伝子の組み合わせとは違い、高濃度の IL-5 存在下でも HES/CEL ではなくむしろ CML 様 MPN を呈した。また興味深いことに *F-P* 融合遺伝子が特異的に IL-5 受容体 α 鎖の発現を増強させたのに対して *p210-BCR-ABL* 融合遺伝子では IL-5 受容体 α 鎖の発現増強は認められなかった¹⁵⁾。 *F-P* 融合遺伝子のみでは HES を誘導するには至らないものの、 *F-P* 融合遺伝子は一次的に好酸球増多に関与していると考えている。また *F-P* 融合遺伝子は好酸球だけでなく、好中球や単球、また骨髄 CD34 陽性細胞やリンパ球系でも発現が認められる¹¹⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ ことから *F-P* 融合は

比較的、未成熟な血球、つまり造血幹細胞や前駆細胞でおこっている可能性が唆されている。

(3) *FIP1L1-PDGFR*A 融合遺伝子陽性患者の臨床像

最初の報告では M-HES 症例の実に 16 例中 9 例 (56%) が *F-P* 陽性であることが報告され注目された³⁾。現在では当初 HES と診断された患者の 4-17% 程度と考えられている¹⁸⁾。これまでの主な報告を表 2 に示した¹²⁾¹⁸⁾⁻²⁵⁾。 *F-P* は現時点では CEL, 肥満細胞症, T 細胞性リンパ腫, AML の原因遺伝子とされている²⁶⁾²⁷⁾。 *F-P-CEL* から最終的に AML を発症することや CML のように急性転化を起こすことが報告されている²⁸⁾。さらに *F-P* 遺伝子陽性症例に特徴的な臨床像としては CEL と全身性肥満細胞症の高率な合併がある¹¹⁾²⁶⁾ (後述)。これまでの報告を総合し臨床的に本症を疑う

表3 HES患者での *FIP1L1-PDGFR*A 融合遺伝子陽性を疑う所見

男性
脾腫
貧血, 血小板減少
異型好酸球
血清ビタミン B12 の上昇 (>1000pg/ml)
血清トリプターゼの上昇 (>12ng/ml)
骨髄細胞充実度 (>80%)
骨髄線維化と紡錘形肥満細胞 (25% 以上)
CD25 あるいは CD2 陽性骨髄肥満細胞の増加
imatinib が著効する (診断的治療)

(文献 29 から引用改変)

所見を表3に示した²⁹⁾。また興味深いことに最近の報告では F-P を除いた HES 全体では男女比は 11:8 であり, これまで HES が男性に有意に発症するとされていた事実は F-P 融合遺伝子陽性患者に由来するのかもしれない¹⁸⁾。

(4) *FIP1L1-PDGFR*A 融合遺伝子と全身性肥満細胞症

多くの F-P 融合遺伝子陽性患者では血中トリプターゼの上昇, 紡錘形の CD25 発現骨髄異常肥満細胞を認め, 全身性肥満細胞症 (systemic mastocytosis, SM) と診断されている²⁶⁾。一方で SM での末梢血好酸球増多は 15-28% 程度の症例で認められている³⁰⁾。典型的な SM は *KIT* 遺伝子の D816V 変異が原因であるが, F-P 融合遺伝子陽性 SM とは臨床的にも区別可能である。F-P 融合遺伝子陽性 SM では血中トリプターゼの値が比較的低値で, ビタミン B12 は高値, 骨髄の肥満細胞の凝集が弱く, 心肺合併症が多いとされている³⁰⁾。F-P 融合遺伝子導入 HES/CEL マウスモデルにおいても患者同様に肥満細胞症が認められた³¹⁾。IL-5 を高発現していない場合においても F-P 導入のみで SM を認めており, F-P の SM への直接的な作用が認められた。しかしながら IL-5 高発現では SM はさらに高度となることから SM においても F-P と IL-5 の相乗作用が想定された。さらに肥満細胞の分化, 増殖に重要な stem cell factor (SCF)/c-kit シグナルを阻害したところマウスでの F-P 融合遺伝子陽性 SM は抑制されることから F-P

と SCF の相乗効果が F-P 融合遺伝子陽性 SM の発症に必要であり, IL-5 はその増悪に関与すると考えられた³¹⁾。

(5) *FIP1L1-PDGFR*A 融合遺伝子陽性骨髄増殖性疾患の治療

F-P 陽性と判明すれば第一選択は imatinib となる。imatinib に対する感受性は BCR-ABL の 50-100 倍とも言われており, 100mg/日でも寛解導入できるとされている²⁹⁾³²⁾³³⁾。糖質コルチコイドやヒドロキシ尿素, IFN- α に不応性を示した症例でも比較的早期に血液学的な寛解導入がなされ, 症状も改善するとされている。しかしながら減量や中止にともない再発する可能性があり, 維持療法が必要である³⁴⁾。100mg/日の投与で比較的安全に維持療法が行えるとされている。上述の T674I 変異を認めた場合は imatinib に耐性を示す。その場合には新種の TKI の使用が考慮される。nilotinib (AMN107) は通常の F-P には imatinib と同様に効果があり, T674I 変異に対する効果が F-P 導入 Ba/F3 の検討で報告されている³⁵⁾。臨床的には第 2 相試験が行われ, HES 全体での検討で寛解例を含め効果を示す例があったとしている³⁶⁾。sorafenib は腎細胞がん承認され使用されている TKI であり³⁷⁾, VEGFR, KIT, PDGFR を標的としている。EoL-1, F-P-Ba/F3 で sorafenib の F-P に対する抑制作用が確認されており, T674I 変異に対しても抑制効果を示した³⁸⁾。しかしながら T674I 変異を持つ CEL の急性転化症例において sorafenib は効果を示したがすぐに imatinib, dasatinib, PKC412 にも耐性の D842V 変異となった³⁹⁾。さらに S601P 変異も imatinib および sorafenib は耐性と報告されている⁴⁰⁾。PKC412 は FLT3 遺伝子変異をもつ AML での臨床第 2 層試験なども行われている TKI である⁴¹⁾。F-P に対しては in vitro, また F-P 導入骨髄移植マウスモデルで有効性が示されており, T674I 変異に対しても有効である。しかしながらマウスモデルの検討では imatinib 耐性のない野生型の F-P に対しては imatinib よりも効果が弱いことが確認されている¹⁴⁾。dasatinib に関しては EoL-1 において効果が確認されている⁴²⁾。