

小児がんの分子病理所見に基づく悪性度の判定とその治療への応用

研究分担者 中澤 温子 (独)国立成育医療研究センター 病理診断部 部長

研究要旨： 神経芽腫の新規予後分類として提唱されたゲノム分類は、INPC 病理組織分類、組織像との相関が認められた。部分的に染色体増幅・喪失を見る群 (Partial chromosomal gain/loss; P)はUH群が多く、神経芽腫の典型的な組織像を示すものが少なく、大型核を有する多形性の目立つ腫瘍細胞が特徴的と考えられた。また染色体全体にわたる増幅・喪失のある群 (Whole chromosomal gain/loss; W)では、FH群が多く、典型的な神経芽腫の組織像を示すものが多くみられた。MYCN 増幅例では、ゲノム分類にかかわらず、神経線維の乏しい、未分化な腫瘍細胞が密に増殖し、核分裂・核崩壊像が目立つという特徴的な組織像を示した。神経芽腫では、従来、MYCN 増幅が非常に強力な予後因子とされ、MYCN 増幅のない症例について、さらなる予後因子の抽出、それによる治療の層別化が望まれている。本研究により、ゲノム分類は MYCN 増幅のない症例において、独立した予後因子となり、病理組織像もゲノム分類別に異なることが示唆された。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

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

chromosomal gain/loss; P)、3) 染色体全体にわたる増幅・喪失のある群 (Whole chromosomal gain/loss; W)に分けた。さらに 1p loss, 11q loss, 17q gain および MYCN 遺伝子増幅の有無から、表のような亜群に分類した (Oncogene 2008, 24(4):441-9)。

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

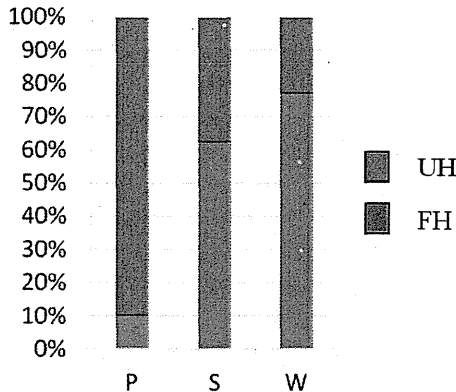
アレイ CGH によりゲノム分類がなされている 314 例の神経芽腫群腫瘍のうち INPC による組織学的評価が可能であった神経芽腫 (neuroblastoma; NB) 92 例を対象とし、病理組織学的に詳細な検討を行った。サンプリングエラーを避けるため、Stroma-Rich/Dominant tumor (ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma, intermixed subtype), multiple clone からなる NB は対象外とした。対象症例の年齢、予後、ゲノム分類と INPC との関連について検討し、統計学的解析を加えた。

(倫理面への配慮)

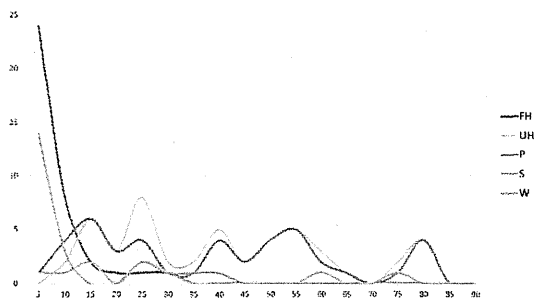
本研究で行った臨床検体を用いた実験は、関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

C. 研究結果

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



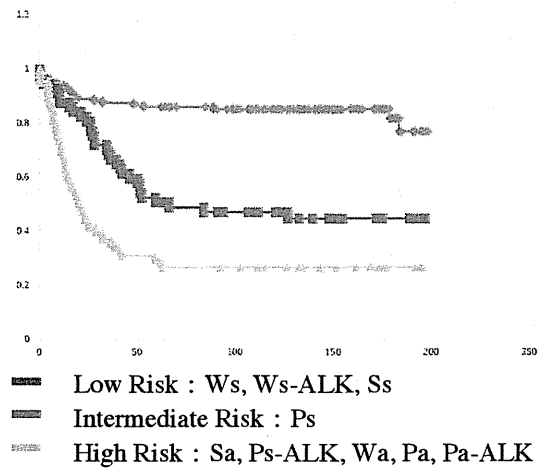
平均発症月例は、P 群 48 ヶ月、S 群 21 ヶ月、W 群 9 ヶ月で、P 群と W 群との間で有意差を認めた。発症月齢について、UH、FH、P 群、W 群、S 群についてグラフに表すと、P 群は UH と、W 群は FH とほぼ一致した形状のカーブを描いた。



ゲノム解析をされた 314 例のうち、MYCN 遺

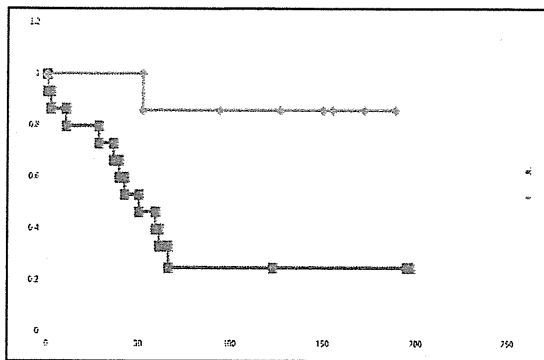
伝子の検索が行われた症例は 311 例で、増幅例は 73 例 (23%)、非増幅例は 238 例 (77%) であった。これは従来言われている神経芽細胞腫群における MYCN 増幅群の比率とほぼ同率であった。生存率についてもこれまでの報告と同様で、MYCN 増幅群 27.7%、MYCN 非増幅群 66.5%と MYCN 増幅群で有意に低下していた。

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



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

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



病理組織像についての検討では、*MYCN* 増幅例 (29 例) は、1 例を除き 28 例全て UH で、P 群が 26 例 (89.6%) を占め、ゲノム分類にかかわらず、神経線維の乏しい、未分化な腫瘍細胞が密に増殖し、核分裂・核崩壊像が目立つという特徴的な組織像を示した。*MYCN* 非増幅例 (63 例; Ss 群 9 例、Ps 群 21 例、Ws 群 33 例) について各ゲノム群別に組織像を検討した。Ps 群 (21 例) では、弱拡大でも識別できる、クロマチン濃染性の大型核を有する多形性の目立つ腫瘍細胞が 15 例 (71%) に認められたが、Ws 群では 9 例 (27%) のみであった ($P < 0.001$)。Ws 群のその他 24 例と Ss 群では、神経細線維を豊富に有する小円形細胞からなる、時にロゼット形成がみられる典型的な神経芽腫の組織像が認められた。Ws 群では神経節細胞への分化傾向をしめす多核の大型細胞が認められ、Ps 群で見られる大型核を有する多形性の目立つ腫瘍細胞との鑑別が弱拡大では困難であった。

D. 考察

神経芽腫を含めて、小児がんの治療成績は近年向上し、多剤併用化学療法、放射線治療、さらに造血幹細胞移植を組み合わせることで、その生存率は平均 70% に達している。それぞれの腫瘍の生物学的特徴に基づいた治療の層別化という治療戦略は、治療成績の向上だけでなく、治療合併症の軽減という意味でも重要である。神経芽腫においては、年齢、臨床病期、*MYCN* 増幅、INPC 国際病理分類により、治療の層別化が行われている。INPC 分類は、FH と UH の 2 つの予後グループを区別し、FH は自然退縮や分化・成熟を示し、*MYCN* 増幅のない群である。一方 UH には *MYCN* 増幅腫瘍と *MYCN* 増幅のない腫瘍が含まれており、UH で *MYCN* 増幅のない群についてのさらなる予後因子の解析が今後の課題である。本研究では、ゲノム分類と

INPC 分類との関連を明らかにすることができた。すなわち、W 群と FH は年齢分布が一致し、1.5 歳未満に多く、*MYCN* 増幅のみられない予後良好群であった。最も予後の悪い群は、Sa, Ps-ALK, Wa, Pa, Pa-ALK といった *MYCN* 増幅群でゲノム分類 3 群すべてが含まれていた。さらに *MYCN* 増幅がない Ps 群で ALK 変異のあるもの (Ps-ALK) もこの中に包括された。ゲノム分類に関係なく *MYCN* 遺伝子増幅が強力な予後不良因子であることが判明した。P 群の大部分は UH で、年齢分布も UH と同様の予後不良群と考えられた。さらに *MYCN* 増幅のない Ps 群は、P4s 群とそれ以外の P2s, P3s, P5s の 2 つの予後グループに分けることができ、1p loss and/or 11q loss を持つ群がより予後が不良であった。この群は、組織学的に pleomorphism が目立ち、これがゲノム異常の病理学的指標となるかどうか、症例を増やしてさらに検討中である。

E. 結論

ゲノム分類と予後予測因子である INPC 分類、*MYCN* 増幅との間には相関が認められた。*MYCN* 増幅のない UH 群腫瘍において、ゲノム分類における P2s, P3s といった予後不良群が抽出され、1p loss, 11q loss が予後予測因子となり、更なる治療層別化に役立つ可能性が示された。本研究により、ゲノム分類は *MYCN* 増幅のない症例において、独立した予後因子となり、病理組織像もゲノム分類別に異なることが示唆された。

研究協力者：岡松千都子

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oschlies I, Lisfeld J, Lamant L, Nakazawa A, D'Amore E, Hansson U, Hebeda K, Simonisch-Klupp I, Malyk J, Muellauer L, Tinguely M, Stuecker M, Ledele MC, Siebert R, Reiter A, Brugieres L, Klapper W, Woessmann W. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma limited to the skin: clinical, histopathological and molecular analysis of 6 pediatric cases- a report from the ALCL99 study. *Haematologica*. 2012 Jul 6. [Epub ahead of print].
- 2) 古賀友紀, 熊谷昌明, 瀧本哲也, 三間屋純一, 中澤温子, 堀部敬三, 小林良二, 鶴沢正仁, 稲田浩子, 森鉄也. 本邦における小児 Hodgkin リンパ腫 157 例の後方視野的検討 - 小児がん研究 4 グループによる調査 -. *臨床血液* 2012; 53: 443-450.
- 3) 岡松千都子, 中澤温子. 神経芽腫群腫瘍. *病理と臨床* 30:1224-1229, 2012.

4) 中澤温子. 小児がんの臨床研究と中央病理診断, リスク分類. 病理と臨床 30:1247-1250, 2012.

5) Iijima K, Yamada H, Miharu M, Imadome KI, Miyagawa Y, Akimoto S, Kobayashi K, Okita H, Nakazawa A, Fujiwara S, Fujimoto J, Kiyokawa N. ZNF385B is characteristically expressed in germinal center B cells and involved in B-cell apoptosis. Eur J Immunol. 2012 Dec;42(12):3405-15.

2. 学会発表

1) Okamatsu C, Nakazawa A, Ohira M, Kamiyo T, Nakagawara A : Correlation between Pathology Classification and Genomic Signature in Neuroblastoma. Advances in Neuroblastoma Research Conference 2012, Toronto, 2012.6.18.

2) 中澤温子, 大喜多肇, 田中祐吉, 中川原章, 滝田順子, 家原知子, 田尻達郎, 池田均, 秦順一. 神経芽腫における ALK 発現と国際神経芽腫病理分類との関連. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21.

3) 辰野美知子, 小野ひろみ, 内田清乃, 岡林舞, 飯島健太, 佐久間武史, 柿島裕樹, 山崎茂樹, 松林守, 松岡健太郎, 奥山虎之, 中澤温子. MLPA 法を用いた神経芽腫組織における遺伝子異常解析の検討. 第 30 回日本染色体遺伝子検査学会総会・学術集会, 2012.11.10.

4) 小林健一郎, 中澤温子. 発生の機能ゲノミクスを活用した神経芽腫の病態解明. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.1.

5) 岡松千都子, 大平美紀, 上條岳彦, 中川原章, 中澤温子. 神経芽腫におけるゲノム分類と組織学的特徴. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30.

6) 岩淵英人, 浜崎豊, 横山繁昭, 岸本宏志, 堀江弘, 中澤温子, 秦順一, 田中祐吉, 井上健, 小林庸次, 中山雅弘, 桑江優子. 新生児期・乳児早期神経芽腫における病理組織学的検討. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30

7) 山崎文登, 中澤温子, 下島直樹, 大隅朋生, 藤村絵里子, 田中丈夫, 淵本康史, 星野健, 中川原章, 黒田達夫, 嶋田博之. 異なるクローンが認められた進行性神経芽腫の 2 例. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30

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、前方視的な検体の収集と分子解析研究を目的とする研究計画を立案して、申請を行なった。Early T-cell precursor ALL/lymphoma について、gene set enrichment analysis (GSEA)により、遺伝子発現プロファイルに基づいて診断するシステムを構築した。

研究協力者

鶴澤正仁* 愛知医科大学医学部
(JPLSG 前運営委員会委員長
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)
林泰秀* 群馬県立小児医療センター
大喜多肇* 国立成育医療研究センター
清河信敬* 国立成育医療研究センター
飯島一智 国立成育医療研究センター
*; 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

B. 研究方法

1. 対象

JPLSG リンパ腫臨床研究に登録されたリンパ腫および成育医療研究センターで診療を受けた白血病/リンパ腫の患児で、解析可能な余剰検体が保存されている症例 (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、JPLSG リンパ腫中央診断施設あるいは成育医療研究センターに保存されている解析可能な余剰検体 (新鮮凍結検体、凍結浮遊細胞検体など) を用いた。

2. 解析

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に開発されたソフト 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および成育医療研究センターで診療を受けた患児の中から、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。また、成育医療研究センターの症例検体についても、実際の解析の担当者には匿名化された番号と、解析に必要な臨床情報のみしか提供されない。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. 前方視的な検体の収集と分子解析研究：リンパ腫登録症例全例を対象として、前方視的に検体を収集し、すでに開始している既存試料に対する研究と同じ内容の分子解析研究を目的とする研究計画を立案して、JPLSG に申請を行なった。現在、研究審査委員会からの意見に対して対応を行なっており、近々、承認される見込みである。

2. Early T-cell precursor ALL/lymphoma の遺伝子発現プロファイルに基づく診断システム構築：Early T-cell precursor (ETP-) ALL/lymphoma は、発現遺伝子プロファイリングによって近年同定された T-lineage ALL の亜群で、特徴的なマーカー蛋白の発現、すなわち CD8 陰性 CD1a 陰性 CD5 陰性～弱陽性かつ幹細胞/骨髄系抗原陽性という特徴によって区別可能であり、極めて予後不良な一群として報告されていることから、本邦の ALL 治療プロトコールのリスク分類の中での位置づけについて早急に決定する必要性が求められている。本研究班でも、本邦における ETP-ALL の実態把握、分子特性および臨床特性に関する検討を行ってきた。ETP-ALL は、細胞マーカー所見二基づく診断基準が報告されているものの、実際の臨床の現場においては、鑑別や確定診断が困難な場合が少なからず経験される。特に、一部の AML では、T 細胞抗原を発現している場合があり、lineage を決定するマーカーである細胞質内 CD3(cyCD3)や myelo-peroxidase (MPO)の発現が弱陽性を示す症例の場合に、ETP か、AML か、あるいは T+Myeloid の混合型白血病なのか診断な場合がある。そこで、遺伝子発現プロファイルに基づく診断法の確立を試みた。

新規 ETP-ALL 症例 1 例と診断に苦慮した結果 T+Myeloid の混合型白血病と診断した 2 例および対象として成育医療研究センターで診療を受けた M0 を含む AML 3 症例について、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ない、昨年度までに本研究で解析を行なった T および ETP-ALL/lymphoma 症例のデータを加えて解析を行なった。clustering 解析では、新規 ETP-ALL 症例と T+Myeloid の混合型白血病 2 例、いずれも他の ETP-ALL と同じクラスターに分類された。AML 症例は ETP-ALL とは別のクラスターに分類された。

昨年度までに解析した T および ETP と、AML 症例を development cohort として T vs ETP, T vs AML を比較する gene set を設定し、gene set enrichment analysis (GSEA)を行なった。この結果、T vs ETP の比較では、新規 ETP-ALL 症例および T+Myeloid の混合型白血病 2 例は、いずれも ETP 様の発現パターンを示した。次に、AML 様か Typical T-ALL 様かを調べたところ、いずれの症例も有意に enrich はされなかったが、ETP-ALL 様の発現パタ

ーンを示した

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、前方視的に、組織的・包括的に推進する端緒が開かれた。昨年度までに行なった既登録症例に関する検討では、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割弱程度であり、得られる情報は限定的なものであることが予想されている。今後、わが国におけるリンパ腫の治療研究を進展させるためには、前方視的、積極的に分子解析用試料を収集していくことが不可欠と考えられ、この研究の成果が期待される。

一方、今回の検討結果から、ETP-ALLに対する遺伝子発現プロファイルに基づく診断法が確立され、細胞マーカー所見のみからは鑑別が困難な症例の確定診断法としての有用性について、今後さらに検討を進める。また、T-ALLやAMLとの比較において、ETP-ALLとT+Myeloidの混合型白血病が遺伝子発現パターンの上では非常に類似した特徴を示すことが明らかとなった。疾患の発生のメカニズムや、治療法選択の上で有用な知見と考えられ、今後さらに検討を進めて行く。

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、前方視的な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、昨年度開始した既登録症例に対する同内容の研究と合わせて、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。また、ETP-ALLに対する遺伝子発現プロファイルに基づく診断法を確立し、今後、診断が困難な症例に対する確定診断法として期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 古賀友紀, 熊谷昌明, 瀧本哲也, 三間屋純一, 中澤温子, 堀部敬三, 小林良二, 鶴沢正仁, 稲田浩子, 森鉄也. 本邦における小児 Hodgkin リンパ腫 157 例の後方視的検討 - 小児がん研究 4 グループによる調査 -. 臨床血液 2012 ; 53 : 443-450.

2. 学会発表

- 1) 三春晶嗣, 清河信敬, 小林健一郎, 大喜多肇, 飯島一智, 森鉄也, 斎藤正博, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 小児

白血病 MRD 検出における 10 カラーフローサイトメトリーの有用性. 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会, 大阪, 6 月 29 日-30 日, 2012.

- 2) 清河信敬, 福島敬, 小林健一郎, 三春晶嗣, 大喜多肇, 飯島一智, 森鉄也, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 小児リンパ芽球性白血病のキメラ遺伝子、細胞マーカーと遺伝子発現プロファイルの特徴. 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会, 大阪, 6 月 29 日-30 日, 2012.

- 3) 飯島一智, 長谷川大輔, 清河信敬, 小林健一郎, 大喜多肇, 三春晶嗣, 森鉄也, 福島敬, 斎藤正博, 康勝好, 花田良二, 土田昌宏, 真部淳, 菊地陽, 藤本純一郎, 林泰秀, 小原明. Gene expression profile related to prognosis of childhood ALL without fusion genes. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 10 月 19 日-21 日, 2012.

- 4) 清河信敬, 松本健治, 飯島一智, 長谷川大輔, 大保木 啓介, 小林健一郎, 大喜多肇, 高田修治, 浅原 弘嗣, 森鉄也, 福島敬, 斎藤正博, 康勝好, 花田良二, 土田昌宏, 真部淳, 菊地陽, 斎藤博久, 藤本純一郎, 林泰秀, 小原明. Fusion gene-specific signature of microRNA expression in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 10 月 19 日-21 日, 2012.

- 5) 飯島一智, 清河信敬, 犬飼岳史, 高橋浩之, 小林健一郎, 大喜多肇, 山田浩之, 森鉄也, 福島敬, 南木融, 斎藤正博, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 杉田完爾, 藤本純一郎, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏, 小原明. Importance of CD5 in the diagnosis of early T cell precursor-type acute lymphoblastic leukemia. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術総集会, 横浜, 11 月 30 日-12 月 2 日, 2012.

- 6) 大隅朋生, 塩田曜子, 清谷知賀子, 飯島一智, 小林健一郎, 大喜多肇, 安田和基, 坂本裕美, 市川仁, 吉田輝彦, 中林一彦, 秦健一郎, 松本健治, 斎藤博久, 森鉄也, 藤本純一郎, 清河信敬. Detection of fusion genes in acute lymphoblastic leukemia by RNAseq using next generation sequencer. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術総集会, 横浜, 11 月 30 日-12 月 2 日, 2012.

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、腎ラブドイド腫瘍のメチル化解析を行い、腎ラブドイド腫瘍で複数の腫瘍抑制遺伝子が高メチル化状態であることを示した。RASSF1A に着目して解析を進めたところ、小児の腎腫瘍である腎芽腫、腎明細胞肉腫、腎ラブドイド腫瘍、間葉芽腎腫では、RASSF1A プロモーターの DNA メチル化率と発現量は逆相関した。腎ラブドイド腫瘍細胞は、5aza-dC 処理により DNA 脱メチル化及び RASSF1A 発現を示し、RASSF1A プロモーターのメチル化により、その発現が抑制され、腫瘍発生に関与することが示唆された。

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期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にし、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

前年度に行った腎明細胞肉腫、腎ラブドイド腫瘍、非腫瘍部腎組織 3 例ずつを用いた Illumina, Infinium DNA メチル化アッセイ (HumanMethylation27 BeadChip) の解析結果を用い、H-InvDB 遺伝子リスト特徴抽出ツールを用いて、Gene Set Enrichment Analysis を行い、腎ラブドイド腫瘍で有意に高メチル化あるいは低メチル化の遺伝子を抽出した。Infinium Assay の結果を確認するために RASSF1A 遺伝子の CpG island のメチル化状態をパイロシークエンス (QIAGEN, Forward primer_5'Biotin label: AGGGAAGGAAGGGTA AGG, Reverse: ACTTCAACCCCTCCCCAA AATC, Sequencing: ATAAAAACCTAAATACA AAAACTAT)にて確認した。パイロシークエンスは、腎芽腫、腎ラブドイド腫瘍、腎明細胞肉腫、先天性間葉芽腎腫、非腫瘍部腎組織を用いて行った。腎ラブドイド腫瘍で高メチル化として抽出された遺伝子は、Affymetrix Gene Expression Array による遺伝子発現解析データと比較し、さらに RASSF1A は、TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)を用いて遺伝子発現量を定量した。腎ラブドイド腫瘍の細胞株 W4 に、0.5 ないし 1.0 μ M の 5aza-dC を添加、細胞回収後、プロモーターのメチル化をパイロシークエンス法で、遺伝子発現量を TaqMan probe を用いた定量 PCR で測定した。

(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

Infinium DNA メチル化アッセイによる網羅的メチル化解析データを用い、腎ラブドイド腫瘍、腎明細胞肉腫、非腫瘍部腎組織の DNA メチル化解析を特に腎ラブドイド腫瘍に着目して行った。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。腎明細胞肉腫や非腫瘍部腎組織と比較すると、腎ラブドイド腫瘍では、0.3~0.7 の中等度の β 値を示すプローブが多い傾向にあった。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、以下の解析を行った。

H-InvDB 遺伝子リスト特徴抽出ツールを用いて、Gene Set Enrichment Analysis を行ったところ、11q13 をはじめとする 5 か所の染色体座や、細胞接着因子ファミリーに高メチル化プローブの出現頻度が有意に高値であった。一方で、1q21.3、21q22.11 の染色体領域やその領域に存在する small proline-rich protein、keratin associated protein が腎ラブドイド腫瘍に特徴的な低メチル化領域と考えられた。また一方で、ALX4 等の既知の癌に関連してメチル化が報告されている遺伝子の高メチル化も見られた。

さらに、腎ラブドイド腫瘍にてきわめて高いメチル化 (β 値、0.6 \times) を示し、非腫瘍部腎組織で低メチル化 (β 値<0.1) を示す 16 遺伝子のプローブを抽出した。このなかで、腎ラブドイド腫瘍で発現が低下している遺伝子は、ACP2、ARHGAP4、C10orf33、KCNE3、RASSF1 の 4 遺伝子であった。これらのメチル化パターンをさらに詳細にみたところ、RASSF1 のプロモーターにある 2 か所の CpG island のうち、より上流の CpG island が高メチル化で、下流の CpG island は低メチル化であった。さらに、RASSF1A プロモーターの CpG island のメチル化を、パイロシークエンス法で確認したところ、腎ラブドイド腫瘍と腎明細胞肉腫は高メチル化、非腫瘍部、先天性間葉芽腎腫は低メチル化、腎芽腫は腫瘍

ごとに様々なメチル化パターンを示した。さらに DNA メチル化と発現の関係を調べるために、定量 PCR 法にて各腫瘍での発現量を検討した。その結果、RASSF1A プロモーターと RASSF1A の発現の間には逆相関関係が認められた。さらに、腎ラブドイド腫瘍細胞に 5Aza-dC 処理したところ、腎ラブドイド腫瘍細胞の CpG island のメチル化が低下し、RASSF1A の発現が上昇した。これらの結果から、RASSF1A はラブドイド腫瘍では、DNA メチル化を受ける腫瘍抑制遺伝子であることが示唆された。

D. 考察

RASSF1A は、肺癌をはじめとする様々な癌でメチル化が報告されており、腫瘍抑制遺伝子と考えられている。また、小児がんにおいても神経芽腫や肝芽腫、腎芽腫、ユーイング肉腫等でメチル化が報告されており、肝芽腫や腎芽腫では、メチル化割合が予後に関連するといわれている。腎ラブドイド腫瘍や腎明細胞肉腫では、本遺伝子による解析は報告されていない。腎ラブドイド腫瘍においても、RASSF1A はメチル化により発現が抑制されており、RASSF1A のプロモーターのメチル化が本腫瘍にも関与していることが示唆された。

腎ラブドイド腫瘍では、SMARCB1/INI1 遺伝子の不活性化が腫瘍発生に深く関与していると考えられている。SMARCB1 は、クロマチン構造変換因子の一要素で、クロマチン構造の変化により転写を促進あるいは抑制すると考えられている。本遺伝子の欠失により、様々な遺伝子のヒストン修飾状態を変化させるとも報告されている。DNA メチル化はヒストン修飾より安定的なエピジェネティックな変化と考えられているが、SMARCB1 の欠失・変異により、DNA メチル化の異常が惹起されているか、また、本腫瘍にみられたメチル化パターンが発生母地となる細胞のパターンを反映しているかどうか等、今後の解析が必要である。既知の腫瘍によるメチル化をうける遺伝子のプロモーターのメチル化が観察されることから、単に発生母地のメチル化パターンを受けついたのみではなく、腎ラブドイド腫瘍においても他の腫瘍と同様に、腫瘍化に関連したメチル化が生じている可能性が考えられる。

E. 結論

腎ラブドイド腫瘍では、複数の腫瘍抑制遺伝子が CpG island の高メチル化を示した。小児の腎腫瘍である腎芽腫、腎明細胞肉腫、腎ラブドイド腫瘍、間葉芽腎腫では、RASSF1A プロモーターの DNA メチル化率と RASSF1A の発現量が逆相関し、腎ラブドイド腫瘍細胞が 5aza-dC 処理により DNA 脱メチル化と RASSF1A 発現を示すなど、RASSF1A プロモーターのメチル化により、RASSF1A の発現が抑制され、腫瘍発生に関与することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato B, Katagiri YU, Iijima K, Yamada H, Ito S, Kawasaki N, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. The human CD10 lacking an N-glycan at Asn(628) is deficient in surface expression and neutral endopeptidase activity. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(11):1715-23.
- 2) Iijima K, Yamada H, Miharuru M, Imadome K, Miyagawa Y, Akimoto S, Kobayashi K, Okita H, Nakazawa A, Fujiwara S, Fujimoto J, Kiyokawa N. ZNF385B is characteristically expressed in germinal center B cells and involved in B-cell apoptosis. *Eur J Immunol*. 2012 42(12):3405-15.

2. 学会発表

- 1) 上野瞳, 大喜多肇, 秋元信吾, 福澤正洋, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. 網羅的 DNA メチル化解析による腎明細胞肉腫(CCSK)の分子マーカー. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 4月26日-28日, 2012.
- 2) 大喜多肇, 秋元信吾, 宮川世志幸, 近森穰, 藤本純一郎, 小林健一郎, 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 EWS/ETS 融合遺伝子の標的遺伝子 DKK1/DKK2 の腫瘍形成における役割. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 4月26日-28日, 2012.
- 3) Fujimoto J, Takimoto T, Okita H, Kobayashi K, Kiyokawa N, Nakagawa A. Central diagnosis and tissue banking system for childhood cancer in Japan The 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP), London, 5-8 October, 2012.
- 4) 大喜多肇. 小児腎腫瘍の病理. 第 101 回日本病理学会総会 (コンパニオンミーティング小児病理研究会), 東京, 4月26日-28日, 2012.
- 5) 春田雅之, 新井康仁, 大喜多肇, 福澤正洋, 金子安比古. WTX 遺伝子異常は Wilms 腫瘍 (腎芽腫) の予後予測因子である. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 9月19日~21日, 2012.
- 6) 上野瞳, 大喜多肇, 藤本純一郎, 秦順一, 小林健一郎, 清河信敬. 小児腎腫瘍における

RASSF1A の DNA メチル化解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 9月19日~21日, 2012

7) 大喜多肇, 中澤温子, 清河信敬. 小児固形腫瘍の病理診断と分子診断. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 11月30日~12月2日, 2012

8) 春田雅之, 越永従道, 大植孝治, 樋之津史郎, 中舘尚也, 大喜多肇, 田中祐吉, 堀江弘, 福澤正洋, 金子安比古. WTX 遺伝子変異は腎芽腫の予後予測因子である. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 11月30日~12月2日, 2012

9) 上野瞳, 大喜多肇, 小林健一郎, 福澤正洋, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. DNA メチル化解析による腎明細胞肉腫(CCSK)の分子マーカー探索. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 11月30日~12月2日, 2012

10) Okita H, Tanaka Y, Horie H, Hata J. Pathology of renal tumors in Japanese children. The 54th Annual Meeting of the Japanese Society of Pediatric Hematology and Oncology, Yokohama, 30 November - 2 December, 2012.

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。今年度は小児の急性骨髄性白血病(AML)のAML99 プロトコールにおける *NUP98-NSD1* 融合遺伝子と *GATA2* 遺伝子を解析し臨床像との関係を明らかにした。*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* と一部の *HOXB family* も陽性の特異な発現パターンを示した。*NUP98-NSD1* 陰性例で同様の発現パターンを示す一群 (*NUP98-NSD1 like signature*) 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る。*GATA2* 遺伝子の解析では、157 例中 7 例 (4.5%) で *GATA2* 遺伝子変異を同定した。また 7 例中 5 例で寛解期の検体が得られ、1 例で胚細胞変異を同定した。現在この家系の検索を行っているところである。予後については 7 例中 1 例のみ原疾患で死亡しているが、他の 6 例は再発なく長期生存中であり、*GATA2* 変異例は予後良好であることが示唆された。

A. 研究目的

小児急性骨髄性白血病 (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、成人の AML では正常核型を中心に次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析により、*DNMT3A*、*TET2* や *IDH1/2* といった遺伝子変異と臨床の関係が次々に明らかにされているが、小児ではこれらの頻度はまれであり、分子生物学的な背景は不明な点が多い。

我々はこれまで小児 AML 共同治療研究会の 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。

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。最近 SNP アレイを用いた高解像度ゲノムワイド解析で、染色体 G バンド法で検出できない *NUP98-NSD1* 融合遺伝子が AML で同定された。

今年度は *NUP98-NSD1* 融合遺伝子を有する AML の発現アレイを解析し、それと類似の発現パターンを有する群をみい出し、臨床像との関係を検討した。

近年、*GATA2* 遺伝子変異が家族性骨髄異形成症候群(MDS)/AML の原因遺伝子として同定された。*GATA2* は血液細胞の発生・分化・増殖に関与し、白血化との関連性が示唆されている。一方、*GATA2* 遺伝子変異は Mono MAC 症候群や Emberger 症候群でも同定され、原因遺伝子として注目されている。今年度は *GATA2* 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

<*NUP98-NSD1* 融合遺伝子とその関連群の解析と臨床像>

今年度は、AML99 研究で治療された AML157 例において RNA を用いて cDNA を作成し、*NUP98* 遺伝子、*NSD1* 遺伝子それぞれに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た後、直接塩基決定法で解析した。また、十分な検体の得られた 124 例については Affymetrix 社の Gene Chip による遺伝子発現解析を併せて行った。

<GATA2 遺伝子変異の解析と臨床像>

今年度は、AML99 研究で治療された AML157 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、Down 症候群 8 例) において、RNA を用いて GATA2 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。(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

<NUP98-NSD1 融合遺伝子の解析>

NUP98-NSD1 融合遺伝子の検討では、AML 157 例のうち6例 (3.8%) に NUP98-NSD1 を認め、さらに遺伝子発現解析で、NUP98-NSD1 を認めた 6 症例に酷似した遺伝子発現パターン(NUP98-NSD1 like signature)を示した 18 例を同定した (図 1)。NUP98-NSD1 を同定した 6 例全例が染色体 G-banding では同定不可能であった。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、染色体分析では 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 例にみられた。

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。NUP98-NSD1 を認めた 6 例および NUP98-NSD1 like signature を示した 18 例は (図 2)、ともに高率に FLT3-ITD と WT1 変異を伴っており、NUP98-NSD1 の有無

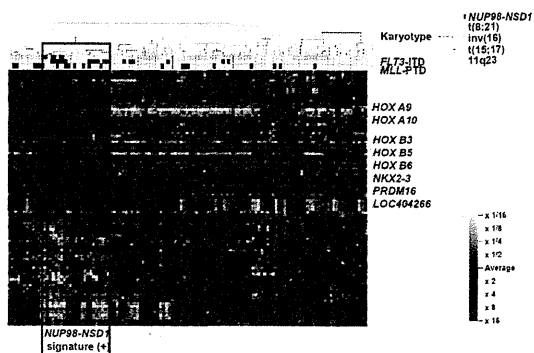


図 1 NUP98-NSD1 融合遺伝子の発現アレイ解析およびそれと酷似した発現パターンを示した群 (Nup98-NSD1 signature(+))のアレイ図。にかかわらず、有意に予後不良であった。この 24 例中、16 例は中間リスク群に層別化されており、t(6;11)/MLL-AF10、t(7;11)/NUP98-HOXA9、t(6;9)/DEK-NUP214 等のキメラ融合遺伝子がみられた。

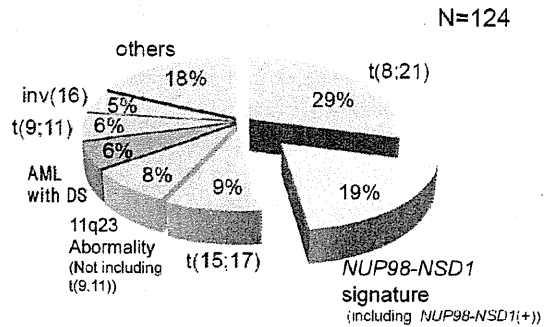


図 2 小児 AML における染色体異常および NUP98-NSD1(+) signature

<GATA2 遺伝子の解析>

157 例中 7 例 (4.5%) で GATA2 遺伝子変異を同定した (M0 ; 1 例、M1; 2 例、M3 ; 2 例、M4 ; 2 例)。変異部位はいずれも MDS/AML や Mono MAC 症候群で高頻度に変異が認められる zinc finger domain 内であった。7 例中 5 例で寛解期の検体が得られ解析を行い、1 例で胚細胞変異を同定した。7 例中 1 例のみ原疾患で死亡 [FAB-M4, 11q23(+)] しているが、他の 6 例は再発なしに長期生存中である。

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。

今回の検討では、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 NUP98-NSD1 陰性例で同様の発現パターンを示す一群(NUP98-NSD1 like)予後不良であった。今後、NUP98-NSD1 陽性例と NUP98-NSD1 like 症例についてリスク層別化の再検討および治療戦略の再考が必要であると考えられた。

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。今後 *NUP98-NSD1* like 例の RNA-sequencing を含む詳細な検討を行う。また AML-05 症例でも検討を行い、その臨床像的意義を明らかにする予定である。

GATA2 遺伝子の解析では、157 例中 7 例 (4.5%) で *GATA2* 遺伝子変異を同定した。また 7 例中 5 例で寛解期の検体が得られ、解析を行い、1 例で胚細胞変異を同定した。現在家系の詳細な検索を行っているところである。予後については 7 例中 1 例のみ原疾患で死亡しているが、他の 6 例は再発なく長期生存中であり、*GAA2* 変異例は予後良好であることが示唆された。

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

- 1) Gruber TA, Larson Gedman A, Zhang J, Koss CS, Marada S, Ta HQ, Chen SC, Su X, Ogden SK, Dang J, Wu G, Gupta V, Andersson AK, Pounds S, Shi L, Easton J, Barbato MI, Mulder HL, Manne J, Wang J, Rusch M, Ranade S, Ganti R, Parker M, Ma J, Radtke I, Ding L, Cazzaniga G, Biondi A, Komblau SM, Ravandi F, Kantarjian H, Nimer SD, Döhner K, Döhner H, Ley TJ, Ballerini P, Shurtleff S, Tomizawa D, Adachi S, Hayashi Y, Tawa A, Shih LY, Liang DC, Rubnitz JE, Pui CH, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR. An *Inv(16)(p13.3q24.3)*-Encoded *CBFA2T3-GLIS2* Fusion Protein Defines an Aggressive Subtype of Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 22 : 683-697, 2012
- 2) Shimada A, Taki T, Koga D, Tabuchi K, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Adachi S, Kojima S, Hayashi Y. High *WT1* mRNA expression after induction chemotherapy and *FLT3-ITD* have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol*. 96 : 469-476, 2012
- 3) Doi S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic *NRAS* mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 120 : 1485-1488, 2012
- 4) 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* 119 : 2612-2614, 2012

5) 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* 156 : 413-414, 2012

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* 156 : 672-674, 2012

7) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 26 : 1879-1898, 2012

8) 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* 119 : 2608-2611, 2012

9) Kawashima N, Shimada A, Taketani T, Hayashi Y, Yoshida N, Matsumoto K, Takahashi Y, Kojima S, Kato K. Childhood acute myeloid leukemia with bone marrow eosinophilia caused by *t(16;21)(q24;q22)*. *Int J Hematol*. 95 : 577-580, 2012

10) Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park MJ, Sotomatsu M, Tabuchi K, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. *RAS* mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 95 : 509-515, 2012

11) 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*. 31 : 4667-4676, 2012

2. 学会発表

- 1) 滝田順子, 西村 力, 大久保純, 吉田健一, 星野諭子, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 先端ゲノムスクリーニングを用いた難治性小児固形腫瘍における標的分子の探索. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 2) 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 大久保純, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いた神経芽腫のエクソーム解析. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 3) 大久保純, 滝田順子, 西村 力, 星野諭子, 吉田健一, 白石友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いた Ewing 肉腫のエクソーム解析. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡,

2012.4.21

4) 柴 徳生, 市川 仁, 滝 智彦, 朴 明子, 嶋田 明, 田淵 健, 荒川浩一, 足立壮一, 堀部敬三, 林 泰秀. 発現アレイを用いた小児急性骨髄性白血病における、NUP98-NSD1 融合遺伝子の解析. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21

5) 大木健太郎, 大喜多肇, 清河信敬, 朴 明子, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地陽, 小原 明, 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、JAK 遺伝子解析. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21

6) 大木健太郎, 奥野はるな, 柴 徳生, 金澤崇, 朴 明子, 外松 学, 神谷尚宏, 小川千登世, 林 泰秀. 第 2 再発時に初めて MLL-AF4 陽性となった B 前駆型急性リンパ性白血病 1 例におけるクローン構造の検討. 第 8 回来た関東小児がんセミナー, 高崎, 2012.5.19

7) 朴 明子, 林 泰秀. TAM に合併する肝機能障害について. 第 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会, さいたま, 2012.7.8

8) 土岐文彰, 山本英輝, 西 明, 鈴木則夫, 平戸純子, 畠山信逸, 新井 心, 大木健太郎, 朴 明子, 外松 学, 林 泰秀. 治療に難渋し救命し得なかった乳児進行神経芽腫の 1 例. 第 23 回群馬小児がん研究会, 前橋, 2012.8.24

9) 三谷幸代, 城 青衣, 嶋田 明, 柴 徳生, 林 泰秀, 市川 仁. 2 遺伝子の発現に基づく高リスク小児急性骨髄性白血病の同定. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.19

10) 倉田盛人, 後飯塚僚, 北村大介, 滝田順子, 林 泰秀, 北川正伸, 中村卓郎. BLNK 欠損 preB-ALL と B 細胞分化における C/Ebpb の働き. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20

11) 星野諭子, 西村 力, 奥野友介, 樋渡光輝, 永田安伸, 吉田健一, 真田 昌, 白石友一, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫におけるエピジェネティック関連遺伝子の網羅的ゲノム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20

12) 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 田中洋子, 永田安伸, 滝田順子, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 真田 昌, 宮野 悟, 小川誠司, 林 泰秀. 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21

13) 関 正史, 西村 力, 奥野友介, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 吉田健一, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーによる再発肺芽腫のエクソーム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21

14) 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 千葉健一, 田中洋子, 佐藤悠佑, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. SNP アレイをエクソーム解析を用いた横紋筋肉腫の初発・再発/転移巣のクローン比較. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21

15) 樋渡光輝, 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 大久保淳, 永田安伸, 五十嵐隆, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いたユーイング肉腫発生の分子生物学的検討. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21

16) Kiyokawa N, Matsumoto K, Iijima K, Hasegawa D, Oboki K, Kobayashi K, Okita H, Takada S, Asahara H, Mori T, Fukushima T, Saito M, Koh K, Hanada R, Tsuchida M, Manage A, Kikuchi A, Saito H, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Fusion gene-specific signature of microRNA expression in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19

17) Iijima K, Hasegawa D, Kiyokawa N, Kobayashi K, Okita H, Miهارu M, Mori, T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Gene expression profile related to prognosis of childhood ALL without fusion genes. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19

18) Park MJ, Oda M, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. IL-7R gene mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19

19) Oki K, Okita H, Kobayashi K, Shiba N, Park MJ, Sotomatsu M, Fukushima T, Koh K, Hanada R, Manabe A, Kikuchi A, Tsuchida M, Ohara A, Kiyokawa N, Hayashi Y. Analysis of CRLF2 and IKZF1, JAK, IL7R genes in pediatric B-precursor ALL treated on TCCSG protocol. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19

20) Shimada A, Olfat I, Xu Y, Goto A, Nagai T, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada Y, Hayashi Y, Ogawa S. JAK2 V617F mutation in pediatric myeloproliferative neoplasm. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20

21) Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraiishi Y, Tanaka H, Chiba K, Nagata Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole exome resequencing reveals novel gene mutations in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20

22) Okuno Y, Shiba N, Shiraiishi Y, Yoshida K, Nagata Y, Sato Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Kanazawa T, Kudo K, Chiba K, Tanaka H, Ito E, Takita J, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Ogawa S. Clonal architecture and evolution of pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20

23) Takahashi H, Koh K, Kato M, Fukushima T, Inukai T, Kiyokawa N, Taki T, Saito M, Kajiwara M,

Ogawa C, Maeda M, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Hanada R, Tsuchida M, Ohara A. Characteristics and prognostic impacts of structural chromosomal abnormalities in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21

24) Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 related gene expression signature is associated with a poor prognosis in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21

25) 大木健太郎, 柴 徳生, 新井 心, 朴 明子, 外松 学, 清河信敬, 林 泰秀. 小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における clonal evolution の解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30

26) 関水匡大, 角南勝介, 中澤温子, 林 泰秀, 沖本由理, 齋藤明子, 堀部敬三, 鶴澤正仁, 森鉄也. 進行期 T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫の染色体異常解析—JPLSG からの報告. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30

27) 関 正史, 西村 力, 星野倫子, 奥野友介, 白石友一, 吉田健一, 千葉健一, 田中陽子, 真田 昌, 加藤啓輔, 土田昌宏, 宮野 悟, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 先端ゲノム解析技術を用いた胸膜肺芽腫における発症分子機構の解明. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30

28) 朴 明子, 大木健太郎, 新井 心, 外松学, 清河信敬, 小田 慈, 堀部敬三, 林 泰秀. MLPA 法を用いた T-ALL 遺伝子異常についての解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30

29) 西 眞範, 磯村直子, 野村優子, 柳井文男, 犬飼岳史, 渡辺 新, 林 泰秀. t(17;19)(q22;p13.3)を含む染色体異常を呈した T 細胞性急性リンパ性白血病の 1 例. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30

30) 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 加藤元博, 大木健太郎, 朴 明子, 金澤 崇, 工藤寿子, 滝田順子, 加藤啓輔, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 花田良二, 真田 昌, 小川誠司, 林泰秀. 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.1

31) 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 市川仁, 足立壮一, 外松 学, 荒川浩一, 田淵 健, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病における GATA2 遺伝子変異同定. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.1

32) 出口隆生, 村松秀城, 林 泰秀, 菊地 陽, 駒田美弘. TAM 芽球における CD117 発現と末梢血中芽球割合の相関. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2

33) 村松秀城, 菊地 陽, 林 泰秀, 川村眞智子, 小島勢二, 矢部みはる, 磯山恵一, 滝 智彦, 辻浩一郎, 土田昌宏, 真田 昌. ダウン症候群い合併した一過性骨髄異常増殖症に対する少量シタラビン療法による腫瘍崩壊症候群. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2

34) 嶋田 明, Ismael Olfa, 徐 銀嶺, 後藤綾, 永井智子, 成田 敦, 坂口大俊, 土居崎小夜子, 村松秀城, 濱 麻人, 高橋義行, 山田佳之, 林 泰秀, 小島勢二. 小児骨髄増殖疾患における JAK2V617F 遺伝子変異. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2

35) 富田 理, 清河信敬, 三春昌嗣, 小林健一郎, 大喜多肇, 長谷川大輔, 嶋田博之, 森 鉄也, 福島 敬, 齋藤正博, 犬飼岳史, 康 勝好, 杉田完爾, 花田良二, 土田昌宏, 真田 昌, 菊地 陽, 藤本純一郎, 林 泰秀, 小原 明. CD66c 陽性小児急性リンパ芽球性白血病の特徴. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2

36) 黒岩 実, 柴田祐充子, 岩崎維和夫, 林泰秀, 鈴木則夫, 小原 明. 悪性胚細胞 (奇形腫群腫瘍) の治療成績と問題点. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2

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 24 年 1 月から 11 月に解析された ALL74 例 (BCP 68 例、T 4 例、分類不能 2 例)、乳児白血病 13 例、不明 3 例の計 90 例を研究の対象とし、その年齢は 1 才未満 14 例、1-9 才 59 例、10-15 才 12 例、16 才以上 12 例であった。ALL は初発が 63 例、再発が 7 例、2 回以上の再発が 4 例あり、B cell precursor ALL が 68 例、T-ALL が 4 例、分類不能が 2 例であった。

2. MRD 再構成ターゲット：対象症例において MRD スクリーニングが完了した 48 例中 MRD 再構成ターゲット検出例は 42 例であった。このうち 2 例については検出された再構

成の感度不足のため、定量に使用することができず、定量完了に至った症例は 40 例であった。この 40 例における再構成ターゲットの内訳は IgH-VH19(47.5%)、IgH-DH3(7.5%)、Ig κ 7(17.5%)、TCR γ 3(7.5%)、TCR δ 7(17.5%)、TCR β 1(2.5%)であった。またこの 40 例における定量感度は 10⁻⁵ 以下 3 例、10⁻⁴ 19 例で、10^{-3.513} 例、10⁻³⁵ 例であった。

3. 定量精度標準化の評価：2004 年 7 月から 2011 年 9 月において解析した初発 ALL 219 例 (1 才から 18 才、BCP180 例、T39 例) についても同様の検討を行った。その結果、1 個以上の再構成ターゲットを検出できた症例は 206 例(94%)、BCP では 173 例(96%)、T では 33 例(85%)で、さらに 10⁻⁴ 以下の感度を持つ sensitive target が 1 個以上検出された症例は 199 例(91%)、BCP では 167 例(93%)、T では 32 例(82%)であった。

D. 考察

本年度は再発 ALL、再発リンパ腫の症例は少なかったため、プロトコール治療に登録できなかった症例等を含めた集団を対象として Ig/TCR 遺伝子再構成の検出と PCR による MRD 定量を試み、さらに従来より保存された検体を用いて、本研究の根幹をなす PCR による MRD 定量の精度を評価した。

本年度の検体においては、再構成検出率が 87.5%と、従来の 90%を超える成績を若干下回ったが、これは以前より懸案となってきた乳児白血病における再構成検出率の低さが影響したものと考えられる。しかしながら、一概に幼若なクローンによる検出の困難さが原因とも結論づけられず、今後技術的な熟練によって克服できる可能性も考えてさらなる検討が必要と考えられた。定量感度についても本年度はやや低い印象があり、10⁻⁴ 以下は 55%に留まったが、明らかな原因は見当たらず、定量用検体待ちの症例数も少なくないため、改めて全体像を評価していきたい。

並行して行った MRD 定量の精度の評価では再構成検出率、定量精度ともに欧州からの同様の報告(Flohr et al. *Leukemia* 2008; 22: 771-82.) における成績と同じ水準にあることが示

され、本研究の基盤を支える貴重なデータが得られたと考えられた。

E. 結論

本年度われわれは、再発 ALL、乳児白血病を含む 74 症例において Ig/TCR 遺伝子再構成を用いた PCR による MRD 定量を行うとともに、過去の ALL 症例 219 例についてもその定量精度を評価し、欧州と同等の水準での MRD 定量が可能となったことが示された。この手法の精度管理と、定量値と予後との関連についての評価が今後の課題と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsurusawa M, Hori T. Measurement of minimal residual disease and its implication. 日本臨床 2012、70 Suppl 2:731-6.
- 2) Koga Y, Kumagai M, Takimoto T, Mimaya J, Nakazawa A, Horibe K, Kobayashi R, Tsurusawa M, Inada H, Mori T. Retrospective analysis of 157 patients with pediatric Hodgkin lymphoma in Japan: investigation by four pediatric cancer study groups. 臨床血液. 2012、53:443-9.

2. 学会発表等

- 1) 鶴澤正仁. JPLSG 成熟 B 細胞性リンパ腫研究 (B-NHL03) における有害事象解析第 5 4 回日本小児血液がん学会 2012/11/30 横浜
- 2) 鶴澤正仁. 小児リンパ腫治療の進歩と今後の展望: JPLSG リンパ腫研究から学んだ事 第 18 回愛媛小児血液・悪性腫瘍研究会 愛媛 2012/5/25
- 3) 鶴澤正仁. 小児白血病における MRD 研究の進歩と今後の動向 第 10 回小児白血病カンファレンス in OKAYAMA 岡山 2012/8/4
- 4) 鶴澤正仁. 造血器腫瘍における微小残存病変測定研究の進歩と今後の課題 ALL 学術講演会 in HAKATA 博多 2012/10/6

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： 横紋筋肉腫の発症分子機構を解明し、治療標的を同定するために、初発、転移・再発例を含む横紋筋肉腫 49 例を用いて、SNP アレイによるゲノムコピー数の解析、次世代シーケンサーによる exom 解析を行った。さらに初発、転移・再発のペア検体が得られた胞巣型 3 例に関しては、全ゲノム解析を行った。SNP アレイでは胎児型と胞巣型のゲノムプロファイルが有意に異なること、*IRS2* の高度増幅などを新たに見出した。また、exom 解析の結果、*RAS*、*p53* など既知の変異に加えて、新規の細胞シグナル経路の異常が複数例で検出された。全ゲノム解析では初発、再発・転移巣に共通する変異に加えて、独立した変異も散見され、がんの進展にがん細胞集団進化の関与が示唆された。以上の結果より、横紋筋肉腫では細胞増殖シグナル経路に関与する複数の遺伝子とその発症に関与している可能性が示唆され、また、再発や転移のメカニズムとして、がん細胞集団進化の機序が示唆された。

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

横紋筋肉腫は骨格筋に分化する間葉系細胞由来と考えられる悪性腫瘍であり、小児悪性軟部腫瘍の中では最も頻度が高い。病理組織学的に胞巣型と胎児型の大きく 2 つに分類され、それぞれ特徴的な臨床像を示す。横紋筋肉腫の約 50% を占める胎児型は、比較的予後良好であるのに対して、全体の約 20% を占める胞巣型は、非常に予後不良である。遺伝学的な特徴としては胞巣型の約 75% に認められる $t(2;13)(q35;q14)$ または $t(1;13)(p36;q14)$ によるキメラ遺伝子である *PAX3-FOXO1* または *PAX7-FOXO1* があり、特に *PAX3-FOXO1* 陽性例は予後不良であることが知られている。胎児型では現在のところ重複する転座は知られていないが、11 番染色体短腕 (11p) 15.5 のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity: LOH) は胎児型の 70-100% に認められ特徴的とされている。しかし、胞巣型、胎児型いずれの組織型においても治療の標的分子は同定しておらず、発症分子機構も十分に解明されていない。そこで、横紋筋肉腫の発症分子機構を解明し、治療標的を同定するために、初発、転移・再発例を含む横紋筋肉腫 49 例を用いて、SNP

アレイによるゲノムコピー数の解析、次世代シーケンサーによる exom 解析を行った。さらに初発、転移・再発のペア検体が得られた胞巣型 3 例に関しては、全ゲノム解析を行った。

B. 研究方法

1. 対象

SNP アレイ解析は小児横紋筋肉腫新鮮腫瘍 41 例（胎児型 26 例、胞巣型 11 例、分類不能型 1 例、組織型不明 3 例）、細胞株 8 株（胎児型 5 株、胞巣型 3 株）を用いた。exom 解析は、新鮮腫瘍 15 例（胞巣型 7 例、胎児型 7 例、分類不能型 1 例）を用いて行った。またこのうち胞巣型新鮮腫瘍の 3 例については再発または転移巣の検体も用いて全ゲノムシーケンス解析も行った。

2. SNP アレイ

腫瘍検体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。

3. exom 解析

exom 解析のサンプル調整には腫瘍と正常のゲノム DNA 1-1.5 μ g を用い、メーカー

ロトコールに従い、調整を行った。その後アダプターを連結し PCR を行った後、Agilent Technologies 社の SureSelect Human All Exon 50Mb または SureSelect Human All Exon V4 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara CA) を用いて、全ゲノムから標的領域の抽出を行った。その後更にアダプター付加した上でシーケンスを行った。シーケンサーは Illumina HiSeq2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA) を使用した。

4. 全ゲノムシーケンス解析

Coriell サンプル NA18507 のゲノム DNA を 50ng 用い、TruSeqDNA サンプル調製プロトコールの改良法に従ってサンプル調製を行った。シーケンサーは Illumina HiSeq2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA) を使用した。

4. Exom および全ゲノムシーケンスのデータ解析

データ解析には Genomon (<http://genomon.hgc.jp/>) を用いた。体細胞変異候補の検出には、腫瘍と正常 DNA の変異コールを Fisher 検定し、P 値 0.01 未満をカットオフとし、腫瘍でのみ変異を起こしている可能性の高い変異を抽出した。さらに腫瘍側で変異のアレル頻度が 0.2 以上、正常側で 0.1 未満の候補から、病的意義が低いと考えられる、dbSNP 131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) に登録されており、COSMIC v61 (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) には登録がない変異や、1000 genome (<http://www.1000genomes.org/>)、Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) の Exome Sequencing Project dataset (5,400 exomes) for all populations で頻度が 0.1 以上の比較的頻度の高い SNP を除外した。最終的には腫瘍、正常 DNA 両方で Sanger シーケンスまたは deep シーケンスにより体細胞変異を確認した。

(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. SNP アレイ解析：胎児型では 2、8、12

番染色体の増幅が遺伝学的胞巣型と比べ有意に多く認められたことから、胎児型と遺伝学的胞巣型 (融合遺伝子陽性の胎児型を含む) ではゲノムプロファイルが明らかに異なることが判明した。一方全体的なアレル不均衡のパターンは両者に大きな違いがなく、11 番染色体の LOH は遺伝学的胞巣型でも胎児型と同等に高率に認められた。予後との関連では、胎児型において 13q の増幅が予後良好群に有意に多く、新たな予後マーカーとなる可能性が示された。本研究では横紋筋肉腫において新規の高度増幅領域も検出され、そのうち胞巣型 2 例に重複して認められたのが 13q33 の *IRS2* を含む領域だった。機能ドメインの変異解析では、新鮮腫瘍には変異を認めなかったが、RT-PCR による発現解析では胞巣型で 80%、胎児型に 50% と高頻度に発現を認めた。

2. Exom 解析：今までに次世代シーケンサーで解析された小児腫瘍の報告と同様に、横紋筋肉腫においても体細胞変異が少なく、横紋筋肉腫に特異的な、高頻度変異は検出されなかった。最も多いのは *TP53* で、germline 変異も含めて 4 例 (26.7%) に変異を認めた。特記すべき点として、個々の遺伝子変異の頻度は少ないものの、15 例中 7 例で PI3K 経路の活性化につながる変異が集中していることが分かった。また、胎児型 1 例、胞巣型 1 例でどちらもエピジェネティック関連分子である *ARID1A* のフレームシフト変異を認めた。前述以外では 2 例ずつで *KRAS* と *SPON1* の変異が認められた。今までに横紋筋肉腫で変異の報告のある各種 *RAS*、*PIK3CA*、*CTNNB1* などは今回も少数例で検出された。

3. 全ゲノムシーケンス解析：初発および再発、転移巣が得られた 3 例の胞巣型横紋筋肉腫症例において全ゲノムシーケンス解析を行った。exon 領域の変異は 1 サンプルあたり 16-132 個であり、intron 領域の変異は 1 サンプルあたり 4000-13000 個であった。これらの症例は exom 解析も行っているが、exon 領域の変異は exom 解析で検出されなかったものも複数含まれていた。それぞれ初発および再発、転移巣に共通する変異に加えて、独立した変異も散見された。サンプルごとに重複する変異数は異なる割合であった。

D. 考察

SNP アレイの結果より、胎児型と胞巣型横

紋筋肉腫は、それぞれゲノムプロファイルが異なることが判明し、融合遺伝子以外の有無以外にも異なる遺伝背景を有することが示唆された。特に、2番、8番、12番染色体の増幅は胎児型が有意に多く、これらの領域に存在する遺伝子の量的増加が胎児型横紋筋肉腫の発症に関与している可能性が示唆された。また、13qの増幅は有意に予後良好群に多い ($P = 0.013$) ことが判明し、胎児型の新たな予後マーカーとなる可能性が示された。今回新たに高度増幅が検出された *IRS2* は IGF 経路の構成要素で、がんのアポトーシス抵抗性の機構や乳がんにおいて転移に関与することが報告されている。また過剰発現すると IGF-1 を介した AKT の活性化を引き起こし、ヒト神経芽腫細胞株においてグルコース誘導性アポトーシスを抑制したり、CASPASE3 の切断を抑制する BAD のリン酸化を誘導することが示されていることから、横紋筋肉腫の候補標的分子の一つである可能性が示唆された。Exom 解析では、PI3K-AKT 経路の活性化につながる遺伝子の変異が高頻度に認められた。SNP アレイで高度増幅が検出された *IRS2* も、前述のように過剰発現が AKT の活性化につながることから、高度増幅した症例もこの経路に関与する可能性がある。またこの経路に変異を持つ症例において、*PTPN11* 以外はこの遺伝子セット内に変異の重複は認めなかった。*IRS2* の高度増幅を示した 2 例もこの経路の変異はなかったため、ほとんどが相互排他的となっていることも興味深い。全ゲノムシーケンスでは初発、再発・転移腫瘍では共通する変異に加えて独立した変異を多数検出したことから、再発や転移には細胞集団進化の機序が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

胎児型、胞巣型横紋筋肉腫では、異なるゲノムプロファイルを有することから、融合遺伝子以外にも異なる遺伝背景を有することが明らかとなった。また exom 解析および全ゲノム解析の結果から、横紋筋肉腫では細胞増殖シグナル経路に関与する複数の遺伝子が発症に関与している可能性が示唆され、また、再発や転移のメカニズムとして、がん細胞集団進化の機序が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Leiter A, Ham M, Li D, Doan NB, Said JW, Black KL, Phillip Koeffler H. miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2012 [epub ahead of printing]
- 2) Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirosawa T, Sato-Otsubo A, Torikai H, Hamajima T, Nannya Y, Demachi-Okamura A, Maruya E, Saji H, Yamamoto Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype. *Tissue Antigens*;80:119-25, 2012.
- 3) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF-kappaB Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer cell*;21:121-35, 2012.
- 4) Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia*;26:2557-60, 2012.
- 5) Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood*;120:1299-1308, 2012.
- 6) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*;26:1879-81, 2012.
- 7) 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*;156:672-74, 2012.
- 8) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Sato-Otsubo 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 (FPD/AML). *Blood*;119:2612-14, 2012.
- 9) Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S. Single-Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping in Clinical Practice: Where, When, and How? *Seminars in Oncology*;39:13-25 2012.
- 10) 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*;31:4667-76, 2012.
- 11) Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K,