

- Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Annals of hematology*;92:1-9, 2013.
- 12) Ogawa S. Splicing factor mutations in myelodysplasia. *International journal of hematology*;96:438-42, 2012.
- 13) Nowak D, Klaumuenzer M, Hanfstein B, Mossner M, Nolte F, Nowak V, Oblaender J, Hecht A, Hutter G, Ogawa S, Kohlmann A, Haferlach C, Schlegelberger B, Braess J, Seifarth W, Fabarius A, Erben P, Saussele S, Muller MC, Reiter A, Buechner T, Weiss C, Hofmann WK, Lengfelder E. SNP array analysis of acute promyelocytic leukemia may be of prognostic relevance and identifies a potential high risk group with recurrent deletions on chromosomal subband 1q31.3. *Genes Chromosomes Cancer*;51:756-67 2012.
- 14) Nomoto J, Hiramoto N, Kato M, Sanada M, Maeshima AM, Taniguchi H, Hosoda F, Asakura Y, Munakata W, Sekiguchi N, Maruyama D, Watanabe T, Nakagama H, Takeuchi K, Tobinai K, Ogawa S, Kobayashi Y. Deletion of the TNFAIP3/A20 gene detected by FICTION analysis in classical Hodgkin lymphoma. *BMC Cancer*;12:457 2012.
- 15) Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S, Koeffler HP, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*;120:3080-8, 2012.
- 16) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*;119:2376-84, 2012.
- 17) Koren-Michowitz M, Sato-Otsubo A, Nagler A, Haferlach T, Ogawa S, Koeffler HP. Older patients with normal karyotype acute myeloid leukemia have a higher rate of genomic changes compared to young patients as determined by SNP array analysis. *Leuk Res*;36:467-473 2012.
- 18) Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe SI, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*;18:375-7, 2012.
- 19) Kamada Y, Sakata-Yanagimoto M, Sanada M, Sato-Otsubo A, Enami T, Suzukawa K, Kurita N, Nishikii H, Yokoyama Y, Okoshi Y, Hasegawa Y, Ogawa S, Chiba S. Identification of unbalanced genome copy number abnormalities in patients with multiple myeloma by single-nucleotide polymorphism genotyping microarray analysis. *International journal of hematology*;96:492-500, 2012.
- 20) Iwakawa R, Okayama H, Kohno T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Contribution of germline mutations to PARK2 gene inactivation in lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*;51:462-72, 2012.
- 21) Hosokawa K, Katagiri T, Sugimori N, Ishiyama K, Sasaki Y, Seiki Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S, Nakao S. Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS-U' designation. *Haematologica*;97:1845-9, 2012.
- 22) Hirabayashi S, Flotho C, Moetter J, Heuser M, Hasle H, Gruhn B, Klingebiel T, Thol F, Schlegelberger B, Baumann I, Strahm B, Stary J, Locatelli F, Zecca M, Bergstraesser E, Dworzak M, van den Heuvel-Eibrink MM, De Moerloose B, Ogawa S, Niemeyer CM, Wlodarski MW. Spliceosomal gene aberrations are rare, coexist with oncogenic mutations, and are unlikely to exert a driver effect in childhood MDS and JMML. *Blood*;119:e96-9, 2012.
- 23) Sanada M, Ogawa S. Genome-wide analysis of myelodysplastic syndromes. *Curr Pharm Des.*;18:3163-9.2012.
- 24) Yoshida K, Sanada M, Ogawa S. Deep Sequencing in Cancer Research. *Jpn J Clin Oncol.* 2012 Dec 5. [Epub ahead of print]
- 25) Kato M, Yasui N, Seki M, Kishimoto H, Sato-Otsubo A, Hasegawa D, Kiyokawa N, Hanada R, Ogawa S, Manabe A, Takita J, Koh K. Aggressive transformation of juvenile myelomonocytic leukemia associated with duplication of oncogenic KRAS in consequence of acquired uniparental disomy. *J Pediatr.* (in press)

## 2. 学会発表

- 1) Kon A, Sanada M, Yoshida K, Shiraishi Y, Nagata Y, Sato Y, Sato-Otsubo A, Nagasaki M, Obara N, and Ogawa S. Mutations of cohesin genes in myeloid malignancy, American Association for Cancer Research 2012
- 2) Hiwatari M, Takita J, Nishimura R, Okubo J, Oki K, and Ogawa S. Mutational analysis for IDH1 and IDH2 in pediatric leukemia. American Association for Cancer Research 2012
- 3) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, N Daniel, and Ogawa S. Frequent splicing pathway mutations and aberrant RNA splicing in myelodysplasia. American Association for Cancer Research 2012
- 4) Nagata Y, Sanada M, Yoshida K, Kon A, and Ogawa S. Integral view of copy number alteration and commonly targeted genes in MDS found a new aspect of correlation and interrelationship with mutated components of the RNA splicing machinery. American Association for Cancer Research 2012
- 5) Sato Y, Mekawa S, Nagata Y, and Ogawa S. Integrated genetic analysis of clear cell renal cell carcinoma. American Association for Cancer Research 2012
- 6) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, and Ogawa S. Frequent splicing pathway mutations and aberrant RNA splicing in myelodysplasia.

- American Association for Cancer Research 2012
- 7) Ogawa S. Deregulated RNA splicing machinery in myelodysplastic syndromes. American Association for Cancer Research 2012
- 8) Nishimura R, Takita J, Yoshida K, Shiraishi Y, Hoshino N, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Igarashi T, Ogawa S: Whole-exome sequencing of advanced neuroblastomas. Advances Neuroblastoma Research Conference, Toront, June 18 - 21, 2012
- 9) Ogawa S, RNA Splicing in Normal and Malignant Hematopoiesis, Scientific Committee on Hematopoiesis, American Society of Hematology 2012
- 10) 小川 誠司. ゲノム・エピゲノム研究から臨床への新展開 骨髄異形成症候群の全エクソン解析による新規パスウェイ変異の同定(会議録). 日本臨床分子医学会学術総会プログラム・抄録集 49回 Page57(2012.04)
- 11) 小川 誠司. 【MDS をめぐる最近の進歩-治療を目指して】 MDS におけるゲノム異常解析の進歩(解説/特集). 血液内科(2185-582X)65 巻 3 号 Page308-315(2012.09)
- 12) 小川 誠司. 【がんと代謝 何故がん細胞が好んで解糖系を使うのか?メタボローム解析が明かすがん細胞の本質から代謝研究がもたらす創薬・診断まで】 (第 2 章)がん特異的代謝 IDH 変異と発がん(解説/特集). 実験医学(0288-5514)30 巻 15 号 Page2395-2399(2012.09)
- 13) 森島 聡子, 小川 誠司, 佐藤 亜以子, 柏瀬 貢一, 笹月 健彦, 森島 泰雄. 非血縁者間骨髄移植における HLA ハプロタイプ適合性の意義 (会議録). MHC: Major Histocompatibility Complex(2186-9995)19 巻 2 号 Page159(2012.08)
- 14) 小川 誠司. 【白血病治療の最前線-EBM の先にあるもの】 急性骨髄性白血病の遺伝学的基盤(解説/特集). カレントセラピー(0287-8445)30 巻 10 号 Page1069-1073(2012.10)
- 15) 吉田 健一, 真田 昌, 小川 誠司. 【骨髄不全症候群(特発性造血障害):診断と治療の進歩】 造血に関する最新の話 骨髄異形成症候群の新たな分子メカニズム(解説/特集). 日本内科学会雑誌(0021-5384)101 巻 7 号 Page1994-2001(2012.07)
- 16) 前 伸一, 庄野 朱美, 塩田 文彦, 小川 誠司, McMahon Andrew P., 山中 伸弥, 長船 健二. ヒト iPS 細胞から腎構成細胞に分化しうる中間中胚葉への高効率分化誘導法の確立(会議録). 日本腎臓学会誌(0385-2385)54 巻 3 号 Page221(2012.04)
- 17) 吉田 健一, 真田 昌, 小川 誠司. 骨髄異形成症候群における IDH1/2 遺伝子変異(総説). 臨床血液(0485 (0485-1439)53 巻 4 号 Page391-395(2012.04)
- 18) 小川 誠司. 【抗がん剤治療の最前線:分子標的薬剤の使用による進歩(前篇)】 治療につながる診断の新規技術と分子生物学の進歩 B 細胞受容体シグナル伝達と B 細胞リンパ腫(解説/特集). 最新医学(0370-8241)67 巻 6 月増刊 Page1415-1424(2012.06)
- 19) 小川 誠司. Myeloid Malignancy 骨髄異形成症候群におけるスプライシング装置の異常(解説). 臨床血液(0485-1439)53 巻 5 号 Page493-496(2012.05)
- 20) 細川 晃平, 片桐 孝和, 杉森 尚美, 石山 謙, 佐々木 祐美, 清木 ゆう, 佐藤 亜以子, 真田 昌, 小川 誠司, 中尾 眞二. 13q 欠失を伴う MDS-U は免疫抑制療法によって改善する良性の骨髄不全である(会議録). 日本内科学会雑誌(0021-5384)101 巻 Suppl. Page200(2012.02)
- 21) 小川 誠司. 【造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向-】 造血器腫瘍の基礎 白血病発症の分子機構 白血病・骨髄異形成症候群の全ゲノム解析(解説/特集). 日本臨床(0047-1852)70 巻増刊 2 造血器腫瘍学 Page113-118(2012.04)
- 22) 前川 滋克, 佐藤 悠祐, 佐藤 亜以子, 真田 昌, 久米 春喜, 小川 誠司, 本間 之夫. 腎盂尿管癌における網羅的ゲノム解析(会議録). 日本泌尿器科学会雑誌(0021-5287)103 巻 2 号 Page304(2012.03)
- 23) 佐藤 悠祐, 前川 滋克, 永田 安伸, 吉田 健一, 佐藤 亜以子, 白石 友一, 真田 昌, 久米 春喜, 小川 誠司, 本間 之夫. SNP アレイおよび次世代シーケンサーを用いた腎細胞癌の網羅的ゲノム解析(会議録). 日本泌尿器科学会雑誌(0021-5287)103 巻 2 号 Page215(2012.03)
- 24) 小川 誠司. 癌のゲノム医療 全エクソン解析による個別化医療(会議録). 日本泌尿器科学会雑誌(0021-5287)103 巻 2 号 Page74(2012.03)
- 25) 星野 論子, 滝田 順子, 西村 力, 大久保 淳, 真田 昌, 白石 友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五十嵐 隆. 神経芽腫におけるポリコム群たんぱくの網羅的ゲノム解析(会議録). 日本小児科学会雑誌(0001-6543)116 巻 2 号 Page254(2012.02)
- 26) 大久保 淳, 滝田 順子, 西村 力, 星野 論子, 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(会議録). 日本小児科学会雑誌(0001-6543)116 巻 2 号 Page245(2012.02)
- 27) 西村 力, 滝田 順子, 吉田 健一, 白石 友一, 大久保 淳, 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(会議録). 日本小児科学会雑誌(0001-6543)116 巻 2 号 Page245(2012.02)
- 28) 滝田 順子, 西村 力, 大久保 淳, 吉田 健一, 星野 論子, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五十嵐 隆. 先端的ゲノムスキ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(会議録). 日本小児科学会雑誌(0001-6543)116 巻 2 号 Page245(2012.02)
- 29) 小川 誠司. 白血球系 急性骨髄性白血病のゲノム解析とエピゲノム異常(解説). Annual

Review 血液 2012 巻 Page99-108(2012.01)

30) 小川 誠司. 【がんゲノミクスで挑む次世代のがん研究】 がんにおけるゲノムコピー数解析(解説/特集). 実験医学(0288-5514)30 巻 1 号 Page12-16(2012.01)

31) 中田 雄一郎, 長町 安希子, 上田 健, 山崎 憲政, 仙谷 和弘, 稲葉 俊哉, 滝田 順子, 小川 誠司, 本田 浩章: 活性化 ALK は増幅した MYCN と協調して神経芽腫細胞腫発症に関与する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日~21 日

32) 星野 論子, 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 年 9 月 19 日~21 日

33) 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 年 9 月 19 日~21 日

34) 大西 伸幸, サンベトラオルデア, 杉原 英志, 清水 孝恒, 滝田 順子, 小川 誠司, 佐谷 秀行: 神経幹細胞を用いたマウス脳腫瘍モデルにおける活性化型 ALK 誘導発がんメカニズム. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日~21 日

35) 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 年 9 月 19 日~21 日

36) 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 アレイと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 年 9 月 19 日~21 日

37) 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 年 9 月 19 日~21 日

38) 関 正史, 西村 力, 星野 論子, 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: 先端的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 年 11 月 30 日~12 月 2 日

39) 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 年 11 月 30 日~12 月 2 日

40) 安井 直子, 康 勝好, 関 正史, 加藤 元博, 滝田 順子, 佐藤 亜以子, 小川 誠司, 磯部 清孝, 森 麻希子, 秋山 康介, 荒川 ゆうき, 林 真由美, 岸本 宏志, 清河 信敬, 花田 良二: AML に急性転化し死亡した K-RAS 変異を伴う JMML の一例, 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012 年 11 月 30 日~12 月 2 日

41) 星野 論子, 西村 力, 奥野 友介, 永田 安伸, 吉田 健一, 真田 昌, 白石 友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 岩中 督, 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 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012 年 11 月 30 日~12 月 2 日

42) 関 正史, 西村 力, 星野 論子, 島村 徹平, 宮野 悟, 永江 弦太, 油谷 浩幸, 林 泰秀, 小川 誠司, 滝田 順子: 神経芽腫における網羅的メチル解析, 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012 年 11 月 30 日~12 月 2 日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無

## ゲノム・遺伝子発現情報からみた 小児がんの臨床的特性の解明と治療への応用

研究分担者 大平 美紀 千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室 室長

**研究要旨：**本分担研究では難治性小児がんの新規治療法の開発につながる標的遺伝子の同定と腫瘍層別化システムの構築を目標として、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析とゲノムコピー数異常解析による腫瘍の悪性度や患者予後に強く関わる分子的特徴の検索を行っている。昨年度より小児骨肉腫の予後ならびに化学療法感受性に関わる分子プロファイルの解明を目的に、治療前のバイオプシーサンプルを用いたゲノムコピー数解析を行ったところ、予後との関連が期待される染色体領域が複数見いだされたほか、治療感受性の異なる3つのグループにそれぞれ関連するゲノム異常プロファイルが抽出された。これらのマーカー候補についてはさらに症例数を加え検証を進めている。また、今年度より次世代シーケンサーを用いた既知がん関連遺伝子の網羅的変異解析を開始した。遺伝子変異とゲノム異常プロファイルとの組み合わせにより、特に治療反応性の乏しい群における分子標的の検索を進める。

### A. 研究目的

近年の化学療法の進展により、小児がんの予後は飛躍的に向上したものの、一部の小児がんについては依然として予後不良であり、早期層別化と新たな治療法の開発が望まれる。また、小児がんの臨床においては、治療後の生活の質を重視した治療戦略の選択は特に重要であり、その観点からも精度の高い腫瘍リスク分類システムの構築が急務である。そこで本研究では、難治性小児がんを対象に、悪性度などの臨床的特性の異なる小児がん由来組織の遺伝子発現やゲノム異常等の分子プロファイルを検索し、背景にある分子的特徴を明らかにすることにより、治療標的候補の同定と腫瘍層別化による効率的な治療システムの構築に応用することを目的とする。昨年度より骨原発性悪性腫瘍の中で最も多い骨肉腫を主な対象として研究を進めた。骨肉腫は近年多剤併用化学療法と手術等による局所療法の組み合わせにより5年生存率は約80%に達するようになったが、化学療法が奏効しない症例もしばしば見られ、その5年生存率は約30%と未だに予後不良である。現在の化学療法に対する感受性予測のためのマーカーの同定を目的に、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル、アレイCGH解析、遺伝子変異検索によるゲノム異常の情報と予後情報の統計解析により層別化

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

### B. 研究方法

#### 1. 症例の収集と選択：

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

#### 2. ゲノムコピー数異常解析：

上記骨肉腫生検試料由来のゲノムDNA 500ngを出発材料に、ヒトオリゴアレイ（アジレント社 Whole Human Genome oligo DNA

microarray、4x44k フォーマット) を用いてアレイ CGH 解析を行った。対照コントロールにはヒト胎盤由来 DNA 500ng を全例について用いた。ハイブリダイゼーション後の数値化とマッピングは Feature Extraction、Genomic Workbench CGH Module を用いた。

### 3. 遺伝子発現解析:

骨肉腫細胞株あるいは凍結腫瘍組織から調製した total RNA 1 $\mu$ g を出発材料に逆転写酵素を用いて cDNA を調製し定量 RT-PCR 解析を行った。標準化コントロールとして GAPDH 遺伝子を用いた。

### 4. 遺伝子変異解析:

骨肉腫細胞株あるいは凍結腫瘍組織から調製したゲノム DNA 1 $\mu$ g を出発材料に次世代型シーケンサーによる DNA 配列解析を行った。PCR 法により標的遺伝子領域を増幅し、アンプリコンシーケンシングを行った。

(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、関連法規ならびに指針を遵守し、倫理審査委員会ならびに実施機関長の承認を得た上で、検体提供者の人権の擁護、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. 骨肉腫のゲノムコピー数異常解析と治療感受性の関連解析:

骨肉腫のゲノム異常は高度な complexity や heterogeneity を示し、gain (増加) が loss (欠失) に比べ圧倒的に多いことが特徴であるが、骨肉腫の予後因子や治療感受性予測因子として有用なゲノムコピー数異常プロファイルはこれまで明らかにされていない。過去の報告では加療後に採取された腫瘍組織を用いた解析結果がほとんどであり、本来の腫瘍がもつゲノムプロファイルを反映しているとはいいがたい。そこで本研究では、千葉県がんセンターにて治療を受け、同センターがんバイオバンクに検査後の残余組織が保存された小児骨肉腫症例 68 例のうち、臨床病理学的背景がほぼ均一な 22 例 (2 年以上無病生存: 14 例、死亡例: 8 例) の生検試料を用いたアレイ CGH 解析を行い、そのゲノム異常プロファイルから予後と相関する領域の抽出をこれまでに行った。22 例全体のパターンは欧米人症例 20 例の過去の報告とほぼ共通であり、1p、5p、6p、8q、17p、17q、19p、19q、21q など

多くの染色体領域の増加と 6q、8p、9p、10p、10q、13q、17p などの欠失が高頻度に見られた。染色体短腕長腕単位での増加/欠失数や染色体内 breakpoint 数の比較では骨肉腫予後良好群、予後不良群間での頻度の有意差は認めなかった。しかしながら染色体領域毎にこれら両群間のゲノムコピー数異常プロファイルの比較を行ったところ、1q、3p、6p、9q、12q、15q の一部の連続した領域で予後に関して有意差が見られた ( $p < 0.05$ )。

次に化学療法感受性のマーカーの探索のため、治療奏効性とゲノムコピー数異常プロファイルとの比較を行った。標準的な骨肉腫 Neoadjuvant 化学療法プロトコールにおいては、MTX、ADM、CDDP 3 剤併用による術前化学療法 (MAP 療法) の後、奏効性の評価が効果不十分であった症例に対して術後に IFO を加えた治療を行う。そこで、MAP 療法に対して good responder と判定された 8 例を A 群、MAP 療法に反応せず IFO に変更し good responder と判定された 6 例を B 群、IFO に変更するも poor responder と判定された 8 例を C 群とし、それぞれに特徴的なプロファイルを抽出した。生存曲線解析より A、B 群に対し C 群は有意に予後不良であった。A 群と B、C 群との鑑別には 5p 領域の増加が (感度 87.5%、特異度 92.9%)、また C 群と A、B 群との鑑別には 9q 領域の欠失および 12q 領域の増加が (感度 100%、特異度 92.9%) それぞれ特徴的であった。5p12 と 9q21 のコピー数による二次元プロットにおいても、これら 3 群が分類可能であることが示唆された。

### 2. 骨肉腫のバイオプシー検体における遺伝子変異解析:

上記のゲノム異常のほか、既に報告されている RUNX2 遺伝子など関連遺伝子の発現レベルやドライバー遺伝子変異の有無も患者予後や治療感受性に影響を及ぼしていると考えられる。そこで本年度より次世代型シーケンサーを用いた網羅的ながん関連遺伝子群の遺伝子変異検索を開始した。骨肉腫細胞株ならびに腫瘍バイオプシー検体より調製したゲノム DNA を出発材料に、43 種の候補遺伝子のエクソン部分約 2400 カ所の既知変異ホットスポットを対象に PCR 法により標的遺伝子領域を増幅し、アンプリコンシーケンシングを進めている。

## D. 考察

骨肉腫全体の年間発生例数は約 200 例と少なく、術前治療が標準であるため加療前に採取された研究用の試料はこれまでにほとんど集積されていなかった。小児期の骨肉腫組織のゲノムコピー数異常プロファイルについての過去数件の報告においても、治療前の骨肉腫生検組織を用いた解析は国内外でもまとまった検体数の報告はなされていない。当センターでは 10 年以上の長期にわたるバイオバンクへの研究用試料の保管と質の高い臨床情報の収集が可能であったことから治療前の試料を用いた解析が可能であった。

## E. 結論

症例数をさらに広げた再現性の検証が必須であるが、本研究より示唆された治療感受性に強い相関が見られるゲノムプロファイルを用いた治療前生検組織を用いて解析することで、骨肉腫の各患者における至適化学療法レジメンの予測が可能となりうることが示唆された。次世代型シーケンサーを用いて進めている各症例の網羅的な遺伝子変異の検索が進めば、治療計画の個別化につながる有用な情報がさらに蓄積されると期待される。今後、臨床応用を目標に多施設共同実施も視野に入れさらに解析と検証を進める。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sugimoto T, Gotoh T, Yagyu S, Kuroda H, Iehara T, Hosoi H, Ohta S, Ohira M, Nakagawara A. A MYCN-amplified cell line derived from a long-term event-free survivor among our sixteen established neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 331:115-21, 2013.
- 2) Chand D, Yamazaki Y, Ruuth K, Schönherr C, Martinsson T, Kogner P, Attiyeh EF, Maris J, Morozova O, Marra MA, Ohira M, Nakagawara A, Sandström PE, Palmer R, Hallberg B. Cell and Drosophila model system define three classes of ALK mutations in neuroblastoma. *Dis. Model Mech.* in press. 2012.
- 3) Shum CKY, Lau ST, Tsoi LLS, Chan LK, Yam JWP, Ohira M, Nakagawara A, Tam PKH, Ngan ESW. Kruppel-Like Factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage

differentiation. *Oncogene* in press. 2012.

- 4) Hashizume O, Shimizu A, Yokota M, Sugiyama A, Nakada K, Miyoshi H, Itami M, Ohira M, Nagase H, Takenaga K, Hayashi J. Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(26):10528-33, 2012.
- 5) Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A. ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer* 75(1):66-72, 2012.

## 2. 学会発表

- 1) 岩田慎太郎、大平美紀、米本司、石井猛、舘崎眞一郎、中川原章. ゲノム解析による骨肉腫患者の至適化学療法予測システム. 第 45 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 東京, 7 月 14 日-15 日, 2012.
- 2) Iwata S, Ohira M, Yonemoto T, Ishii T, Tatezaki S, Nakagawara A.: Genomic predictor of response to preoperative chemotherapy in patients with pediatric osteosarcoma. *Connective Tissue Oncology Society, 17th Annual Meeting*, チェコ・プラハ, 11 月 14 日-17 日, 2012.
- 3) 大平美紀、磯貝恵理子、中村洋子、上條岳彦、中川原章. マイクロ RNA 発現レベルによる神経芽腫のリスク分類. 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.
- 4) 岩田慎太郎、大平美紀、米本司、石井猛、舘崎眞一郎、中川原章. ゲノム解析による骨肉腫患者の至適化学療法予測システム. 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.

## 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

## 腫瘍細胞特異的遺伝子発現の経時的変化と治療の有効性についての研究

研究分担者 福島 敬 筑波大学医学医療系臨床医学域小児内科准教授

**研究要旨：** 小児急性リンパ性白血病の治療成績向上には、治療の層別化（リスク分類）の果たしてきた役割が大きい。従来使用されてきた“発症年齢”と“白血球数”による層別化に加え、種々のリスク因子が検討されている。中でも治療開始初期の反応性（白血病細胞の減少速度）は、それを根拠とした介入の臨床的有用性を検証する臨床試験が世界的に行われている。染色体の転座に伴うキメラ遺伝子は白血病細胞に特異的に発現される遺伝子であり、治療反応性を簡便かつ高精度に評価する指標となるかどうかを検証することを目的として、本研究を行った。微量残存白血病（MRD）追跡 170 例の内、130 症例は day29 までに検出感度未満まで減少した。予後不良因子とされる *BCR-ABL* の MRD は、26 症例中 14 症例において、一方で *MLL* 関連キメラ遺伝子の MRD は、20 症例中 12 症例において、day43 以降まで検出された。寛解導入療法中に 2 週間ごとにキメラ遺伝子 MRD を評価することによって、治療の層別化・個別化に応用できる可能性があると考えられた。

### 研究協力者

南木 融 筑波大学附属病院  
検査部技師長・副部長

- Major *BCR-ABL*
- *MLL-AF4*
- *MLL-AF9*
- *MLL-ENL*
- *SIL-TALI*

### A. 研究目的

小児 ALL の治療成績向上には層別化治療が大きな役割を果たしてきた。将来のより高精度な層別化・個別化の根拠となる新規リスク因子の抽出が検討される中、初期治療反応性が有望な候補の1つであるとされている。染色体異常に伴うキメラ遺伝子に由来する mRNA 発現定量による初期治療反応性について、リスク因子としての臨床的意義を検証する。

### B. 研究方法

東京小児がん研究グループ（TCCSG）登録急性リンパ性白血病（ALL）症例のうち、2010年4月1日から2011年3月4日までの期間に、188症例に対して筑波大学附属病院において発症時キメラ遺伝子スクリーニングの中央診断を行った。各医療機関（表1＝TCCSG施設59）から匿名化された骨髄または血液の送付を受け、標準的な方法によって mRNA 抽出、cDNA 作成、定量 PCR を行った。スクリーニング対象のキメラ遺伝子は以下のとおりである。

- *TEL-AML1 (ETV6-AML1)*
- *E2A-PBX1*
- Minor *BCR-ABL*

なお、検出感度は 20 コピー/100ngRNA に設定した。135 症例でいずれかのキメラ遺伝子が検出された。内訳を表 2 および表 3 に示す。

発症時のスクリーニング結果のみ、担当医に報告した。キメラ遺伝子が検出された 135 症例では、寛解導入療法および早期強化療法期間にかけて、該当するキメラ遺伝子の定量による微量残存白血病細胞(MRD)を追跡した。治療は、TCCSG の ALL 16 次案に準拠した。（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた本研究の実施にあたり、関連法規を遵守し筑波大学附属病院倫理審査委員会ならびに病院長の承認を得た上で、更に診療を担当する各 TCCSG 施設においても倫理委員会または研究審査委員会（IRB）の承認を得て実施した。検体提供者への人権擁護および個人情報保護に細心の注意を払った。

### C. 研究結果

#### 1. *TEL-AML1 (ETV6-AML1)*

本キメラ遺伝子を利用した MRD 追跡 77 症例（平成 21 年以前の症例を含む）の内 65 症例は day29 までに MRD 検出感度未満まで減少したが、12 症例は day29 以降まで検出さ

れた (表 3、図 2)。

## 2. E2A-PBX1

本キメラ遺伝子を標的として MRD 追跡を行った 35 症例では、33 症例が day 29 までに検出感度未満に減少したが、2 症例は、day29 以降まで検出された (表 3、図 3)。

## 3. BCR-ABL

本キメラ遺伝子が検出された 26 症例の MRD は、day29 までに検出感度未満に減少したのが 12 症例、day29 以降まで検出されたのが 14 症例であった (表 3、図 4)。

## 4. MLL 再構成

本キメラ遺伝子が検出された 20 症例 (MLL-AF4、MLL-AF9、MLL-ENL) のうち、MRD 追跡は 20 症例に対して実施された。8 症例は day29 までに陰性化した。他の 12 症例では day29 以降まで検出され、早期強化療法後に陰性化した (表 3、図 5)。

## 5. SIL-TAL1

本キメラ遺伝子が検出された 12 症例全てが、day 29 までに検出感度未満に減少した (表 3、図 6)。

## D. 考察

予後不良因子とされる BCR-ABL の MRD 陰性化までの期間は、他のキメラ遺伝子に比べて明らかに長い傾向が確認された。一方で、予後不良因子とはされていない TEL-AML1 および E2A-PBX1 では、多くの症例では MRD 陰性化が day29 の時点であるが、一部に day15 の早期に陰性化する反応良好例がある一方で、陰性化が day43 以降の反応不良例が存在する。治療開始初期の MRD の減衰率または、検出感度未満に減少する次期によって将来の再発を予測することが可能かどうか、可能であった場合に、既知の予後因子と独立した役割を担うことができるのか、本研究対象症例の今後の臨床経過を追跡することによって明らかにされることが期待される。

## E. 結論

1. キメラ遺伝子による MRD 追跡対象 170 例の内、130 症例は day29 までに検出感度未満まで減少した。

2. 予後不良因子とされる BCR-ABL の MRD は、26 症例中 14 症例で day29 以降まで検出された。

3. 寛解導入療法中に 2 週間ごとにキメラ遺伝子 MRD を評価することによって、治療の層別化・個別化に応用できる可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 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) 高橋浩之, 康勝好, 加藤元博, 福島敬, 犬飼岳史, 清河信敬, 滝智彦, 齋藤正博, 梶原道子, 小川千登世, 前田美穂, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏, 小原明. 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, 10 月 19 日-21 日, 2012.

6) 大木健太郎, 大喜多肇, 小林健一郎, 柴徳生, 朴明子, 外松学, 福島敬, 康勝好, 花田良二, 真部淳, 菊地陽, 土田昌宏, 小原明, 清河信敬, 林泰秀. 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, 10 月 19 日-21 日, 2012.

7) 清河信敬, 飯島一智, 富田理, 小林健一郎, 大喜多肇, 長谷川大輔, 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. Analysis on gene expression profile in childhood ALL using Gene Set Enrichment Analysis. 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.

8) 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.

9) 富田理, 清河信敬, 三春晶嗣, 小林健一郎, 大喜多肇, 長谷川大輔, 嶋田博之, 森鉄也, 福島敬, 斎藤正博, 犬飼岳史, 康勝好, 杉田完爾, 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. Significance of CD66c expression in childhood ALL. 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

表1 TCCSG 参加施設 (2012年度 59施設)

茨城県立こども病院小児科  
神奈川県立こども医療センター血液・再生医療科  
熊本大学医学部附属病院小児科  
熊本赤十字病院小児科  
群馬大学医学部附属病院 小児科  
前橋赤十字病院小児科  
慶應義塾大学病院小児科  
東京歯科大学市川総合病院小児科  
足利赤十字病院小児科  
横須賀共済病院小児科  
総合太田病院小児血液腫瘍科  
国立がんセンター中央病院小児科  
国立病院機構熊本医療センター小児科  
国立成育医療研究センター血液腫瘍科/固形

#### 腫瘍科

埼玉医科大学国立医療センター小児腫瘍科  
埼玉医科大学総合医療センター小児科  
埼玉県立小児医療センター血液・腫瘍科  
東京慈恵会医科大学附属病院小児科  
自治医科大学附属病院小児科  
順天堂大学医学部附属順天堂病院小児科  
昭和大学藤が丘病院小児科  
信州大学医学部附属病院小児科  
長野県立こども病院総合診療科  
聖マリアンナ医科大学病院小児科  
聖マリアンナ医大横浜市西部病院小児科  
聖路加国際病院小児科  
千葉大学医学部附属病院小児科  
成田赤十字病院小児血液腫瘍科  
松戸市立病院小児科  
帝京大学ちば総合医療センター小児科  
千葉県こども病院血液・腫瘍科  
帝京大学医学部附属病院小児科  
東海大学医学部附属病院小児科・細胞移植科  
東京医科歯科大学医学部附属病院小児科  
武蔵野赤十字病院小児科  
東京医科大学病院小児科  
東京大学医学部附属病院小児科  
東京女子医科大学東医療センター小児科  
東邦大学医療センター大森病院小児科  
東邦大学医療センター大橋病院小児科  
獨協医科大学病院小児科  
東京都立小児総合医療センター血液腫瘍科  
がん・感染症センター都立駒込病院小児科  
日本医科大学附属病院小児科  
日本医科大学千葉北総病院小児科  
山梨大学医学部附属病院小児科  
横浜市立大学附属病院小児科  
済生会横浜市南部病院小児科  
東京大学医科学研究所附属病院小児細胞移植科  
筑波大学附属病院小児科  
群馬県立小児医療センター血液・腫瘍科  
杏林大学病院 小児科  
昭和大学病院 小児科  
東京西徳洲会病院 小児難病センター  
防衛医科大学校 小児科  
亀田総合病院 小児科  
静岡県立静岡がんセンター 小児科  
済生会横浜市東部病院 こどもセンター小児科  
相模原協同病院小児科

表2 キメラ遺伝子別検出症例数

	H22	H23	~H24.10	合計	%
総症例数	198	195	110	503	100
解析不能	5	10	1	16	3.2
キメラ遺伝子検出	50	54	31	135	26.8
<i>TEL-AML1</i>	22	31	18	71	14.1
<i>E2A-PBX1</i>	11	8	7	26	5.2
<i>minor BCR-ABL</i>	9	6	3	18	3.6
<i>major BCR-ABL</i>	1	1	0	2	0.4
<i>MLL-AF4</i>	3	1	0	4	0.8
<i>MLL-AF9</i>	1	2	0	3	0.6
<i>MLL-ENL</i>	1	2	1	4	0.8
<i>SIL-TAL1</i>	2	3	2	7	1.4

表3 キメラ遺伝子消失時期

キメラ遺伝子 (N)	Day 15	Day 29	Day 43	Week 12 $\leq$
<i>TEL-AML1</i> (77)	5	60	10	2
<i>E2A-PBX1</i> (35)	6	27	1	1
<i>BCR-ABL</i> (26)	3	9	6	8
<i>MLL</i> 関連 (20)	3	5	6	6
<i>SIL-TAL1</i> (12)	2	10	0	0
Total (170)	19	111	23	17

*BCR-ABL* : *minor BCR-ABL* と *major BCR-ABL*

*MLL* 関連 : *MLL-AF4*, *MLL-AF9*, *MLL-ENL*

平成 21 年以前の症例を含む。

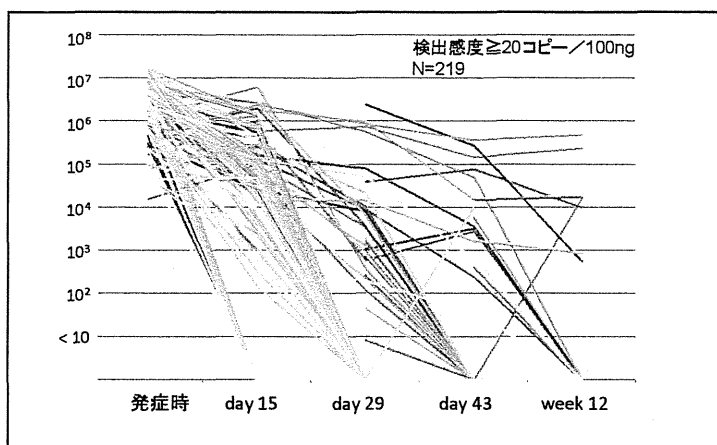


図1 キメラ遺伝子検出全例におけるコピー数（/100ng RNA）の推移  
 1：発症時骨髄  
 2：day 15  
 3：day 29  
 4：day 43（寛解導入療法終了時）  
 5：早期強化療法後（week 12相当）

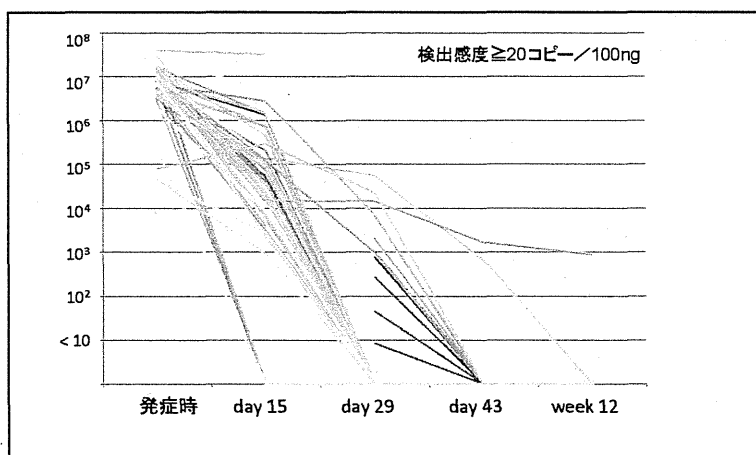


図2 *TEL-AML1* コピー数（/100ng RNA）の推移 (N=118)  
 1：発症時骨髄  
 2：day 15  
 3：day 29  
 4：day 43（寛解導入療法終了時）  
 5：早期強化療法後（week 12相当）

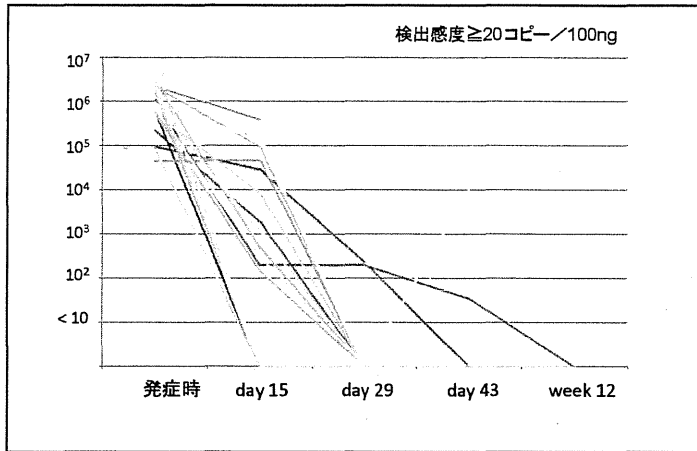


図3 *E2A-PBX1* コピー数 ( /100ng RNA) の推移

N=38

- 1 : 発症時骨髓
- 2 : day 15
- 3 : day 29
- 4 : day 43 (寛解導入療法終了時)
- 5 : 早期強化療法後 (week 12 相当)

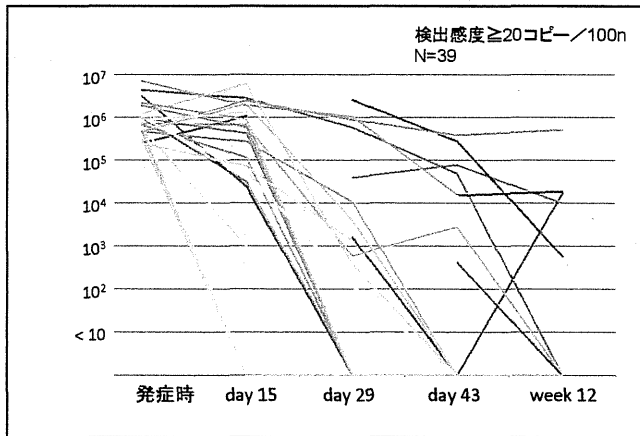


図4 *BCR-ABL* コピー数 ( /100ng RNA) の推移

- 1 : 発症時骨髓
- 2 : day 15
- 3 : day 29
- 4 : day 43 (寛解導入療法終了時)
- 5 : 早期強化療法後 (week 12 相当)

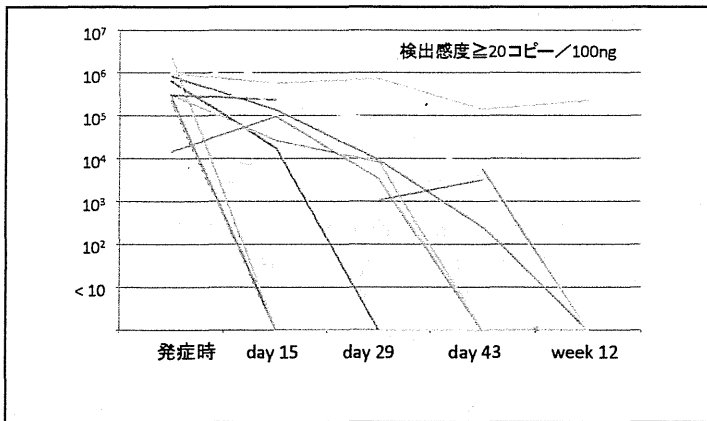


図5 *MLL-AF4* 他 *MLL* 関連キメラコピー数 ( /100ng RNA) の推移 N=21

- 1 : 発症時骨髄
- 2 : day 15
- 3 : day 29
- 4 : day 43 (寛解導入療法終了時)
- 5 : 早期強化療法後 (week 12 相当)

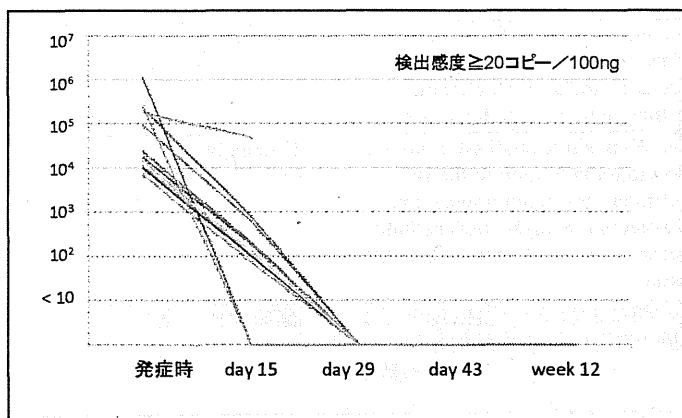


図6 *SIL-TAL1* コピー数 ( /100ng RNA) の推移

N=13

- 1 : 発症時骨髄
- 2 : day 15
- 3 : day 29
- 4 : day 43 (寛解導入療法終了時)
- 5 : 早期強化療法後 (week 12 相当)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	42(12)	3405-15.	2012
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.	1820(11)	1715-23.	2012
Yamada H, Iijima K, Tomita O, Taguchi T, Miharu M, Kobayashi K, Okita H, Saito M, Shimizu T, Kiyokawa N.	Effects of insulin-like growth factor-1 on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.	Int J Hematol	97(1)	73-82	2013
Nemoto A, Inukai T, Uno K, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Takahashi K, Sato H, Akahane K, Hirose K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Nakazawa S, Fujimoto J, Inaba T, Sugita K.	Diverse underlying proliferation response to growth factors in imatinib-treated Philadelphia chromosome-positive leukemias.	Leuk Res.	37(1)	93-101	2013
Kato M, Yasui N, Seki M, Kishimoto H, Sato-Otsubo A, Hasegawa D, Kiyokawa N, Hanada R, Ogawa S, Manabe A, Takita J, Koh K.	Aggressive Transformation of Juvenile Myelomonocytic Leukemia Associated with Duplication of Oncogenic KRAS due to Acquired	J Pediatr.	in press		
Oschlies I, Lisfeld J, Lamant L, Nakazawa A, D' Amore E, Hansson U, Hebeda K, Simonisch-Klupp I, Maldyk 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.	in press		
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	53	443-450	2012
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
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

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, Kornblau 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
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
Doisaki 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	485-1488	2012
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
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
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
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
Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanezaki 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
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
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
Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S.	A aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma.	Oncogene.	31	4667-4676	2012

Tsurusawa M, Hori T.	Measurement of minimal residual disease and its implication.	日本臨床	70 Suppl 2	731-6	2012
Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirose 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
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
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
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
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
Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H.	Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS).	Annals of hematology	92	1月9日	2013
Ogawa S.	Splicing factor mutations in myelodysplasia.	International journal of hematology	96	438-42	2012
Nowak D, Klaumuenzer M, Hanfstein B, Mossner M, Nolte F, Nowak V, Oblaender J, Hecht A, Hutter G, Ogawa S, Kohlmann A, Haferlach C, Schlegelberger B, Braess J, Seifarth W, Fabarius A, Erben P, Saussele S, Muller MC, Reiter A, Buechner T, Weiss C, Hofmann WK, Lengfelder E.	SNP array analysis of acute promyelocytic leukemia may be of prognostic relevance and identifies a potential high risk group with recurrent deletions on chromosomal subband 1q31.3.	Genes Chromosomes Cancer	51	756-67	2012.
Nomoto J, Hiramoto N, Kato M, Sanada M, Maeshima AM, Taniguchi H, Hosoda F, Asakura Y, Munakata W, Sekiguchi N, Maruyama D, Watanabe T, Nakagama H, Takeuchi K, Tobinai K, Ogawa S, Kobayashi Y.	Deletion of the TNFAIP3/A20 gene detected by FICTION analysis in classical Hodgkin lymphoma.	BMC Cancer	12	457	2012
Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S, Koeffler HP, Kern W, Haferlach C, Schnittger S.	SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML).	Blood	120	Aug-80	2012
Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I.	Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia.	Blood	119	2376-84	2012



Koren-Michowitz M, Sato-Otsubo A, Nagler A, Haferlach T, Ogawa S, Koeffler HP.	Older patients with normal karyotype acute myeloid leukemia have a higher rate of genomic changes compared to young patients as determined by SNP array analysis.	Leuk Res	36	467-473	2012
Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe SI, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T.	KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma.	Nat Med	18	375-7	2012
Kamada Y, Sakata-Yanagimoto M, Sanada M, Sato-Otsubo A, Enami T, Suzukawa K, Kurita N, Nishikii H, Yokoyama Y, Okoshi Y, Hasegawa Y, Ogawa S, Chiba S.	Identification of unbalanced genome copy number abnormalities in patients with multiple myeloma by single-nucleotide polymorphism genotyping microarray analysis.	International journal of hematology	96	492-500	2012
Iwakawa R, Okayama H, Kohno T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J.	Contribution of germline mutations to PARK2 gene inactivation in lung adenocarcinoma.	Genes Chromosomes Cancer	51	462-72,	2012
Hosokawa K, Katagiri T, Sugimori N, Ishiyama K, Sasaki Y, Seiki Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S, Nakao S.	Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS-U' designation.	Haematologica	97	1845-9	2012
Hirabayashi S, Flotho C, Moetter J, Heuser M, Hasle H, Gruhn B, Klingebiel T, Thol F, Schlegelberger B, Baumann I, Strahm B, Stary J, Locatelli F, Zecca M, Bergstraesser E, Dworzak M, van den Heuvel-Eibrink MM, De Moerloose B, Ogawa S, Niemeyer CM, Wlodarski MW.	Spliceosomal gene aberrations are rare, coexist with oncogenic mutations, and are unlikely to exert a driver effect in childhood MDS and JMML.	Blood	119	e96-9	2012
Sanada M, Ogawa S.	Genome-wide analysis of myelodysplastic syndromes.	Curr Pharm Des.	18	Sep-63	2012
Yoshida K, Sanada M, Ogawa S.	Deep Sequencing in Cancer Research.	Jpn J Clin Oncol.	in press.		2012
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	in press.		2012
Sugimoto T, Gotoh T, Yagyu S, Kuroda H, Iehara T, Hosoi H, Ohta S, Ohira M, Nakagawara A.	A MYCN-amplified cell line derived from a long-term event-free survivor among our sixteen established neuroblastoma cell lines.	Cancer Lett	331	115-21	2013
Chand D, Yamazaki Y, Ruuth K, Schönherr C, Martinsson T, Kogner P, Attiyeh EF, Maris J, Morozova O, Marra MA, Ohira M, Nakagawara A, Sandström PE, Palmer R, Hallberg B.	Cell and Drosophila model system define three classes of ALK mutations in neuroblastoma.	Dis. Model Mech	in press.		2012
Shum CKY, Lau ST, Tsoi LLS, Chan LK, Yam JWP, Ohira M, Nakagawara A, Tam PKH, Ngan ESW.	Kruppel-Like Factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage differentiation.	Oncogene	in press		2012
Hashizume O, Shimizu A, Yokota M, Sugiyama A, Nakada K, Miyoshi H, Itami M, Ohira M, Nagase H, Takenaga K, Havashi J.	Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development.	Proc. Natl. Acad. Sci.	109(26)	10528-33	2012.
Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A.	ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity.	Lung Cancer	75(1)	66-72	2012.

# ZNF385B is characteristically expressed in germinal center B cells and involved in B-cell apoptosis

Kazutoshi Iijima<sup>1</sup>, Hiroyuki Yamada<sup>1</sup>, Masashi Miharū<sup>1</sup>,  
Ken-Ichi Imadome<sup>2</sup>, Yoshitaka Miyagawa<sup>1,3</sup>, Shingo Akimoto<sup>1</sup>,  
Kenichiro Kobayashi<sup>1</sup>, Hajime Okita<sup>1</sup>, Atsuko Nakazawa<sup>4</sup>,  
Shigeyoshi Fujiwara<sup>2</sup>, Junichiro Fujimoto<sup>5</sup> and Nobutaka Kiyokawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatric Hematology and Oncology Research, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

<sup>2</sup> Department of Infectious Diseases, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

<sup>3</sup> Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

<sup>4</sup> Department of Pathology, National Medical Center for Children and Mothers, Tokyo, Japan

<sup>5</sup> Director of Clinical Research Center, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

We previously identified zinc finger (ZF) protein ZNF385B as a molecule specifically expressed in Burkitt's lymphoma (BL) among hematologic malignancies. Here, we investigated ZNF385B expression in healthy B cells in a variety of hematological tissues by RT-PCR and immunohistochemistry. ZNF385B expression was found to be limited to a subset of GC B cells, the healthy counterpart to BL B cells. To elucidate the function of ZNF385B in healthy B cells, we established a tetracycline-controlled protein-inducible system in B-cell lines and observed that ectopic expression of the longest transcript variant of ZNF385B, possessing four ZF domains, induced upregulation of PERP and FAS/CD95, a downstream target of p53, and activation of caspase, resulting in apoptosis induction. However, a ZNF385B deletion mutant with three ZF domains corresponding to shorter isoforms, did not induce upregulation; rather it inhibited apoptosis induced by CD20 cross-linking and BCR stimulation. The direct binding of ZNF385B with p53 has suggested the involvement of ZNF385B in B-cell apoptosis via modulation of p53 transactivation; our data indicate that ZNF385B characteristically expressed in GC B cells has both proapoptotic and antiapoptotic activities depending on the type of isoform and should be a novel player in GC B-cell selection.

**Keywords:** Apoptosis · B-cell development · Cell survival · DNA repair mechanisms · Lymphoid organs



Supporting Information available online

## Introduction

The essential role of GCs within peripheral lymphoid organs is to produce high-affinity Ab-secreting B cells against foreign antigens, although the process of Ab affinity maturation also poses

Correspondence: Dr. Nobutaka Kiyokawa  
e-mail: nkiyokawa@nch.go.jp

a significant risk of generating unintended autoreactive clones and oncogenic mutations [1]. Therefore, B cells have integrated control systems to expand high-affinity clones against exogenous antigens and eliminate inappropriate clones in a developmental stage-dependent manner [2]. In addition to the BCR, which plays a crucial role in clonal selection and clonal expansion [3], the involvement of a number of molecules in this regulatory system has been identified, although the details have yet to be fully clarified.

B-cell malignancies are thought to be related to B cells at specific developmental stages and retain, at least in a part, the characteristics of their healthy counterparts; therefore, it may be useful to investigate the molecular characteristics of B-cell development [4]. For example, sporadic form of Burkitt's lymphoma (BL) has been postulated to originate from early centroblasts in the GC and exhibits some of their features [5–8].

In the process of investigating the molecules specifically expressed in childhood B-cell malignancies, we preliminarily identified *ZNF385B* as a BL-specific gene. *ZNF385B*, also called *ZNF533*, is supposed to be a protein that possesses zinc-finger (ZF) domains. Notably, *ZNF385B* was expressed only in BL cells among hematopoietic malignancies and not expressed even in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), another B-cell malignancy originating from GC B cells.

To date, three isoforms of *ZNF385B* have been identified and isoform (IF)-1 is the longest transcript variant, possessing four ZF domains, while IF-2/3 are shorter transcript variants with three ZF domains. Although *ZNF385A*, also called the hematopoietic zinc finger, consisting of three ZF domains [9] and having high homology with *ZNF385B* IF-2/3, is known to be involved in apoptotic regulation [10], the function and biological significance of *ZNF385B* have not been clarified thus far. Considering the specific expression of *ZNF385B* in GC-derived BL cells, and that GC B cells possess developmental stage-dependent mechanisms of cell proliferation and death, *ZNF385B* might be involved in the apoptotic regulation in GC B cells.

Therefore, we attempted to elucidate the functional role of *ZNF385B* in B cells using a tetracycline-controlled protein-inducible system. In the present study, we demonstrate that *ZNF385B* is characteristically expressed in a subset of GC B cells and involved in B-cell apoptosis. The molecular basis of *ZNF385B* function in apoptotic regulation has been further investigated.

## Results

### Expression of *ZNF385B* in BL cell lines and GC B cells

In an attempt to characterize the molecules that are specifically expressed in BL in comparison with those in other pediatric lymphoid malignancies, we screened genes by employing a microarray system using clinical materials and identified several candidates. Among the genes selected, we preliminarily observed that *ZNF385B* was expressed in the vast majority of BL cases, but not in cases of DLBCL, B-cell precursor, and T acute lymphoblastic

leukemia (data not shown). We therefore examined the expression of *ZNF385B* in hematologic malignancy cell lines. As shown in Fig. 1A, RT-PCR analysis revealed that *ZNF385B* was expressed in all nine cell lines of BL, but not in other types of leukemia/lymphoma cell lines, including DLBCL, B-cell precursor and T acute lymphoblastic leukemia, hairy cell leukemia, and multiple myeloma.

As described above, BL has been postulated to originate from early centroblasts in GCs. Thus we examined whether *ZNF385B* is expressed in GC B cells or not. When we tested the expression of *ZNF385B* in healthy human hematopoietic tissues in which B cells are contained by RT-PCR, *ZNF385B* was found to be expressed in spleen, lymph node (Fig. 1B), and tonsil (data not shown) but not in bone marrow and peripheral blood leukocytes. We further confirmed the expression of *ZNF385B* in purified human CD20<sup>+</sup> B cells derived from spleen (Fig. 1B). In contrast, *ZNF385A*, having high homology with *ZNF385B* IF-2/3, was not expressed in peripheral lymphoid organs (data not shown).

We also investigated the expression of *ZNF385B* isoforms in BL cell lines and healthy human lymphoid tissues by real-time PCR and observed that each isoform was expressed variably in each tissue or cell line. As shown in Fig. 1C, although healthy lymphoid tissue mainly expressed IF-2/3, some BL cell lines predominantly expressed IF-1.

We next examined the protein expression of *ZNF385B* in peripheral lymphoid organs. As shown in Fig. 1D, immunohistochemical analysis of lymph nodes clearly indicated that the *ZNF385B*-positive cells were limited to the germinal center. Together with the results of dual staining with anti-*ZNF385B* and anti-CD20, it was indicated that a subset of GC B cells expressed *ZNF385B* (Fig. 1E).

Therefore, we intended to characterize further a subset of GC B cells expressing *ZNF385B*. Upon using the online available raw gene expression data of tonsil B cells separated by means of CXCR4 expression [11] (submitted by Caron G. et al., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE15271>), we found that CXCR4<sup>+</sup> tonsil B cells expressed *ZNF385B*, whereas CXCR4<sup>-</sup> tonsil B cells did not (Supporting Information Fig. 1). In addition, we observed that only a proportion of *ZNF385B*-positive cells possess activated caspase-3 by immunohistochemical dual staining with anti-*ZNF385B* and anti-cleaved caspase-3 (Fig. 1F).

We also examined the expression of BCL6 and p53 in peripheral lymphoid organs. As shown in Fig. 1G, the BCL6-positive cells were limited to GC, while p53-positive cells were presented in both inside and outside of GC.

### Effect of *ZNF385B* expressed in B-cell lines

We next examined the function of *ZNF385B*. Since all BL cell lines that we tested were found to express *ZNF385B*, we established a tetracycline-dependent protein-inducible system for both *ZNF385B* IF-1 and *ZNF385B* IF-1/DEL (Fig. 2A) in BJAB cells that lack *ZNF385B*. As presented in Fig. 2A, *ZNF385B* IF-1 is

