

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 (conventional neuroblastoma) 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。

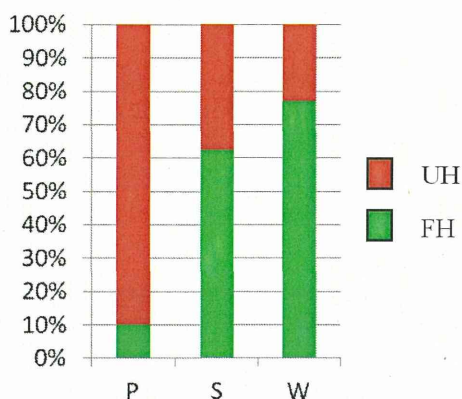
(倫理面への配慮)

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。

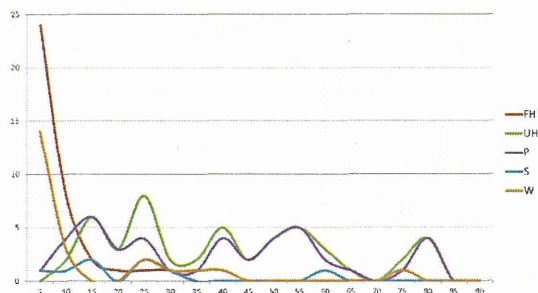
C. 研究結果

1. ゲノム分類と INPC 分類

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。



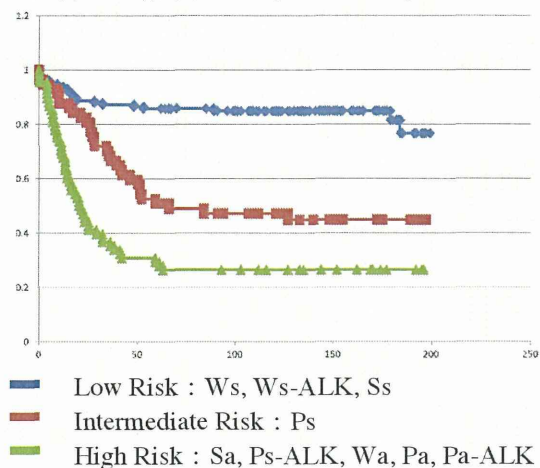
平均発症月齢は、P 群 48 ヶ月、S 群 21 ヶ月、W 群 9 ヶ月で、P 群と W 群との間で有意差を認めた。発症月齢について、UH、FH、P 群、W 群、S 群についてグラフに表すと、P 群は UH と、W 群は FH とほぼ一致した形状のカーブを描いた。



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。

2. ゲノム分類によるリスク群の振り分け
生存率からは、Low risk 群 (Ws, Ws-ALK, Ss)、Intermediate risk 群 (Ps)、High risk 群 (Sa, Ps-ALK, Wa, Pa, Pa-ALK) の 3 群に振り分けられた。Low risk 群の生存率は 76.7%、Intermediate risk 群の生存率は 44.6%、High risk 群の生存率は 26.5%であった。

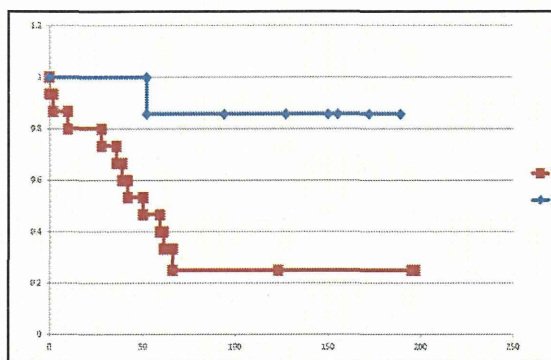


High Risk 群と Low risk 群、Low risk 群と Intermediate 群 ($p < 0.001$)、Intermediate 群と High Risk 群 ($p < 0.005$) の生存率には有意差が認められた。ゲノム分類によるリスク群は、MYCN 遺伝子増幅とは独立した予後因子になると考えられた。

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 ($p < 0.005$)。Ps (23 例)中、FH は 5 例 (22%)、UH は 18 例 (78%) を占めた。FH の生存率は 80%、UH の生存率は 35%と

FH 群が予後良好であった (P=0.097)。

Ps 群の亜分類



3. ゲノム分類と病理組織像

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により、その生存率は平均 70%に達している。それぞれの腫瘍の生物学的特徴に基づいた治療の層別化という治療戦略は、治療成績の向上だけでなく、治療合併症の軽減という意味でも重要である。神経芽腫においては、年齢、臨床病期、*MYCN* 増幅、INPC 国際病理分類により、治療の層別化が行われている。INPC 分類は、FH と UH の 2 つの予後グルー

プを区別し、FH は自然退縮や分化・成熟を示し、*MYCN* 増幅のない群である。一方 UH には *MYCN* 増幅腫瘍と *MYCN* 増幅のない腫瘍が含まれており、UH で *MYCN* 増幅のない群についてのさらなる予後因子の解析が今後の課題である。本研究では、ゲノム分類と INPC 分類との関連を明らかにすることができた。すなわち、W 群と FH は年齢分布が一致し、1.5 歳未満に多く、*MYCN* 増幅のみ見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) Yamazaki F, Nakazawa A, Osumi T, Shimojima N, Tanaka T, Nakagawara A, Shimada H. Two cases of neuroblastoma comprising two distinct clones. *Pediatr Blood Cancer*. 2014, 61:760-762

2. 学会発表

1) Ohira M, Kamijo T, Nakamura Y, Matsumoto K, Kumagai M, Nakazawa A, Takimoto T, Fukushima T, Tajiri T, Ikeda H, Nakagawara A. Risk Classification of Neuroblastoma Based on Genomic

Profiles: For Future Tailor-Made Therapeutic Strategies in Japan. 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, 2013.9.27.

2) 山口陽子, 竹信尚典, 大平美紀, 中澤温子, 吉田早哉香, 秋田直洋, 下里修, 岩間厚志, 中川原章, 上條岳彦: MYCN/ATM/p53経路を制御する新規がん制御遺伝子DMA P 1. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10.4

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、後方視的に収集した検体、T-NHL 4例とB-NHL 6例の、遺伝子発現プロファイルを解析した。T-NHLのうち、Early T-cell precursor (ETP)様の表面形質を有する症例は、ETP-ALLと類似した遺伝子発現プロファイルを示した。Burkitt型のB-NHL 6例では、本研究で明らかにしたBurkittに特異的に発現するZNF384がいずれも高発現していた。今後、さらに症例数を増やして、分子解析を進める。

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、治療成績の向上に貢献することを目標とする。今年度は、既登録症例について、詳細な細胞マーカー検査の実施状況、利用可能な余剰検体の保管状況の調査と試料の収集を行い、解析可能な試料について発現遺伝子解析に着手した。

B. 研究方法

1. 対象

JPLSG リンパ腫臨床研究に登録された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)の中から、T-NHL 4例とB-NHL 6例の検体を用いた。

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. T-NHL の遺伝子発現プロファイル解析：
T-NHL のうち 2 例は、Early T-cell precursor (ETP-) ALL 様の表面形質を示していた。ETP-ALL は、発現遺伝子プロファイリングによって近年同定された T-lineage ALL の亜群で、特徴的なマーカー蛋白の発現、すなわち CD8 陰性 CD1a 陰性 CD5 陰性～弱陽性かつ幹細胞/骨髄系抗原陽性という特徴によって区別可能であり、極めて予後不良な一群として報告されていることから、本邦の ALL 治療プロトコ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。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結果、ETP 様の NHL は ETP-ALL と同じクラスターに分類され、同様の遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかとなった。ETP-NHL/ALL 群では *HOXA13*, *HOXC6*, *HOXA4* 等の *HOX* 遺伝子群、*BCL2*, *TGFB1*, *LMO2*, *CD244* 等の発現が高く、*CD28*, *CD5*, *CD2*, *IL4* 等の発現が低いという特徴が認められた。

2. B-NHL の遺伝子発現プロファイル解析：
B-NHL 6 例は、いずれも Burkitt 型であった。昨年度までに本研究で解析を行なった B-DLBCL や BCP-ALL の解析結果をコントロールとして用いて遺伝子発現プロファイルを解析した結果、これらの症例において、本研究で明らかにした Burkitt に特異的に発現する *ZNF384* がいずれも高発現していることが示された。

D. 考察

今回の検討結果から、ETP-ALL と類似した形質を示す NHL 症例が、ETP-ALL と同様の発現プロファイルを示すこと、B-NHL では *ZNF384* の発現が特徴的であることが確認された。

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、分子プロファイリング解析を開始した。今後、過去に登録された症例と、前向きに蓄積される症例の解析を順次進め、本邦の NHL 症例の分子プロファイルを明らかにして行く。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Attarbaschi A, Beishuizen A, Mann G, Rosolen A,

Mori T, Uyttebroeck A, Niggli F, Csoka M, Krenova Z, Mellgren K, Kabickova E, Chiang AK, Reiter A, Williams D, Burkhardt B; on behalf of the European Intergroup for Childhood Non-Hodgkin Lymphoma (EICNHL) and the international Berlin-Frankfurt-Münster (i-BFM) Study Group. Children and adolescents with follicular lymphoma have an excellent prognosis with either limited chemotherapy or with a "watch and wait" strategy after complete resection. *Annals of Hematology* 2013; 92: 1537-41. doi: 10.1007/s00277-013-1785-2.

2) Williams D, Mori T, Reiter A, Woessman W, Rosolen A, Wrobel G, Zsiros J, Uyttebroeck A, Marky I, Le Deley MC, Brugières L; for the European Intergroup for Childhood Non-Hodgkin Lymphoma, the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Central nervous system involvement in anaplastic large cell lymphoma in childhood: Results from a multicentre European and Japanese study. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60: E118-21. doi: 10.1002/pbc.24591.

3) Masuzawa A, Kiyotani C, Osumi T, Shioda Y, Iijima K, Tomita O, Nakabayashi K, Oboki K, Yasuda K, Sakamoto H, Ichikawa H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Mori T.

Poor responses to tyrosine kinase inhibitors in a child with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with SNX2-ABL1 chimeric transcript. *Eur J Haematol.* 2013. doi: 10.1111/ejh.12234. [Epub ahead of print].

4) 森 鉄也、深野玲司、齋藤明子、瀧本哲也、関水匡大、中澤温子、鶴澤正仁、小林良二、堀部敬三. 小児未分化大細胞型リンパ腫に対する国際臨床試験 ALCL99-R1 国内登録例の集計と国際臨床試験の結果と比較. *臨床血液 in press* (第 55 巻 5 号掲載予定) .

5) 大隅 朋生, 森 鉄也. 小児のリンパ腫. 直江知樹, 堀部敬三監修, チーム医療のための血液がんの標準的化学療法, *メディカル・サイエンス・インターナショナル*, 東京, 2013: 387-393.

6) 大隅 朋生, 森 鉄也. リンパ性白血病診療の現状と展望, *小児急性リンパ性白血病の診療の現状と展望. 血液内科* 2013, 66, 131-137.

7) 森 鉄也. いつどのようにしてその治療を打ち切るか -エキスパートに聞く- リンパ腫. *小児科* 2013, 54, 727-732.

2. 学会発表

1) 森 鉄也. 教育セッション：小児リンパ腫の治療, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11 月 29 日-12 月 1 日, 2013.

2) 大隅 朋生, 三春 晶嗣, 増澤 亜紀, 山崎 文登, 弦間 友紀, 宇野 光昭, 塩田 曜子, 寺島 慶太, 清谷 知賀子, 木澤 洋恵, 吉村 稔, 中澤 温子, 福島 敬, 松本 公一, 清河 信敬, 森 鉄也. 小児白血病に対するフローサイトメトリーを用いた MRD 検出の試み. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11 月 29 日-12 月 1 日, 2013.

3) 富田 理, 飯島 一智, 石橋 武士, 増澤 亜紀, 大隅 朋生, 齋藤 正博, 森 鉄也, 清水 俊明, 清河 信敬. BCP-ALL の新規キメラ分子 SNX2-ABL1 の機能解析とチロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性についての検討. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11 月 29 日-12 月 1 日, 2013.

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： 小児の腎腫瘍のメチル化解析を行い RASSF1A に着目して解析を進めたところ、腎横紋筋肉腫様腫瘍、腎明細胞肉腫では、高メチル化を示し、間葉芽腎腫では、低メチル化を示し組織型により特徴的パターンを示した。さらに *THBS1* と *RASSF1A* 遺伝子のメチル化解析を併用することで、3つの組織型が鑑別可能であることを示した。RASSF1A は癌抑制遺伝子であり、腎横紋筋肉腫様腫瘍において RASSF1A が DNA メチル化により転写抑制されていることが示唆されており、病態との関連について更に検討中である。

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

B. 研究方法

小児腎腫瘍組織（腎芽腫 24例、腎明細胞肉腫 10例、腎ラブドイド腫瘍 10例、間葉芽腎腫 9例）より、常法に従って DNA を抽出、バイサルファイト変換後、Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法、パイロシークエンス法によって、DNA メチル化状態を検討した。*RASSF1A* 遺伝子のプロモーター領域の CpG island のメチル化状態はパイロシークエンス (QIAGEN)にて解析した。シークエンス領域内に含まれる4か所の CpG 部位のメチル化率の平均を算出し、非腫瘍部腎組織の平均と比較した。*PLCB2* 遺伝子のプロモーター領域の CpG island は COBRA 法にて解析した。ゲノム DNA をバイサルファイト変換後、メチル化 DNA および非メチル化 DNA に共通のプライマーを用いて *PLCB2* プロモーターの CpG アイランド領域の一部を PCR 法にて増幅し、メチル化 DNA のみ切断する *HpyCH4IV* で PCR 産物を消化し電気泳動を行った。

腎横紋筋肉腫細胞株 G401 にプラスミドベクターを用いて *RASSF1A* を導入・強制発現させ、ウェスタンブロット、免疫染色にて発現を確認した。Click-iT EdU Flow Cytometry Assay kit を用い細胞周期を解析した。

（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

前年度までのメチル化解析において腎横紋筋肉腫様腫瘍において、極めて高メチル化率をし、非腫瘍部腎組織で低メチル化 (β 値 <0.1) を示し、かつ、腎ラブドイド腫瘍で発現が低下している遺伝子として、RASSF1A を抽出している。今年度は、小児腎腫瘍における RASSF1A プロモーター領域のメチル化解析を行ない、RASSF1A のメチル化パターンが鑑別診断マーカーとなりうるかどうか検討した。パイロシークエンス法にて解析し、解析領域に含まれる 4 か所の CpG 部位のメチル化率の平均を非腫瘍部腎組織 12 検体と比較した。メチル化率は、腎横紋筋肉腫様腫瘍は 20~80%、腎明細胞肉腫は 40~90%、間葉芽腎腫は 0~5%、腎芽腫は 5~90%で、ばらつきがあるものの、いずれも非腫瘍部と比較して有意に高メチル化あるいは低メチル化を示した。非腫瘍部と同程度のメチル化を示したのは、腎芽腫の一部のみであった。この結果、腎横紋筋肉腫様腫瘍と腎明細胞肉腫は、RASSF1A プロモーターのメチル化率のみで間葉芽腎腫と区別可能であった。一方、間葉芽腎腫は RASSF1A のメチル化のみで、腎横紋筋肉腫、腎明細胞肉腫、腎芽腫、非腫瘍部と区別することが可能であった。

これらと過去に報告した *THBS-1* のメチル化による腎明細胞肉腫の鑑別法を併用すると、腎横紋筋肉腫様腫瘍、腎明細胞肉腫と間葉芽腎腫を明確に分類することが可能であった。

横紋筋肉腫様腫瘍の細胞株に RASSF1A を導入し強制発現させ、増殖率、細胞周期について検討したところ、増殖率や細胞周期に有意な変化はみられなかった。RASSF1A は DNA メチル化により転写抑制されていることが示唆されており、病態との関連を、引き続き解析する。

次に、間葉芽腎腫での低メチル化が示唆された *PLCB2* プロモーターの CpG アイランド領域の一部を COBRA 法で解析した。その結果、間葉芽腎腫では、全例で低メチル化であるが、他の 3 組織型では高メチル化を示した。*PLCB2* の低メチル化が間葉芽腎腫を他の小児腎腫瘍から鑑別するマーカーとなりうることを示唆された。しなしながら、間葉芽腎腫の亜型間では同様の *PLCB2* のメチル化パターンを示した。

D. 考察

腎横紋筋肉腫様腫瘍では、腫瘍における SMARCB1 の不活性化が特徴的で腫瘍発生に

関わっているとされている。一方、腎明細胞肉腫は遺伝子異常がほとんど明らかにならず、腫瘍発生の機序や発生母地がほとんど不明である。間葉芽腎腫の一部では、融合遺伝子が腫瘍発生に関連すると考えられているが、他は腫瘍発生機序はほとんど分かっていない。それぞれの腫瘍はそれぞれに特有のメチル化パターンを示しており、多数の遺伝子のメチル化解析により、小児腎腫瘍の鑑別診断に応用しうると考えられる。特に腫瘍に特異性の高いメチル化変化があり、*THBS1*、*RASSF1A* といった少数の遺伝子の組み合わせにより、比較的安価に、まれ、かつ、診断の難しい腫瘍の診断の補助となることが期待される。

小児腎腫瘍の DNA メチル化のパターンに基づく鑑別診断法開発については、新規診断法として臨床応用を目指すとともに、癌抑制遺伝子 RASSF1A と腎横紋筋肉腫様腫瘍の病態との関係について解析を進め、治療法開発への応用の可能性について検討を進めていきたい。また、今後は、腎芽腫のような分子遺伝学的に明らかに多様性のある腫瘍においてメチル化パターンが予後を予測する因子になるかどうか解析をすすめる必要がある。

E. 結論

RASSF1A プロモーター領域のメチル化解析を行ない、間葉芽腎腫は低メチル化であるのに対し、腎横紋筋肉腫様腫瘍、腎明細胞肉腫は高メチル化であることが明らかとなった。*THBS1* と *RASSF1A* 遺伝子のメチル化解析を併用することで、腎横紋筋肉腫様腫瘍、腎明細胞肉腫、間葉芽腎腫の 3 つの病型が鑑別可能であった。RASSF1A は癌抑制遺伝子であり、病態との関連について更に検討中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueno H, Okita H, Akimoto S, Kobayashi K, Nakabayashi K, Hata K, Fujimoto J, Hata J, Fukuzawa M, Kiyokawa N. DNA methylation profile distinguishes clear cell sarcoma of the kidney from other pediatric renal tumors. *PLoS One*. 2013;8(4):e62233.
- 2) Tomita O, Iijima K, Ishibashi T, Osumi T, Kobayashi K, Okita H, Saito M, Mori T, Shimizu T, Kiyokawa N. Sensitivity of SNX2-ABL1 toward tyrosine kinase inhibitors distinct from that of BCR-ABL1. *Leuk Res*. 2013 Dec 1. [Epub ahead of print]
- 3) Kiyokawa N, Iijima K, Tomita O, Miharuru M, Hasegawa D, Kobayashi K, Okita H, Kajiwara M, Shimada H, Inukai T, Makimoto A, Fukushima T,

Nanmoku T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Sugita K, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2014 Jan;38(1):42-8.

4) Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T.. Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells.. *BMC Genet.* 2013;14:32.

5) Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013 Jul, in press

6) Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome KI, Inoue N, Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae.* 2013;4(1):2

7) Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 23):5391-9.

8) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S. An Efficient Method for Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells Retaining Drug Metabolizing Activity. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013 Dec 10. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) Iijima K, Hasegawa D, Kiyokawa N, Kobayashi K, Okita H, Mori T, Fukushima T, Saito M, Koh K, Hanada R, Tsuchida M, Manabe A, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Low expression of tumor suppressor genes were related to poor outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia without fusion genes. Ninth AACR/JCA Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. February 21-25, 2013. Hyatt Regency Maui. Maui, HI

2) 山崎茂樹, 内田清乃, 柿島裕樹, 大喜多肇,

3) 松岡健太郎, 中澤温子. 小児肝ラブドイド腫瘍の2例. 第54回日本臨床細胞学会総会, 東京, 5月31日~6月2日, 2013

4) 上野瞳, 大喜多肇, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. 腎ラブドイド腫瘍における RASSF1A promoter の DNA hypermethylation. 第102回日本病理学会総会, 札幌, 6月6日~8日, 2013

5) Okita H, Nakazawa A., Tanaka Y., Hojo H, Okamatsu C., Takimoto T., Kamijo T., Fukushima T., Tajiri T., Ikeda H, Nakagawara A.. Composite Neuroblastoma with Histologically and Biologically Distinct Components: A Report from Japan Neuroblastoma Study Group (JNBSG). 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, China, September 25th-28th, 2013

6) Kaneko Y., Okita H, Haruta M., Tanaka Y., Horie H., Hinotsu S., Koshinaga T., Fukuzawa M.. GENETIC AND PATHOLOGICAL ANALYSES OF BILATERAL OR FAMILIAL WILMS TUMORS INDICATE THE INHERITANCE MODE OF WT1 GERMLINE MUTATION AND RESPONSE TO CHEMOTHERAPY. 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, China, September 25th-28th, 2013

7) Oue T., Okita H., Horie H., Saito M., Nozaki M., Nakadate N., Chin M., Hinotsu S., Koshinaga T., Kaneko Y., Tanaka Y., Fukuzawa M.. BILATERAL WILMS' TUMORS TREATED ACCORDING TO THE JAPANESE WILMS TUMOR STUDY GROUP PROTOCOL. 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, China, September 25th-28th, 2013

8) 大喜多肇. 小児腎腫瘍の組織像と遺伝子異常. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11月29日~12月1日, 2013

9) 酒井愛子, 小林千恵, 加藤啓輔, 鈴木涼子, 福島紘子, 福島敬, 神保教広, 増本幸二, 里見介史, 野口雅之, 大喜多肇, 森健作, 南学, 石川仁, 櫻井英幸, 須磨崎亮. 学校検尿を契機に診断され分子標的治療を施行中の Xp11 転座腎癌の12歳女児例. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11月29日~12月1日, 2013

10) 大木健太郎, 朴明子, 原勇介, 柴徳生, 大喜多肇, 小林健一郎, 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. 小児 B 前駆細胞型 ALL における EBF1-PDGFRB 融合遺伝子の解析: T CCSG-ALL 研究. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11月29日~12月1日, 2013

11) 上野瞳, 大喜多肇, 中林一彦, 泰健一郎, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬. 小児腎腫瘍における DNA メチル化解析. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11月29日~12月1日, 2013

12) 久保川育子, 西田浩輔, 平瀬敏志, 山本暢之, 森健, 早川晶, 江尻浩隆, 西井達也, 藤原周一, 大西康央, 原仁美, 河本旭哉, 秋末敏宏, 大谷恭子, 酒井康裕, 原重雄, 廣瀬隆則, 伊藤智雄, 大喜多肇, 飯島一誠. 初診時に血管腫と鑑別を要した右下腿原発乳児線維肉腫の新生児例. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11月29日~12月1日, 2013

13) 北側孝雄, 大喜多肇, 星田尚司, 赤田倫治, 中村和行. 酵母を用いた Ewing 肉腫癌遺伝子の変異探索. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 3 日~6 日, 2013

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。非 Down 症候群の急性巨核芽球性白血病 (non-DS-AMKL) は既知の融合遺伝子として t(1;22) の *OTT-MAL* や 11q23 転座の *MLL* 融合遺伝子が報告されている。近年、次世代シーケンサーを用いた RNA sequence 等により *CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-JARID1A* 等の新規融合遺伝子が報告された。今年度は小児の急性骨髄性白血病 (AML) の AML99 および AML-05 研究に登録された non-DS-AMKL の 43 例で *CBFA2T3-GLIS2*、*NUP98-JARID1A*、*OTT-MAL*、*MLL-AF9*、*MLL-AF10* 融合遺伝子の検索を行った。*CBFA2T3-GLIS2* を 12 例 (27.9%)、*NUP98-JARID1A* を 4 例 (9.3%)、*OTT-MAL* を 10 例 (23.6%)、*MLL-AF9* を 2 例 (4.7%)、*MLL-AF10* を 1 例 (2.3%) で認め、臨床像の検討では、*CBFA23-GLIS2*、*NUP98-JARID1A* は予後不良、*OTT-MAL* は予後良好であることが示唆された。他の遺伝子変異の検索では、これらの融合遺伝子を有する症例で *FLT3-ITD*、*KIT*、*RAS*、*WT1* の各変異と *MLL-PTD* は比較的稀であった。

さらに AML19 例で次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、*RAD21* や *STAG2* などのコーヒシン関連遺伝子や *BCOR/BCORL1* などの新規の原因遺伝子変異を同定した。これまでの既知の知られた遺伝子についても target deep sequencing を行っているところである。

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 *FLT3*、*KIT*、*MLL*、*RAS*、*NPM1*、*CEBPA*、*WT1* 遺伝子異常と予後との相関を明らかにしてきた。

非 Down 症候群の急性巨核芽球性白血病 (non-DS-AMKL) は既知の融合遺伝子として t(1;22) の *OTT-MAL* や 11q23 転座の *MLL* 融合遺伝子があるが、近年、次世代シーケンサーを用いた RNA sequence 等により *CBFA2T3-*

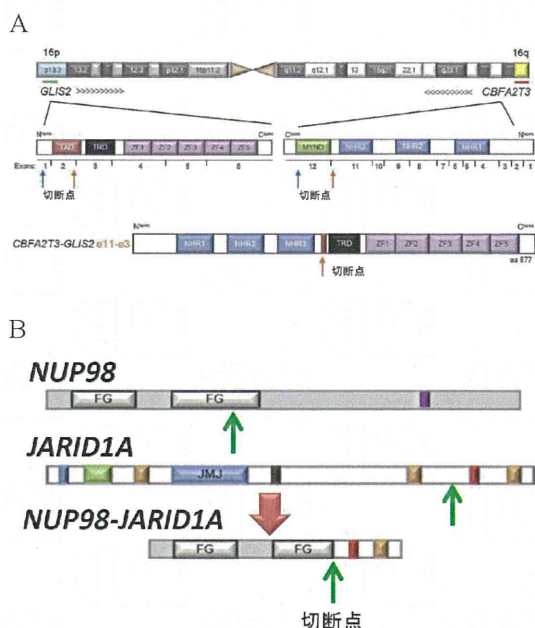


図1 新規融合蛋白模式図 (Gruber et al. Cancer Cell 2012)

A: inv(16)(p13.3q24.3)/*CBFA2T3-GLIS2*

B: t(11;15)(p15;q35)/*NUP98-JARID1A*

GLIS2、NUP98-JARID1A 等の新規融合遺伝子が報告された (図 1)。今年度は AML99 および AML05 研究に登録された non-DS-AMKL の 43 例で、CBFA2T3-GLIS2、NUP98-JARID1A、OTT-MAL、MLL-AF9、MLL-AF10 融合遺伝子の検索を行った。また AML 19 例で次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、新規原因遺伝子の探索を行った。

B. 研究方法

対象は AML99 及び AML-05 研究に登録した non-DS-AMKL の 43 例で RNA を用いて cDNA を作成し、CBFA2T3-GLIS2、NUP98-JARID1A、OTT-MAL、MLL-AF9、MLL-AF10 融合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、イルミナ社の次世代シーケンサー (Hi-Seq) を用いて、AML19 例で全エクソン解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究事業で行われる臨床試験は、JPLSG の臨床研究審査委員会の承認と、各施設の倫理委員会の承認を得て実施している。

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

融合遺伝子の解析では、non-DS-AMKL 43 例中 CBFA2T3-GLIS2 を 12 例 (27.9%)、NUP98-JARID1A を 4 例 (9.3%)、OTT-MAL を 10 例 (23.6%)、MLL-AF9 を 2 例 (4.7%)、MLL-AF10 を 1 例 (2.3%) 認め (図 2)、CBFA23-GLIS2、NUP98-JARID1A は予後不良、OTT-MAL は予後良好であった。これらの症例における FLT3-ITD、KIT、RAS、WT1 の各変異と MLL-PTD は比較的稀であった。

次世代シーケンサーによる解析を AML19 例で行い、RAD21 や STAG2 などのコーヒシン関連遺伝子や BCOR/BCORL1 などの新規の原因遺伝子変異を同定した。さらに target deep sequencing によりこれまで AML で報告されている遺伝子の詳細な解析を行っている。

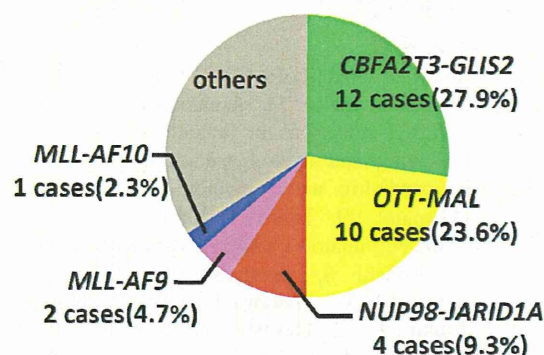


図2 non-DS-AMKL における融合遺伝子の頻度

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。

Non-DS-AMKL は染色体転座が 43 例中 29 例 (67.4%) と多く、他の遺伝子変異の合併が少ないため、oncogenic な染色体転座単独またはごく少数の遺伝子異常の付加で発症する可能性が高いと思われ、固有のグループであることが示唆された。

今回の結果は、CBFA23-GLIS2、NUP98-JARID1A は予後不良、OTT-MAL は予後良好でありこれまでの報告と一致した。これらの症例における FLT3-ITD、KIT、RAS、WT1 の各変異と MLL-PTD は比較的稀であった。これまで正常核型が多かった小児 non-DS-AMKL の半数以上に融合遺伝子がみられ、また予後との相関がみられることは今後治療を進める上でも興味深く思われた。さらに多数例で各融合遺伝子陽性例の臨床像および予後について検討を進め、分子生物学に基づいたより詳細な治療層別化を行い、小児 AML の治療成績の向上に寄与したい。

次世代シーケンサーによる解析では、コーヒシン関連遺伝子などの新規遺伝子が同定され、今後詳細な臨床像との相関等の検討を行う予定である。

E. 結論

小児 non-DS-AMKL の 65%以上に融合遺伝子がみられ、CBFA2T3-GLIS2、NUP98-JARID1A 融合遺伝子を有する症例は予後不良であることが示唆された。また次世代シーケンサーにより、新規遺伝子変異がみ出された。今後予後との関係が明らかになり、治療成績の向上に役立つことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiba N, Ohki K, Park MJ, Sotomatsu M, Kudo K, Ito E, Sako M, Arakawa H, Hayashi Y. SETBP1 mutations in juvenile myelomonocytic leukaemia and myelodysplastic syndrome but not in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 99 : 154-161, 2014
2. Shiba N, Funato M, Ohki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 164 : 142-159, 2014
3. Sano H, Shimada A, Tabuchi K, Taki T, Murata C, Park MJ, Ohki K, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. WT1 mutation in pediatric patients with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 98: 437-445, 2013
4. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet.* 45 : 1293-1299, 2013
5. Park MJ, Sotomatsu M, Ohki K, Arai K, Maruyama K, Kobayashi T, Nishi A, Sameshima K, Takagi T, Hayashi Y. Liver disease is frequently observed in Down syndrome patients with transient abnormal myelopoiesis. *Int J Hematol* 99 : 154-161, 2014
6. Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A, Kato M, Koh K, Hanada R, Tanaka Y, Kato K, Maeda D, Fukayama M, Sanada M, Hayashi Y, Ogawa S. Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer Sci* 104 : 856-864, 2013
7. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Kobayashi T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 52 : 683-693, 2013
8. Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 41 : e89,

2013

9. Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Ito E. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 121 : 3181-3184, 2013
10. Wakai K, Sano H, Shimada A, Shiozawa Y, Park MJ, Sotomatsu M, Yanagisawa R, Koike K, Kozawa K, Ryo A, Tsukagoshi H, Kimura H, Hayashi Y. Cytomegalovirus retinitis during maintenance therapy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 35 : 162-163, 2013

2. 学会発表

- 1) 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサを用いた横紋筋肉腫の標的分子の探索. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
- 2) 星野諭子, 西村 力, 関 正史, 奥野友介, 吉田健一, 白石友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 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 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
- 3) 柴 徳生, 朴 明子, 船戸道徳, 小林正夫, 木下明俊, 足立壮一, 荒川浩一, 多和昭雄, 月本一郎, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病における GATA2 遺伝子変異の解析. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
- 4) 原 勇介, 柴 徳生, 嶋田 明, 工藤寿子, 富澤大輔, 多賀 崇, 多和昭雄, 荒川浩一, 足立壮一, 林 泰秀. NUP98-NSD1 融合遺伝子陽性例は小児急性骨髄性白血病において予後不良である. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
- 5) 大木健太郎, 朴 明子, 柴 徳生, 清河信敬, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地陽, 小原 明, 林 泰秀. 小児 B 型前駆細胞型 ALL における CRLF2 高発現例の特徴: TCCSG-ALL 研究. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
- 6) 朴 明子, 大木健太郎, 新井 心, 外松学, 林 泰秀. 染色体異常を伴ったダウン症合併 TAM と AMKL の遺伝子解析. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
- 7) 関 正史, 西村 力, 星野諭子, 奥野友介, 白石友一, 吉田健一, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 再発 T 細胞性 ALL における網羅的ゲノム解析. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
- 8) Hara Y, Shiba N, Shimada A, Kudo K, Tomizawa

- D, Taga T, Horibe K, Adachi S, Arakawa H, Tawa A, Hayashi Y. NUP98-MSD1 gene fusion is a strong poor prognostic factor in pediatric AML. 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. Hong Kong, 2013.9.25-28
- 9) Seki M, Nishimura R, Hoshino H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. Hong Kong, 2013.9.25-28
- 10) 三谷幸代, 坂本裕美, 柴 徳生, 林 泰秀, 吉田輝彦, 市川 仁. RNA シークエンシングによる小児 AML の融合遺伝子探索. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
- 11) 星野諭子, 西村 力, 関 正史, 奥野友介, 白石友一, 佐藤祐介, 吉田健一, 宮野 悟, 林 泰秀, 岩中 督, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いた肝芽腫の全エクソーム解析. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
- 12) 関 正史, 西村 力, 星野諭子, 吉田健一, 佐藤悠佑, 奥野雄介, 白石悠一, 加藤元博, 康 勝好, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
- 13) 原 勇介, 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 富澤大輔, 多賀 崇, 足立壮一, 荒川浩一, 多和昭雄, 堀部敬三, 林 泰秀. 小児 non-Down 急性巨核芽球性白血病における遺伝子解析. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
- 14) 大木健太郎, 柴 徳生, 朴 明子, 富澤大輔, 多賀 崇, 堀部敬三, 多和昭雄, 足立壮一, 林 泰秀. JPLSG AML05 臨床試験登録症例において MLPA 法による MLL-PTD の頻度はこれまでの報告より少なく予後不良である. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
- 15) 鎌 裕一, 加藤政彦, 富沢仙一, 橘木浩平, 山田佳之, 丸山健一, 林 泰秀. シクロスポリン A の併用が奏功した全身型若年性特発性関節炎の 1 女児例. 第 23 回日本小児リウマチ学会. さいたま市, 2013.10.11-12
- 16) Takahashi H, Matsushita H, Kinoshita A, Taki T, Taki T, Deguchi T, Kiyokawa N, Hashii Y, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Adachi S, Tabe M, Miyachi H. A diversity of cases in AML with promyelocytic differentiation; A report from JPLSG. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 17) Tokumasu M, Nagao M, Shimada A, Murata C, Ohki K, Hayashi Y, Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Ito H, Nakayama H, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Yamaguchi H, Tawa A, Heike T, Adachi S. Prognostic impact of KIT mutatkon in t(8;21) childhood AML: The JPLSG AML-05 trial. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 18) Hara Y, Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Shimada A, Kudo K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Arakawa H, Tawa A, Hayashi Y. MUP98-NSD1 gene fusion is a strong poor prognostic factor in pediatric AML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 19) Ohki K, Kama Y, Shiba N, Arai K, Park MJ, Sotomatsu M, Hayashi Y. Clonal architecture in a case of acute myeloid leukemia with trisomy 8 and MLL-AF9. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 20) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sanada M, Park MJ, Terui K, Kon A, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 21) Iijima K, Kiyokawa N, Yoshihara H, Osumi T, Kato M, Kobayashi K, Okita H, Fujimoto J, Hanada R, Tsuchida M, Shimada H, Fukushima T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Ohara A. Gene expression profile in childhood BCP-ALL without common chimeric genes. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 22) Seki M, Hoshino N, Nishimura R, Okuno Y, Shiraishi Y, Yoshida K, Kato M, Kho K, Hanada R, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 23) 朴 明子, 吉田健一, 大木健太郎, 新井心, 外松 学, 伊藤悦朗, 小川誠司, 林 泰秀. 13q 欠失を伴ったダウン症合併 TAM と AMKL の遺伝子解析. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 24) Hara Y, Shiba N, Funato M, Oki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Gata2 mutations are found in pediatric AML but not in other leukemias including JMML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 25) Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Nagata Y, Kon A, Chiba K, Tanaka H, Ohki K, Kato M, Terui K, Park MJ, Kanazawa T, Takita J, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome resequencing reveals novel pathogenetic gene mutations in pediatric AML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 26) Kiyokawa N, Iijima K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Yoshida H, Osumi T, Kato M, Kobayashi K, Okita H, Fujimoto J, Sakamoto H, Hata K,

- Matsumoto K, Yoshida T, Saito H, Mori T, Fukushima T, Kinoshita A, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Ohara A. Identification of chimeric genes expressed in Ph-like ALL in childhood by transcriptome sequencing. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 27) Shiba N, Hara Y, Park MJ, Ohki K, Fukushima K, Sako M, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Hayashi Y. Recurrent SETBP1 mutation in juvenile myelomonocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 28) 大木健太郎, 朴 明子, 原 勇介, 柴 徳生, 大喜多 肇, 小林健一郎, 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. 小児 B 前駆細胞型 ALL における EBF1-PDGFRB 融合遺伝子の解析: TCCSG-ALL 研究. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 29) 関 正史, 吉田健一, 白石友一, 佐藤悠佑, 千葉健一, 田中陽子, 加藤元博, 花田良二, 岡 明, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 網羅的ゲノム解析による小児 T-ALL 再発例、非再発例の検討. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 30) 林 泰秀. 小児血液・腫瘍の染色体・分子遺伝学入門とその臨床応用. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会(meet the expert), 福岡, 2013.11.29-12.1
- 31) 柴 徳生, 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原因遺伝子の同定. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 (シンポジウム), 福岡, 2013.11.29-12.1
- 32) 牛腸義宏, 清河信敬, 富田 理, 飯島一智, 吉原宏樹, 石橋武士, 小林健一郎, 福島敬, 前田美穂, 林 泰秀, 菊地 陽, 康勝好, 真部 淳, 小原 明. B 前駆型細胞 ALL 再発症例のマーカーの特徴に関する検討. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 33) 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 工藤寿子, 福島啓太郎, 伊藤悦朗, 迫 正廣, 多和昭雄, 荒川浩一, 林 泰秀. 小児白血病における SETBP1 遺伝子変異の解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 34) 佐野弘純, 嶋田 明, 田渕 健, 滝 智彦, 村田知里, 朴 明子, 大木健太郎, 外松学, 足立壮一, 多和昭雄, 小林良二, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 林泰秀. 急性骨髄性白血病における WT1 遺伝子変異の解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 35) 瓜生久美子, 西村 力, 吉田健一, 関 正史, 佐藤悠佑, 佐藤亜以子, 吉田美沙, 加藤元博, 星野諭子, 樋渡光輝, 岡 明, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫大規模検体における Genetic landscape. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 36) 吉田美沙, 吉田健一, 佐藤悠佑, 佐藤亜以子, 関 正史, 西村 力, 瓜生久美子, 星野諭子, 樋渡光輝, 加藤元博, 岡 明, 小川誠司, 林 泰秀, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いた、神経芽腫における 11qLOH の責任遺伝子のターゲットキャプチャー. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 37) 星野諭子, 西村 力, 関 正史, 奥野友介, 吉田健一, 白石友一, 加藤元博, 宮野 悟, 岡 明, 林 泰秀, 岩中 督, 小川誠司, 滝田順子. 全エクソーム解析による肝芽腫における網羅的ゲノム解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 38) 関 正史, 吉田健一, 白石友一, 佐藤悠佑, 西村 力, 奥野友介, 千葉健一, 田中陽子, 加藤啓輔, 加藤元博, 花田良二, 野村優子, 朴 明子, 石田敏章, 岡 明, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 散発性胸膜肺芽腫における DICER1 の両アレル変異. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 39) 佐野仁志, 大木健太郎, 朴 明子, 柴 徳生, 原 勇介, 外松 学, 足立壮一, 堀部敬三, 多和昭雄, 花田良二, 月本一郎, 林泰秀. 小児骨髄造血器腫瘍における CSF3R 遺伝子異常の解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 40) 朴 明子, 大木健太郎, 佐野仁志, 新井心, 土岐文彰, 西 明, 金澤 崇, 外松学, 林 泰秀. Cushing 症候群により発見された両側副腎腫大の女兒. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 41) Shiba N, Ohki K, Nagata Y, Kon A, Okuno Y, Shiraishi Y, Kato M, Park MJ, Ohki K, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Ito E, Sanada M, Tomizawa D, Tawa A, Adachi S, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-Exome Resequencing Identifies Somatic Mutations Of *BCOR* and *BCORL1* Transcriptional Corepressor Genes and Major Cohesin Complex Component Genes In Pediatric Acute Myeloid Leukemia. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
- 42) Ohki K, Park MJ, Sano H, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Moriya Saito A, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Low Frequency and Poor Prognosis Of *MLL*-Partial Tandem Duplications In Pediatric Acute Myeloid

- Leukemia Using MLPA Method: The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 Trial. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
- 43) Yoshida K, Shiba N, Shiraiishi Y, Shimada A, Terui K, Kato M, Okuno Y, Nagata Y, Kon A, Yoshizato T, Matsunawa, M, Chiba K, Tanaka H, Sanada M, Miyano S, Ito E, Hayashi Y, Ogawa S. Whole Exome Sequencing Reveals Clonal Evolution Pattern and Driver Mutations Of Relapsed Pediatric AML. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
- 44) Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Yokozawa T, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Moriya Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Oki K, Hayashi Y, SAdachi S. Poor Prognosis With Different Induction Rate Was Observed In Children With Acute Myeloid Leukemia and *FLT3*-ITD According To The ITD/WT Allelic Ratio: A Result From The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
- 45) Hara Y, Shiba n, Ohki K, Park MJ, Tomizawa D, Taga T, Saito A, Fujimoto J, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Comprehensive Fusion Gene Analysis Of Pediatric Non-Down Syndrome Acute Megakaryoblastic Leukemia. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
- 46) Kiyokawa N, Iijima K, Yoshihara H, Ohki K, Kato M, Fukushima T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi Y, Koh K, Manabe A, Ohara A. An Analysis Of Ph-Like ALL In Japanese Patients. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
- 47) Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kato M, Hiwatari M, Koh K, Hanada R, Sanada M, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Genetic Landscapes Of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
- 48) Yoshimi A, Toya T, Nakagawa M, Kawazu M, Nannya Y, Ichikawa M, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Mano H, Kurokawa M. The Genetic Landscape Of FPD/AML Revealed CDC25C Mutation As a Driver That Promotes Malignant Transformation. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
- 49) Sano H, Ohki K, Park MJ, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Moriya Saito A, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. *CSF3R* Gene Mutations In Myeloid Malignancy Of Childhood. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013

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 愛知医科大学学長付き参与

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 25 年 1 月から 12 月に解析された初発 ALL75 例 (BCP14 例、T58 例、不明 3 例) を対象とした。

2. MRD 再構成ターゲット：対象症例において Ig/TCR 遺伝子再構成スクリーニングが完了した症例の中で MRD 再構成ターゲット検出例は 86%であった。このうち 1 例、2 再構成については定量感度の不足のため、定量に使用することができなかった。疾患別の再構成検出率は BCP-ALL95%、T-ALL79%、であった。また得られた再構成の総数は 245 で、その内訳は IgH 63(25.7%)、Ig κ 11(4.5%)、TCR γ 65(26.5%)、TCR δ 59(24.1%)、TCR β 42(17.1%)、Sil-Tal 5(2.0%)であった。

3. RQ-PCRによるMRD定量

上記のスクリーニング完了症例のうち、定量用フォローアップ検体が得られた57例についてRQ-PCRによるMRD定量を行った。これらの症例において使用した再構成ターゲットの内訳はIgH 16(28.1%)、Igκ 1(1.8%)、TCRγ 9(15.8%)、TCRδ 18(31.6%)、TCRβ 10(17.5%)、Sil-Tal 3(5.3%)であった。またこの57例における定量感度は 10^{-5} 39例、 10^{-4} 18例で、 $10^{-3.5}$ 以上の症例はなかった。

D. 考察

本年度は、当研究室がT-ALLの治療研究の中央検査施設に位置付けられたことを反映して、T-ALL症例を中心に、その他プロトコール治療に登録できなかったBCP-ALL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、引き続き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86%と、従来の90%を超える成績を下回ったが、これはこれまで諸家から報告されてきたように、T-ALLの再構成検出率がBCP-ALLのそれを下回るためと考えられる。すなわち、今回BCP-ALL26例に対して59例と2倍以上のT-ALL症例が存在し、それぞれの再構成検出率を比べた場合、BCP-ALL95%に対してT-ALL79%と明らかな差を認めていた。従来のスクリーニングに、TCRβ、Sil-TalといったT-ALLに多くみられる再構成ターゲットを加えてきたが、未だT-ALL全体では約20%の再構成検出不能例が存在することとなり、その割合の改善が今後の課題と考えられる。しかし、前年度幼若なクローンによる検出の困難さが原因の一つ推測していた、乳児白血病における再構成検出率の低値は、今年度の検出率は89.5%と改善がみられ、技術の熟練によって問題解決に至ったと考えられた。

また定量感度については本年度は極めて良好な結果が得られ、全例が 10^{-4} 以下で、その7割近くが 10^{-5} という高感度での定量が可能となっていることが明らかとなった。これら一連のMRD定量技術については、前述のEuroMRD quality control round (2013.10.10-12. Rotterdam, Netherlands)においても同等の結果を得ており、ヨーロッパ各国の研究施設と比べても遜色ない水準にあることを確認できた。今後もこの精度を維持す

ることにより、安定した治療研究の実現を支援できるものと考えられる。

E. 結論

本年度われわれは、T-ALL、乳児白血病を含む113症例においてIg/TCR遺伝子再構成の検出と、これを用いたRQ-PCRによるMRD定量を行い、定量可能症例の全てで 10^{-4} 以下の高感度での定量を行うことができた。今後T-ALLにおける再構成検出率の向上を検討することで、最終的な目的である定量値と予後との相関の評価に貢献できるものと考えられた。

F. 研究発表

論文

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 53: 443-449, 2012
2. 森 鉄也、深野玲司、齋藤明子、瀧本哲也、関水匡大、中澤温子、鶴沢正仁、小林良二、堀部敬三. 小児未分化大細胞型リンパ腫に対する国際臨床試験ALCL99-R1国内登録例の集計と国際臨床試験の結果と比較. 臨床血液 2013 in press
3. Hyakuna N, Shimomura Y, Watanabe A, Taga T, Kikuta A, Matsushita T, Kogawa K, Kawakami I, Horikoshi Y, Iwai T, Okamoto Y, Tsurusawa M, Asami K. Assessment of corticosteroid-induced osteonecrosis in children undergoing chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia: a report from the Japanese childhood cancer and leukemia study group. J Pediatr Hematol Oncol 36:22-29;2014
4. Tsurusawa M. Treatment strategy for lymphoma of childhood, adolescent and young adult Rinsyou Ketsueki 54:1770-1779;2013
5. Tsurusawa M. Childhood acute lymphoblastic leukemia; pathophysiology and treatment strategy Rinsyou Ketsueki 54:2038-2046;2013
6. Tsurusawa M, Mori T, Kikuchi A, Mitsui T, Sunami S, Kobayashi R, Takimoto T, Saito A, Watanabe T, Fujiomto J, Nakazawa A, Ohshima K, Horibe K. Improved Treatment Results of Children with B-cell Non-Hodgkin Lymphoma: A Report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group B-NHL03 Study. Pediatric Blood & Cancer in press 2014 Feb 13 Epub ahead of print

2、著書
無し

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