

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

臨床応用を目的とした難治性小児がんの発症・治療モデルの構築

研究代表者 清河 信敬（独）国立成育医療研究センター研究所 小児血液・腫瘍研究部長

研究要旨： 1) 小児急性リンパ芽球性白血病（ALL）の新たな予後不良亜群である Ph-like ALL について、我が国における発症の実態や、臨床像、分子病態を明らかにし、*in vitro* での薬剤感受性解析系を確立した。2) 10 カラーFCM による ALL の MRD 検出法の臨床的有用性について、臨床研究登録例に対する体系的な解析を行ない、他の方法との相関性に関する検討を進めた。

A．研究目的

小児がんは小児死亡の主要な原因の一つであり、成育医療分野では非常に重要な疾患であるが、リンパ性腫瘍はその中でも最も頻度が高い。近年リンパ性腫瘍の治療成績は著しく向上しているが、一部に依然として治療抵抗性で再発を繰り返す亜群が存在し、分子標的療法などのより有効な治療法の開発が望まれている。逆に、治療反応例については、高い治療効果を維持しつつも、晩期障害の軽減と QOL 向上を目指した、治療の軽減が重要な課題となっている。その克服には、全ゲノム構造やエピゲノム異常、遺伝子・蛋白発現等の網羅的解析による包括的な分子異常解明を行って、難治性症例や治療反応例を事前に鑑別可能な層別化法の確立や、新規治療法の標的となる病因分子の探索 が必須である。

そこで本研究では、小児白血病治療研究グループと連携し、B 前駆細胞性 (BCP-) 急性リンパ芽球性白血病 (ALL) の治療抵抗例あるいは再発例、T細胞性 (T-)ALL、成熟 B リンパ腫、等の難治性リンパ性腫瘍について、臨床検体に対する包括的・体系的な生体分子情報解析(オミックス)の手法を用いて、その臨床的特性に関する分子情報プロファイルを網羅的に明らかにし、得られた知見に基づいて培養細胞やモデル動物を用いた小児がんの発症・治療モデルを構築、解析して、層別化を含む新規診断法や、新規治療法開発を行い、臨床応用することを目的とする。

今年度は、1) BCP-ALL の遺伝子プロファイルに基づく難治性亜群である “ Ph-like ALL ” の本邦における発症の実態や分子病態について解明を進め、2) 予後層別化法として期待されている微小残存病変 (MRD) についてマルチカラーフローサイトメトリー (FCM) によ

る検出法の臨床研究登録症例での解析を継続した。

B．研究方法

1. 網羅的発現遺伝子解析：白血病細胞検体から total RNA を miRNeasy kit (Qiagen 社) で抽出し、各 50 ng を用いて WT-Ovation Pico RNA Amplification System (NuGen 社) により cDNA を合成、増幅し、Biotin 標識した後、Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array により網羅的遺伝子発現を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring (Agilent 社) を用いて解析した。チロシンキナーゼ関連キメラ遺伝子の検出は、すでに得られている塩基配列情報に基づいてプライマーを設計し、RT-PCR と direct sequencing によって行なった。

2. 細胞マーカー解析：骨髓液あるいは末梢血液について、FITC, PE, ECD, PC5.5, PC7, APC, APC-Alexa-700, APC-Alexa-750, Pacific-Blue, Krome-Orange の 10 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる全血法の蛍光染色を行った。溶血後、FCM (Gallios, Beckman-Coulter 社) を用いて 10 カラー解析を行った。

3. 培養細胞株を用いた標的因子の機能解析：標的遺伝子の cDNA は RT-PCR により増幅し、クローニングした。培養細胞への遺伝子導入と発現誘導は、Retro-X Tet On システム (pRetroX Tight および pRetro-X Tet on advanced) を用いて、テトラサイクリン依存性の発現誘導系をレトロウイルスベクターにより目的細胞に導入した。

（倫理面への配慮）

本研究で行った臨床検体を用いた研究は、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. Ph-like ALL の分子病態解析：小児がんでは最も頻度が高い BCP-ALL では、予後と強い相関を示す種々のキメラ遺伝子や染色体の数的異常が明らかにされている。BCR-ABL1 陽性 (Ph1) -ALL は全体の 5% 程度を占め、BCR-ABL1 蛋白がチロシンキナーゼ (TK) として恒常的に活性化して病態に關与する著しく予後不良な難治性亜群であるが、近年の TK 抑制剤 (TKI) の臨床応用により治療成績が劇的に改善しつつある。一方、BCP-ALL の約 1/3 は既知の遺伝子異常が検出されない症例群 (B-others と総称) であるが、多様で、著しく予後不良な亜群が含まれるため、その層別化法開発が ALL 全体の QOL 向上の上で急務である。これに対し、近年欧米において、網羅的遺伝子発現プロファイリングにより、B-others の一部の予後不良の亜群は Ph1-ALL と類似した遺伝子プロファイルを示し、多様な新規 TK 関連キメラを発現することが示され、TKI が有効な症例が存在することから “Ph-like ALL” と呼ばれて注目を集めている。昨年度は、本邦においても Ph-like ALL に相当する症例が存在し、海外の報告と同様に予後不良であることを明らかにした。今年度はさらに、Ph-like ALL の診断法に関する検討を進めた。Ph-like ALL は、“BCR-ABL1 陰性にもかかわらず Ph1-ALL と類似した遺伝子プロファイル=Ph-like signature=を示す症例” という点で国際的コンセンサスが得られているものの、診断法については確定されておらず、これまでに米国 COG-St. Jude 小児病院グループの診断法 (Clustering-St. Jude) と、オランダ-ドイツの DCOG-COALL グループからの報告 (Clustering-DCOG) 2 つの報告があり、いずれもマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルに基づいているが、それぞれ診断に用いる遺伝子の項目 (probe set) が異なる。さらに、上記診断法は一定規模の集団に対するグループ分けであるため個々のデータに対する診断は困難であるが、Gene Set Enrichment analysis (GSEA) を応用することで個々の症例の診断が可能である。そこで、東京小児がん研究グループ (TCCSG) の第 16 次治療研究 (L04/06-16、2004~2007) に登録された BCP-ALL235 例 (うち B-others 154

例) に対して、上記 3 つの異なる方法を用いた Ph-like signature の判定を行ない、比較解析した。その結果、BCP-ALL 全体 235 例では、1)4 年生存率 83.2%、2)再発 15.0%、3)死亡 7.0%、4)初発時白血球数 35,389/ μ l、5)初発時平均年齢 5.7 歳、6)IKZF1 遺伝子欠失 11.9%であるのに対し、A) Clustering-St. Jude 法では 9 例が Ph-like と判定され、1)4 年生存率 66.7%、2)再発 33.3%、3)死亡 22.2%、4)初発時白血球数 140,994/ μ l、5)初発時平均年齢 11.2 歳、6)IKZF1 遺伝子欠失 62.5%であった。同様に B) Clustering-DCOG 法では 13 例、1)4 年生存率 41.7%、2)再発 58.3%、3)死亡 16.7%、4)初発時白血球数 143,664/ μ l、5)初発時平均年齢 7.8 歳、6)IKZF1 欠失 58.3%で、C) GSEA 法では 14 例、1)4 年生存率 35.7%、2)再発 57.1%、3)死亡 35.7%、4)初発時白血球数 81,565/ μ l、5)初発時平均年齢 7.8 歳、6)IKZF1 欠失 30.8%であった。3 つの診断法で合わせて 23 例が Ph-like signature と判定された (BCP-ALL の 9.8%、B-others の 14.9%) が、重複して診断された症例は約 30-60% であり、すべての方法で共通して判定された症例は 5 例のみであった。この 5 例について PCR による稀少キメラ遺伝子のスクリーニングを行ったところ、4 例に多様なチロシンキナーゼ関連のキメラ遺伝子が検出された。以上より、Ph-like ALL の概念は、BCP-ALL の新たな予後不良亜群の分類として有用であるが、細胞遺伝学的背景が異なる様々な症例群を含んでいることが示唆され、今後その詳細を明らかにするとともに、診断基準や疾患概念の整理が必要と考えられる。しかし、チロシンキナーゼ関連のキメラ遺伝子陽性症例については TKI が有効である可能性があり、別途治療層別化の対象として検討を進める。

世界で 2 例目として同定した *SNX2-ABL1* 陽性例は Ph-like の遺伝子発現プロファイルを示し TKI が部分的に有効と考えられた。そこで Ph-like 関連キメラにつき TKI 感受性を *in vitro* で解析可能な系の確立を試みた。モデルとして *BCR-ABL1* 遺伝子を導入することより IL3-依存性 pro-B 細胞株 Ba/F3 に IL3-非依存性の増殖能が誘導されることを確認した。同細胞に imatinib, dasatinib, nilotinib, bafetinib 等の TKI を添加したところ感受性を示して細胞死に至ったが、対照の MOCK 細胞は非感受性であった。今後この系を用いて、Ph-like 関連キメラ遺伝子を導入することで、TKI 感受性の *in vitro* での検討が可能と考えられる。

2. マルチカラーFCM による小児白血病 MRD の検出：近年、MRD の検出が、小児 ALL の難治例を予測可能な新たな予後層別化因子として期待されている。Ig/TCR 遺伝子再構成を利用した定量 PCR 法（鶴澤の分担研究報告書参照）が最も確立された方法であるが、一部適応できない症例もあること、コストが高い等の問題点もあることから、これを補完する解析法として 10 カラーFCM を用いた MRD 検出法について検討を行っている。昨年度までに、10 カラーフローサイトメトリー（FCM）を用いた BCP-ALL、および T-ALL の MRD 検出法を確立した。今年度は、上記で確立した方法を用いて、全国統一多施設共同治療研究組織である日本小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）の治療研究への登録症例のうち、ALL-B12 研究登録 BCP-ALL 161 例および ALL T11 登録 T-ALL33 例に対する MRD のモニタリングを、Day-8 末梢血、Day-15, -28, -43 骨髄に対して実施した。95%以上の症例で MRD を簡便にモニタリング可能であった。

D . 考察

1. Ph-like ALL の分子病態解析：Ph-like ALL に関して、一部の症例には TKI が有効であることから、該当する症例を早期に鑑別して、TKI を併用した治療プロトコルに移行させる方向で検討が進められており、最近そのワーキンググループ（WG）が発足した。本研究における成果が Ph-like ALL に関する国内唯一の臨床情報とリンクした体系的な分子解析情報であり、同 WG での検討における重要な基礎データとして活用されている。さらに、本研究で確立された PCR による Ph-like 関連キメラ遺伝子検出法は、今後の診断・治療プロトコル確立の上で有用である。マウス細胞株を用いた遺伝子導入実験では、同じ ABL1 関連のキメラでも、パートナーによって有効な TKI の種類や感受性に差がある可能性が示された。Ph-like ALL に発現するキナーゼ関連キメラは、非常に多様で、個々の頻度は非常に低いことを考慮すると、今後、丹念に症例を 1 例ずつ解析して、個々の病態について明らかにする必要があることが示唆される。また、このマウス細胞株を用いた遺伝子導入実験系が、それぞれのキメラ遺伝子の TKI 感受性について検討するのに優れた方法であることが明らかとなった。

2. マルチカラーFCM による小児白血病

MRD の検出： FCM による MRD 法については、前述の ALL 治療プロトコルの中で PCR 法との相関性の確認が進められており、数年内に、その有用性が確立すると予測される。今後、キメラ遺伝子に対する PCR 法と合わせた 3 者の方法で相互に補完する分子 MRD 法としての評価を確立させるとともに、国内での普及を図り、将来的な保険診療への採用を目指して研究を進める。わが国における小児 ALL の治療成績向上への貢献が期待される。

E . 結論

小児 ALL の新たな予後不良亜群である Ph-like ALL について、我が国における発症の実態と、その分子病態の詳細を明らかにした。10 カラーFCM による MRD 検出法を構築し、その有用性について確認し、臨床応用を目指してさらに検討を進めている。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 2014 Mar;38(3):361-70.
- 2) 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.* 2014 Mar;92(3):263-7.
- 3) Kobayashi K, Mitsui K, Ichikawa H, Nakabayashi K, Matsuoka M, Kojima Y, Takahashi H, Iijima K, Ootsubo K, Oboki K, Okita H, Yasuda H, Sakamoto, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Ohara A. ATF7IP as a novel PDGFRB fusion partner in acute lymphoblastic leukemia in children. *Br J Haematol.* In press.
- 4) 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.
- 5) Fukushima H, Fukushima T, Sakai A, Suzuki R, Nakajima-Yamaguchi R, Kobayashi C, Iwabuchi A, Saito M, Yoshimi A, Nakao T, Kato K, Tsuchida M, Takahashi H, Koike K, Kiyokawa N, Noguchi E, Sumazaki R. Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leuk Res Treatment.* 2013;2013: 238528.

6) Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/ Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* 2013 Nov;98(5):578-88.

7) 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 Apr 26;8(4):e62233.

8) 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 uniparental disomy. *J Pediatr.* 2013 Jun;162(6):1285-8.

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。(ワークショップ)

7) Kiyokawa N, Iijima K, Yoshihara H, Ohki K, Kato M, Fukushima T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi H, Koh K, Manabe A, Ohara A. An analysis of Ph-like ALL in Japanese patients. 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, USA, December 6-10, 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

2. 学会発表

1) 上野瞳，大喜多肇，藤本純一郎，秦順一，清河信敬．腎ラプ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.

2) 三春晶嗣，富田理，石橋武士，清河信敬．10 カラーフローサイトメトリーによる T-ALL の MRD 検出．第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会，東京，6月22日-23日，2013 .

3) 清河信敬，飯島一智，中林一彦，市川仁，吉原宏樹，大隅朋生，加藤元博，小林健一郎，大喜多肇，藤本純一郎，坂本裕美，秦健一郎，松本健治，吉田輝彦，斎藤博久，森鉄也，福島敬，木下明俊，康勝好，真部淳，菊地陽，林泰秀，小原明．次世代シーケンサーによる小児 Ph-like ALL のキメラ遺伝子探索．第 75 回日本血液学会学術集会，札幌，10月11日-13日，2013 .

4) 富田理，飯島一智，石橋武士，大隅朋生，増澤亜紀，清谷知賀子，斉藤正博，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．第 75 回日本血液学会学術集会，札幌，10月11日-13日，2013 .

5) 飯島一智，清河信敬，吉原宏樹，富田理，小林健一郎，福島敬，林泰秀，菊地陽，康勝好，真部淳，小原明．小児 Ph-like ALL 症例の表面マーカー、遺伝子発現解析.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。(プレナリーセッション)

6) 清河信敬，飯島一智，吉原宏樹，大木健太郎，加藤元博，大喜多肇，花田良二，土田昌宏，林泰秀，菊地陽，康勝好，真部淳，小原明．東京小児がん研究グループ L04/06-16 研究登録症例における Ph-like ALL に関する検討．第 55 回

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

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。

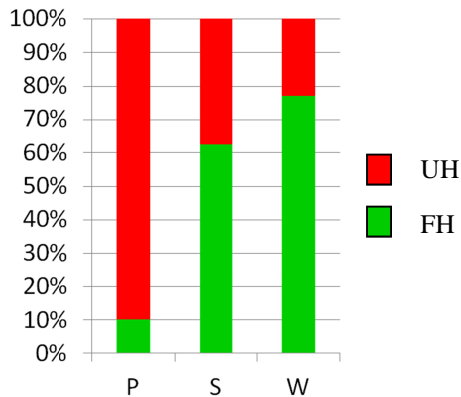
(倫理面への配慮)

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。

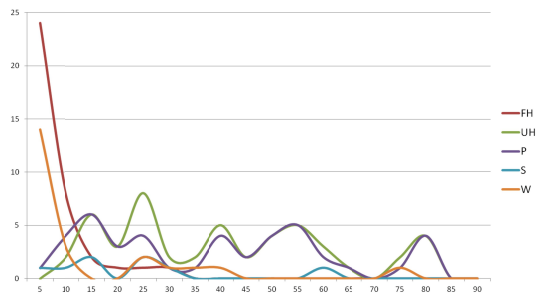
C. 研究結果

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。

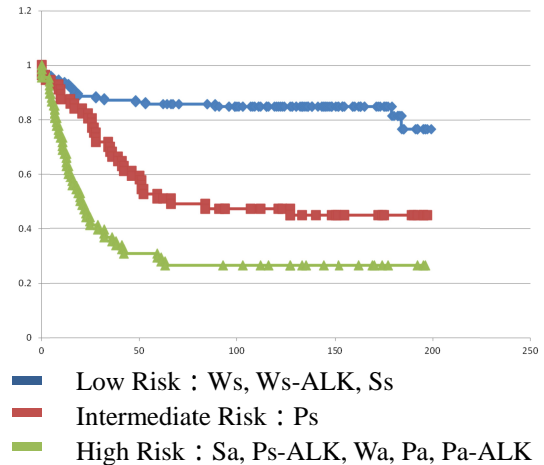


ゲノム解析をされた 314 例のうち、MYCN 遺伝子の検索が行われた症例は 311 例で、増幅

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。

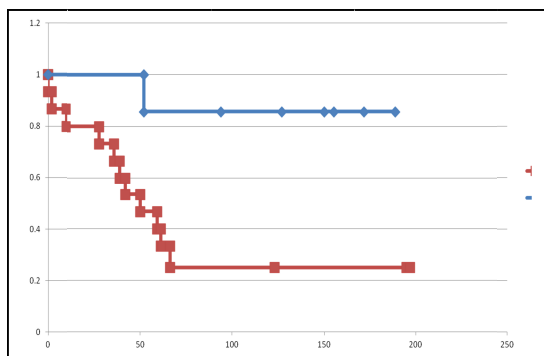


High Risk 群と Low risk 群、Low risk 群と Intermediate 群 ($p < 0.001$)、Intermediate 群と High Risk 群 ($p < 0.005$) の生存率には有意差が認められた。ゲノム分類によるリスク群は、MYCN 遺伝子増幅とは独立した予後因子になると考えられた。

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) 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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

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-NHL4例とB-NHL6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-NHL6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治療法, *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治療の現状と展望*. *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、間葉芽腎腫瘍では、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、パイロシーケンス法によって、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ケンス (QIAGEN)にて解析した。シーケ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（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。パイロシーケンス法にて解析し、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が示唆された。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: TCCSG-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, 秦健一郎, 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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

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-*

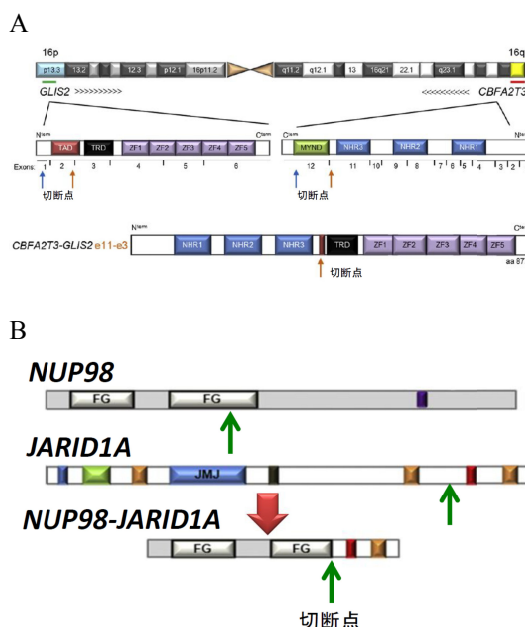


図1 新規融合蛋白模式図 (Gruber et al. Cancer Cell 2012)

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

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

GLIS2、NUP98-JARIDIA 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-JARIDIA、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-JARIDIA、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-JARIDIA 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-JARIDIA 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。

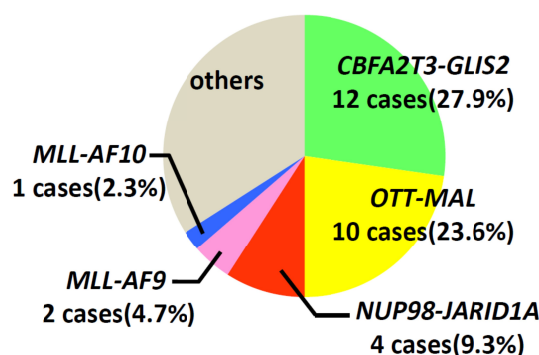


図2 non-DS-AMKL における融合遺伝子の頻度

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-JARIDIA 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-JARIDIA 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, 橋木浩平, 山田佳之, 丸山健一, 林 泰秀. シクロスボリン 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 mutacon 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, 田淵 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, Shiraishi 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, Adachi 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, Shiraishi 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
- (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

G . 知的財産権の出願・登録状況

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 鎖、IgH 鎖、TCR 鎖、TCR 鎖、TCR 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 11(4.5%)、TCR 65(26.5%)、TCR 59(24.1%)、TCR 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%)、Ig 1(1.8%)、TCR 9(15.8%)、TCR 18(31.6%)、TCR 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、TCR、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する。

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

- 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、**瀧澤正仁**、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
- 森 鉄也、深野玲司、齋藤明子、瀧本哲也、関水匡大、中澤温子、**瀧澤正仁**、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 2013 in press
- 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
- Tsurusawa M**. Treatment strategy for lymphoma of childhood, adolescent and young adult Rinsyou Ketsueki 54:1770-1779;2013
- Tsurusawa M**. Childhood acute lymphoblastic leukemia; pathophysiology and treatment strategy Rinsyou Ketsueki 54:2038-2046;2013
- Tsurusawa M**, Mori T, Kikuchi A, Mitsui T, Sunami S, Kobayashi R, Takimoto T, Saito A, Watanabe T, Fujiomoto 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

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 京都大学 腫瘍生物学 教授

研究要旨：散発性肺芽腫の発症分子機構を解明するために、初発、再発例を含む肺芽腫 12 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。SNP アレイでは、8 番染色体の増加が最も特徴的であり、次いで TP53 を含む 17 番染色体短腕(17p)領域のヘテロ接合性の消失(LOH)が高頻度に認められた。また、19q の高度増幅も 3 例に認められた。7 例における Exom 解析の結果、DICER1 と TP53 の重複変異が検出された。計 12 例の deep sequencing では、11 例に DICER1 が見出され、8 例に TP53 の変異が見出された。興味深いことに、11 例中 10 例では、DICER1 の compound hetero 変異もしくはホモ変異が検出された。compound hetero 変異の片側変異はすべてナンセンスもしくは、フレームシフト変異であり、もう一方の変異は RNaseIIIb ドメインに集中していた。RNaseIIIb ドメイン内のホットスポット変異 G1809R の機能解析を行うために、microRNA sequencing を行ったところ、G1809R では有意に 5p の産生が低下していた。以上の結果より、散発性肺芽腫の発症には、DICER1 の biallelic 変異が重要な役割を果たしており、また、TP53 変異はセカンドヒットであることが示された。

研究協力者

滝田順子

東京大学 小児科

A . 研究目的

胸膜肺芽腫は小児期に発生する非常に稀な胸膜原発の悪性腫瘍である。3 歳以下の年少時に好発する。生物学的には悪性度が高く、胸膜浸潤や脳・骨転移なども高頻度に見られ、一般的に予後は不良である。のう胞成分の有無によってタイプ I から III に分類されるが、タイプ III は最も予後が悪く、10-30%の治癒率である。肺芽腫の約 10%には、家族性にほかの悪性腫瘍や腎のう胞、肺のう胞および先天性嚢胞性腺腫様奇形などの形成異常を合併することが知られている。このような家族性肺芽腫はタイプ I ないし II であることが多い。

近年、家族性肺芽腫の原因遺伝子として、microRNA のプロセッシングに参与する *DICER1* の機能喪失型変異が見出さ

れた。*DICER1* の変異は卵巣腫瘍や甲状腺腫などほかの腫瘍でも見出されている。しかし、肺芽腫の大部分を占める散発性肺芽腫の原因遺伝子は同定されていない。そこで、散発性肺芽腫の発症分子機構を解明するために、次世代シーケンサーおよび SNP アレイなど先端的ゲノム解析技術を駆使して、網羅的ゲノム解析を行った。

B . 研究方法

1. 対象

SNP アレイ解析は散発性肺芽腫 12 例、細胞株 2 株を用いた。exom 解析は、新鮮腫瘍 7 例（再発例 2 例を含む）を用いて行った。また *DICER1* および *TP53* に関しては、変異の頻度を検証するために計 12 例の新鮮腫瘍検体を用いて、deep sequencing を行った。さらに、検出された *DICER1* 変異の機能解析を行うために、microRNA sequencing 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、メーカープロトコールに従い、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 ExonV4 (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. exome 解析のデータ解析

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。さらに病的意義が低いと考えられる SNP は除外した[dbSNP 131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)、1000 genome (<http://www.1000genomes.org/>) 参照]。正常、腫瘍 DNA の両方で deep シーケンスにより体細胞変異を確認した。

5. microRNA sequencing

ホットスポット変異 G1809R を有する腫瘍および既知の D1810Y 変異を有する腫瘍検体より RNA を抽出し、TruSeq small RNA Sample Preparation Kit を用いて、micro RNA ライブラリーを作成した。Small RNA sequencing は、Illumina Miseq Reporter v2.3 (Illumina, Inc., San Diego, CA) を使用した。

コントロールとして、胎児の正常肺を用いた。

(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：染色体 7q 8、12 番染色体の増幅が有意に高頻度に認められた。特に 8 番染色体の増加は 1 例をのぞいて、全例に認められた。また LOH としては、17p 領域が最も高頻度に検出された(10/12 例)。このうち 1 例には Uniparental disomy が検出された。また、新規コピー数異常としては、19q13.11 の高度増幅が 3 例に認められた。この領域内には、LSM14A, KIAA0355, GPI, UBA2, および PDCD2L が存在することが判明した。しかし、変異解析では、これらの遺伝子に関して、有意な変異は検出されなかった。

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、肺芽腫においても体細胞変異が少なく、1 検体あたり平均 22 個であった。初発腫瘍と比較して、再発腫瘍では変異の個数が多い傾向がみられたが、有意差はみられなかった。解析した 7 例中 3 例に重複する変異として、DICER1 が検出された。また 2 例に重複する変異として、TP53, CTNNB1, GPR182, MYH8, PDE2A, and TMX3 が見出された。

4. 標的遺伝子の deep sequencing:exome 解析の結果、重複変異がみられた遺伝子につき、計 12 例の新鮮腫瘍検体を用いて、頻度の検証を行ってところ、DICER1 変異は 11/12 例、TP53 変異は 8/12 例で認められた。しかし、ほかの遺伝子に関しては、新たな変異は検出されなかった。興味深いことに、11 例中 10 例では、DICER1 の compound hetero 変異もしくは

ホモ変異が検出された。compound hetero 変異の片側変異はすべてナンセンスもしくは、フレームシフト変異であり、もう一方の変異は RNaseIIIb ドメインに集中していた。

3. ホットスポット変異 G1809R の機能解析: Compound hetero 変異もしくはホモ変異として高頻度に検出された G1809R の病的意義を解明するために、microRNA sequencing を行った。その結果、G1809R および卵巣腫瘍のホットスポット変異である D1810Y を有する腫瘍では、胎児肺と比べて、microRNA の産生途中で生じる 5p が有意に減少していた。一方、同様に microRNA の産生途中で cleavage される 3p に関しては、量的減少は見られなかった。

D . 考察

SNP アレイの結果より、散発性肺芽腫におけるゲノムプロファイルとしては、染色体 8 番の増加と 17p の LOH が特徴的であることが明らかとなった。また、新規異常としては、再発例を含む 3 例において、19q13.11 の高度増幅が認められた。しかし、この領域内に存在する遺伝子の有意な変異は認めなかったことから、この領域内の microRNA クラスターが、腫瘍の進展に関与している可能性が示唆された。

exome 解析の結果、DICER1 の biallelic 変異が高頻度に認められたが、これは従来から報告のある家族性肺芽腫の変異パターンとは明確に異なる点であった。すなわち、散発性肺芽腫と家族性肺芽腫はともに DICER1 の機能異常が発症に関与しているものの、両者には異なる分子病態が存在すると考えられる。DICER1 の RNaseIIIb ドメインは、microRNA のプロセッシングの過程で、5p の切断に関与することが知られている。散発性肺芽腫で検出された RNaseIIIb ドメイン内のホットスポット変異を有する腫瘍では、5p の発現量が有意に減少していたことから、変異によって、5p の切断が障害されていることが示された。従って、散発性肺芽

腫の発症には、単に DICER1 の機能が喪失されるのみならず、5p の切断障害が関与している可能性が示唆された。

一方、DICER1 の変異に次いで、TP53 の変異および、TP53 を含む 17p 領域の LOH が高頻度であったことから、TP53 は散発性肺芽腫のセカンドヒットとなっている可能性が示唆された。

E . 結論

散発性肺芽腫の発症には家族性肺芽腫と同様に DICER1 が重要な役割を演じていることが示された。しかし、DICER1 による発がんメカニズムは散発性と家族性とは、明確に異なることが明らかとなった。さらに、散発性肺芽腫のセカンドヒットとして、TP53 変異が重要であることが示唆された。

F . 研究発表

1. 論文発表

1. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet.* 2014 Feb;46(2):171-5..
2. Lin TL, Nagata Y, Kao HW, Sanada M, Okuno Y, Huang CF, Liang DC, Kuo MC, Lai CL, Lee EH, Shih YS, Tanaka H, Shiraishi Y, Chiba K, Lin TH, Wu JH, Miyano S, Ogawa S, Shih LY. Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with TET2 and IDH1/2 mutations. *Haematologica.* 2014;99(1):28-36.
3. Hosono N, Makishima H, Jerez A, Yoshida K, Przychodzen B, McMahon S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Sanada M, Gomez-Segui I, Verma AK, McDevitt MA, Sekeres MA, Ogawa S, Maciejewski JP. Recurrent genetic defects on chromosome 7q in myeloid neoplasms. *Leukemia.* 2014.
4. Becker H, Yoshida K, Blagitko-Dorfs N, Claus R, Pantic M, Abdelkarim M,

- Niemöller C, Greil C, Hackanson B, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Döhner K, Schnittger S, Henneke P, Niemeyer C, Flotho C, Pfeifer D, Ogawa S, Lübbert M Tracing the development of acute myeloid leukemia in CBL-syndrome *Blood* 2014.
5. Y 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*. 2013;45(11):1293-1299.
 6. Yoshida K, Sanada M, Ogawa S. Deep sequencing in cancer research. *Jpn J Clin Oncol*. 2013;43(2):110-115.
 7. 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*. 2013;32(9):1155-1163.
 8. Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, Shimizu M, Kawaguchi T, Chen Z, Naruse TK, Sato-Otsubo A, Ebana Y, Maejima Y, Kinoshita H, Murakami K, Kawabata D, Wada Y, Narita I, Tazaki J, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Ogawa S, Komuro I, Nagai R, Yamada R, Tabara Y, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am J Hum Genet*. 2013;93(2):289-297.
 9. Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S. Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2013.
 10. Takada M, Higuchi T, Tozuka K, Takei H, Haruta M, Watanabe J, Kasai F, Inoue K, Kurosumi M, Miyazaki M, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Kaneko Y. Alterations of the genes involved in the PI3K and estrogen-receptor pathways influence outcome in human epidermal growth factor receptor 2-positive and hormone receptor-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. *BMC cancer*. 2013;13:241.
 11. 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*. 2013;41(4):e89.
 12. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2013;45(8):860-867.
 13. Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(8):937-941.
 14. Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood*. 2013;121(21):4377-4387.
 15. 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). *Ann Hematol*. 2013;92(1):1-9.
 16. 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*. 2013;104(7):856-864.

17. Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S, Ishikawa Y. Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes. *BMC cancer*. 2013;13(1):8.
18. Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med*. 2013;210(12):2627-2639.
19. Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013;45(8):942-946.
20. Mae S, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otsubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2013;4:1367.
21. Lee DH, Amanat S, Goff C, Weiss LM, Said JW, Doan NB, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Forscher C, Koeffler HP. Overexpression of miR-26a-2 in human liposarcoma is correlated with poor patient survival. *Oncogenesis*. 2013;2:e47.
22. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet*. 2013;92(3):431-438.
23. Kunishima S, Imai T, Kobayashi R, Kato M, Ogawa S, Saito H. Bernard-Soulier syndrome caused by a hemizygous GPIIb β mutation and 22q11.2 deletion. *Pediatr Int*. 2013;55(4):434-437.
24. Kon S, Minegishi N, Tanabe K, Watanabe T, Funaki T, Wong WF, Sakamoto D, Higuchi Y, Kiyonari H, Asano K, Iwakura Y, Fukumoto M, Osato M, Sanada M, Ogawa S, Nakamura T, Satake M. Smad1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(3):1123-1137.
25. Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013;45(10):1232-1237.
26. Kitamura K, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Furukawa K, Miyano S, Ogawa S, Kunishima S. Normal neutrophil myosin IIA localization in an immunofluorescence analysis can rule out MYH9 disorders. *J Thromb Haemost*. 2013;11(11):2071-2073.
27. Kawamata N, Moreilhon C, Saitoh T, Karasawa M, Bernstein BK, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Raynaud S, Koeffler HP. Genetic differences between Asian and Caucasian chronic lymphocytic leukemia. *International journal of oncology*. 2013;43(2):561-565.
28. 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 uniparental disomy. *J Pediatr*. 2013;162(6):1285-1288, 1288 e1281.
29. Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood*. 2013.
30. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann

T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. Landscape of Genetic Lesions in 944 Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia*. 2013.

31. Gomez-Segui I, Makishima H, Jerez A, Yoshida K, Przychodzen B, Miyano S, Shiraishi Y, Husseinzadeh HD, Guinta K, Clemente M, Hosono N, McDevitt MA, Moliterno AR, Sekeres MA, Ogawa S, Maciejewski JP. Novel recurrent mutations in the RAS-like GTP-binding gene RIT1 in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2013;27(9):1943-1946.

32. Damm F, Chesnais V, Nagata Y, Yoshida K, Scourzic L, Okuno Y, Itzykson R, Sanada M, Shiraishi Y, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Miyano S, Mori H, Shih LY, Park S, Dreyfus F, Guerci-Bresler A, Solary E, Rose C, Cheze S, Prebet T, Vey N, Legentil M, Duffourd Y, de Botton S, Preudhomme C, Birnbaum D, Bernard OA, Ogawa S, Fontenay M, Kosmider O. BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Blood*. 2013;122(18):3169-3177.

33. Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimarui K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. *Cancer Sci*. 2013;104(8):1097-1106.

2. 学会発表

1. Kenichi Yoshida, Tsutomu Toki, Myoung-ja Park, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Ayana Kon, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Yusuke Sato, RuNan Wang, Kiminori Terui, Rika Kanezaki, Norio Shiba, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Kanegane, Keiko Tsukamoto, Souichi Adachi, Kiyoshi Kawakami, Seiji Kojima, Shai Izraeli, Satoru Miyano, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito and Seishi Ogawa. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. The 18th Congress of European Hematology Association (EHA) (Oral, Best abstract) 2013/6/15

Stockholm (Sweden)

2. Kenichi Yoshida, Tsutomu Toki, Myoung-ja Park, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Ayana Kon, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Yusuke Sato, RuNan Wang, Kiminori Terui, Rika Kanezaki, Norio Shiba, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Kanegane, Keiko Tsukamoto, Souichi Adachi, Satoru Miyano, Seiji Kojima, Shai Izraeli, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito and Seishi Ogawa. Genetic Basis of Myeloid Proliferation Related to Down Syndrome, 2012 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition (Oral, ASH Outstanding Abstract Achievement Award) 2012/12/10 Atlanta (U.S.A.)

3. Kenichi Yoshida, Tsutomu Toki, Myoung-ja Park, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Ayana Kon, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Yusuke Sato, RuNan Wang, Kiminori Terui, Rika Kanezaki, Norio Shiba, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Kanegane, Keiko Tsukamoto, Souichi Adachi, Kiyoshi Kawakami, Seiji Kojima, Shai Izraeli, Satoru Miyano, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito and Seishi Ogawa. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. American Association for Cancer Research (AACR) Annual (Poster) Meeting 2013/4/9 Washington, DC (U.S.A)

4. 吉田健一、小川誠司、國島伸治 血小板異常症 第116回日本小児科学会学術集会 2013/4/19 広島

5. Kenichi Yoshida, Tsutomu Toki, Myoung-ja Park, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Ayana Kon, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Yusuke Sato, RuNan Wang, Kiminori Terui, Rika Kanezaki, Norio Shiba, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Kanegane, Keiko Tsukamoto, Souichi Adachi, Kiyoshi Kawakami, Seiji Kojima, Shai Izraeli, Satoru Miyano, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito and Seishi Ogawa. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. 第75回日本血液学会学術集会 2013/10/11 札幌

6. 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. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013/10/11 札幌

7. Seishi Ogawa. Genetic analysis of myeloid neoplasms in childhood. Cambridge Research Institute Annual International Symposium 2012/11/2 Cambridge (UK)

8. Seishi Ogawa. Genetic analysis of Down Syndrome-related myeloid neoplasms. 日仏がんワークショップ 2013/11/22, Toulouse (France)

9. 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. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 日

10. 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. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 日

11. 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羅的ゲノム解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 日

12. 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. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 日

13. 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おける小児 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. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

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進めた。小児骨肉腫については、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い、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を抽出した。これらのマーカー候補について新規追加症例を用いて検証を進めており、これまでに高い再現性が得られている。また、次世代シーケンサーを用いた409種の既知がん関連遺伝子の網羅的変異解析を行い、一部症例について新規変異を見いだした。以上のようなゲノムコピー数解析と遺伝子変異を組み合わせることにより、特に治療反応性の乏しい群を早期に予測する特徴的なプロファイルの検索と検証を進める。

A．研究目的

近年の化学療法の進展により、小児がんの予後は飛躍的に向上したものの、一部の小児がんについては依然として予後不良であり、早期層別化と新たな治療法の開発が望まれる。また、小児がんの臨床においては、治療後の生活の質を重視した治療戦略の選択は特に重要であり、その観点からも精度の高い腫瘍リスク分類システムの構築が急務である。そこで本研究では、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法選択システムの構築に応用することを目的とする。まず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、次世代シーケンサーを用いた網羅

的遺伝子変異検索を行い、ゲノム異常の情報と治療反応性や予後情報の統計解析により層別化に必要な因子を絞り込み、治療率向上を目標とした化学療法奏効性予測法の構築と分子プロファイルに基づいた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处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78例の中から、均一な背景、すなわち初診時に転移がなく、四肢発生であり、同一Neoadjuvant化学療法プロトコールNECO-95J治療を受け、広範切除以上の外科的治療を施行した症例群であり、かつ4年以上のフォローアップ情報がある30例を選び、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同量のヒト胎盤由来 DNA を使用した。Feature Extraction によりハイブリダイゼーション後の数値化を行った後、Genomic Workbench CGH Module で各遺伝子座のコピー数の算出と治療奏効群、非奏効群間のコピー数比較解析を行った。

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 μ 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 40ng 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。がんで変異が報告されている 409 遺伝子のエクソンをカバーする 16000 個の標的遺伝子領域をマルチプレックス PCR 法にて増幅し、イオントレントプロトン次世代シーケンサーを用いてアンプリコンシーケンシングを行った。プロトン用 Piv2 チップにより、平均約 110bp 長のアンプリコンについて約 85 メガリード (約 9 ギガベース) を解読し、平均約 1500 カバーの配列が得られ、コントロールサンプルとの比較により、各症例について変異候補を抽出した。得られた一塩基置換変異については、PolyPhen、SHIFT などの機能予測データベース検索を行った。

(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。また、過去の論文の大部分は治療後に採取された腫瘍組織の解析結果であり、本来の腫瘍の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前に採取された診断用の生検組織の残余ががんバイオバンクに保存された小児骨肉腫症例 78 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) についてアレイ CGH 解析を行い、ゲノムコピー数プロファイルと予後あるいは治療奏効性と相関する領域の抽出を行った。標準的な骨肉腫 Neoadjuvant 化学療法プロトコルにおいては、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 IF0 を加えた治療を行う。そこで、治療奏効性に関する比較に関しては、症例を以下の 3 群に分けて比較解析を行った。すなわち、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 IF0 に変更し good responder と判定された 6 例を B 群、IF0 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 Genomic Workbench CGH Module により抽出した。

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 (OS, EFS とともに $p < 0.005$)。全体のパターンは 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、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 ($p < 0.05$)。

A 群と B, C 群との比較解析では 5p 領域の増加が (X-marker, 感度 88%、特異度 93%)、また C 群と A, B 群との比較解析では 9q 領域の欠失および 12q 領域の増加が (Y-marker, 感度 100%、特異度 93%) それぞれ特徴的であった。昨年度見いだしたこれら上記 3 カ所の領域の他に同様の相関を示す 5 カ所の領域をマーカー候補として加え、各症例をスコアリングしたプロットでは、A 群 (8/8, 100%)、B 群 (6/6, 100%)、C 群 (5/8, 63%) の正答率であった。このプロット法を検証

するため、新規 8 症例 (A 群:2 例、B 群:2 例、C 群:4 例) を追加しアレイ CGH の解析結果から、スコアリングを行ったところ、A 群 (2/2, 100%)、B 群 (2/2, 100%)、C 群 (3/4, 75%) の正答率となった。以上の結果から、スコアリング検証にはさらに症例の追加が必要であるが、5p12 と 9q21 のコピー数による二次元プロットを更に進めて、同様の統計的相関を示す複数の領域をスコアリングに加えることで、より安定にこれら 3 群の予測が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、*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パターン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行った。治療反応性が判明している 11 症例 (A 群:4 例、B 群:1 例、C 群:6 例) の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、既知がん関連変異遺伝子 409 種のエクソン部分をカバーする約 16000 のアンプリコン (Comprehensive Cancer Panel) をマルチプレックス法により増幅し、イオンプロトンシーケンサーにより平均約 1500 の深度で配列を解読した。IonTorrent Suit の variant caller を用いて、これまでにチロシンキナーゼファミリー、クロマチンリモデリング関連遺伝子群、骨格筋などの lineage-specific な遺伝子発現制御に関与する転写因子群などを含む 153 の non-synonymous SNVs の候補 (frequency >5%、腫瘍あたり 13.9 SNVs) が検出され、キャピラリーシーケンサーによる検証とリ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。本研究では化学療法開始前の骨肉腫バイオプシー試料を用いたゲノム解析を行い、現行のプロトコールに対する治療奏効性と関連するプロファイルを抽出した。症例数の少なさから、今後多施設共同による試料の追加が必須であるが、本研究で提示したゲノムプロファ

イルに基づく治療奏効群、非奏効群の層別化モデルは、治療前の試料を用いることで検証の精度を高めることができると期待される。

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、ゲノムプロファイルを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解析からは、少量あるいは腫瘍含量の少ない試料も deep sequencing することにより、網羅的にゲノム変異情報が得られるばかりでなく、アンプリコンシーケンシングの coverage analysis データを用いた腫瘍コピー数解析の結果とアレイ CGH 解析の比較からも、パネルに含まれる遺伝子座のコピー数予測が可能であることが示されている。今回予想用スコアリングに使用したゲノム領域を次世代シーケンサーのパネルに加えておくことにより、今後は次世代シーケンサー解析のみで、本研究のスコアリングが可能となると期待される。

平成 25 年より千葉県がんセンターは米国 NCI 主導の小児骨肉腫 TARGET プロジェクトと連携しており、全ゲノムならびに全エクソンシーケンシング、RNA シーケンシング、メチル化解析が進行中である。本邦においても臨床応用を目標に多施設共同研究を視野に入れ、さらに解析と検証を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T. Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway. *Eur J Cancer* in press.
- 2) Yu F, Gao W, Yokochi T, Suenaga Y, Ando K, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A. RUNX3 interacts with MYCN and facilitates protein degradation in neuroblastoma. *Oncogene* in press.
- 3) Suenaga Y, Islam SM, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shibata T, Nakamura Y, Ohira M, Haraguchi S, Takatori A, and Nakagawara A.

- NCYM, a cis-antisense gene of MYCN, encodes a de novo evolved protein that inhibits GSK3beta resulting in the stabilization of MYCN in human neuroblastomas. *PLoS Genet* 10(1): e1003996, 2014.
- 4) Hasan, MK, Nafady A, Takatori A, Kishida S, Ohira M, Suenaga Y, Hossain S, Akter J, Ogura A, Nakamura Y, Kadomatsu K, Nakagawara A. ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci Rep.* 3:3450, 2013.
- 5) Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J Clin Invest.* 123(7):2935-47, 2013.
- 6) Asada K, Watanabe N, Nakamura Y, Ohira M, Westermann F, Schwab M, Nakagawara A, Ushijima T. Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. *Jpn J Clin Oncol.* 43(6):641-5, 2013.
- 7) Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, Ohira M, Kamijo T, Kondo S, Fujii Y, Nakagawara A. Novel adaptor protein Shf interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 104(5):563-72, 2013.
- 2. 学会発表**
- 1) Iwata S, Ohira M, Yonemoto T, Ishii T, Kamoda H, Nakagawara A. Genomic predictors of response to preoperative chemotherapy in patients with pediatric osteosarcoma. AACR 104th Annual Meeting 2013, Washington DC, 4月6日-10日, 2013.
- 2) 岩田慎太郎、大平美紀、石井 猛、影山肇、片山 稔、横井左奈、永瀬浩喜、米本 司、中川原 章. ゲノム解析による小児骨肉腫患者の至適化学療法予測システム 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月3日-5日, 2013.
- 3) 岩田慎太郎、大平美紀、米本 司、萩原洋子、永瀬浩喜、影山 肇、片山 稔、鴨田博人、横井左奈、石井 猛、中川原 章. ゲノム解析の手法を用いた小児四肢発生骨肉腫患者の至適化学療法予測システムの確立. 第 51 回日本癌治療学会学術集会, 京都, 10月24日-26日, 2013.
- 4) Iwata S, Yonemoto T, Kageyama H, Yokoi S, Nagase H, Nakagawara A, Ishii T, Ohira M. Characterization of genomic alterations in pediatric osteosarcoma with differential chemosensitivities: Construction of genome-based prediction system using preoperative biopsy samples. AACR Special Conference on Pediatric Cancer at the Crossroads 2013, San Diego, 11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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

腫瘍細胞特異的遺伝子発現の経時的变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： 小児白血病の適切な治療を選択するために正確で迅速な病型診断が必須である。小児急性リンパ性白血病では染色体転平成 23 年度から臨床試験が開始された JPLSG ALL T-11、平成 24 年度から開始された JPLSG ALL B-12 への登録例を対象にしてキメラ遺伝子スクリーニングを行った。全国ネットで展開される小児白血病の臨床研究においては、キメラ遺伝子スクリーニングの手法や判定基準等、標準化が必須である。学術的進歩と技術革新とを随時積極的に取り入れ、一層安定した検査手技によって臨床的意義のある中央診断システムを再構築し続ける必要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

小林千恵

筑波大学医学医療系臨床医学域

小児科学講師

福島 紘子

筑波大学医学医療系臨床医学域

小児科学助教

鈴木涼子

筑波大学附属病院小児科

アカデミックレジデント

野口恵美子

筑波大学医学医療系生命医科学域

遺伝医学准教授

A. 研究目的

小児白血病の治療成績向上のためには、正確で迅速な病型診断が必須である。その診断に基づき、以後の治療方針が決定される。本研究においては、日本小児白血病リンパ腫研究グループ JPLSG によって実施される多施設共同臨床試験に登録された急性リンパ性白血病（ALL）例の発症時検体を用いて、既知のキメラ遺伝子を対象としてスクリーニングを実施し、治療を層別化に貢献することを目的とした。

B. 研究方法

小児 ALL のうち JPLSG 登録例を対象としたキメラ遺伝子（融合 mRNA）スクリーニングについて JPLSG に登録された小児 ALL の発症時骨髄または血液から抽出された RNA 検体の送付を受けて、キメラ遺伝子スクリーニングを行った。

2013 年 4 月以降、JPLSG 施設（表 3 全 166 施設）の内、施設倫理委員会または施設研究審査委員会

の承認を得られた医療機関から順次、暫定診断 ALL 症例の RNA 検体が送付された。cDNA を作成し定量 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（表 4）。

- TEL-AML1 (ETV6-AML1)
- E2A-PBX1
- Minor BCR-ABL
- Major BCR-ABL
- MLL-AF4
- MLL-AF9
- MLL-ENL
- MLL-AF6
- SIL-TAL1

なお、検出感度は 20 コピー / 100ngRNA に設定した。

発症時のスクリーニング結果は、各担当医に報告した。

（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

JPLSG 登録 ALL 全症例について送付された 119 検体のうち 21 検体（17.6%）において、いずれかのキメラ遺伝子が検出された

(表4)。

D. 考察

本研究では、TCCSG 登録 + JPLSG 登録 ALL 例を併せて、26.5 %にキメラ遺伝子が検出された。海外の調査では、小児 ALL のうち 20%前後に TEL-AML1 が検出されると記載されている¹⁾が、本研究では 12.9%であった。本キメラ遺伝子と関連する染色体異常は、G バンド分染法では検出が非常に難しく、PCR 法か FISH 法かでスクリーニングしないと認識できないとされる。PCR 法の false negative の可能性を検証するには、全症例を PCR 法のみでなく FISH 法でもスクリーニングする必要がある。

その他のキメラ遺伝子の頻度は、先行研究の報告とほぼ同じであった。各登録症例に対する臨床実践として、白血病細胞の染色体分析または FISH 法などによる染色体異常の有無につき評価し、TCCSG データセンターに集められているので、その集計結果と突き合わせることによって、感度、特異度等の評価が可能になる。

CML を疑って検体を送付された 47 症例中 41 症例において、major BCR-ABL が検出され、うち 2 症例では同時に minor BCR-ABL が検出された。3 症例では minor BCR-ABL のみが検出された。

更に症例の集積を行うことにより、我が国の小児 ALL におけるキメラ遺伝子発現頻度をより確実に評価し、また小児 CML の我が国における頻度が明らかになるものと期待される。

E. 結論

ALL の臨床診断に基づいて発症時検体を送付された 620 症例中の 146 例 (26.5%) でいずれかのキメラ遺伝子が検出された。CML を疑われて検体を送付された 47 症例中 44 症例において BCR-ABL が検出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiroko Fukushima, Takashi Fukushima, Aiko Sakai, Ryoko Suzuki, Ryoko Nakajima-Yamaguchi,

Chie Kobayashi, Atsushi Iwabuchi, Makoto Saito, Ai Yoshimi, Tomohei Nakao, Keisuke Kato, Masahiro Tsuchida, Hideto Takahashi, Kazutoshi Koike, Nobutaka Kiyokawa, Emiko Noguchi, and Ryo Sumazaki. Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leukemia Research and Treatment* 2013, Article ID 238528, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/2385288>.

2) Shaza S. A. Mahmoud, Takashi Fukushima, Takashi Shimizu, Tomohei Nakao, Ryoko Yamaguchi, Hiroko Fukushima, Hiroki Wada, Toru Namoku, and Ryo Sumazaki. Persistent Low Level Epstein-Barr Virus DNAemia in Childhood Cancer Survivors. *Pediatric Hematology and Oncology*, 30:216-225, 2013

3) Hiroko Fukushima, Takashi Fukushima, Ryoko Suzuki, Takashi Enokizono, Maki Matsunaga, Tomohei Nakao, Kazutoshi Koike, Kensaku Mori, Kiyoshi Matsueda and Ryo Sumazaki. Continuous regional arterial infusion effective for children with acute necrotizing pancreatitis even under neutropenia. *Pediatrics International* (2013) 55, e11-e13 doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03702.x.

2. 学会発表

1) 清河信敬, 飯島一智, 中林一彦, 市川仁, 吉原宏樹, 大隅朋生, 加藤元博, 小林健一郎, 大喜多肇, 藤本純一郎, 坂本裕美, 秦健一郎, 松本健治, 吉田輝彦, 斎藤博久, 森鉄也, 福島敬, 木下明俊, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 次世代シーケンサーによる小児 Ph-like ALL のキメラ遺伝子探索. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 10 月 11 日-13 日, 2013.

2) 飯島一智, 清河信敬, 吉原宏樹, 富田理, 小林健一郎, 福島敬, 林泰秀, 菊地陽, 康勝好, 真部淳, 小原明. 小児 Ph-like ALL 症例の表面マーカー・遺伝子発現解析. 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. (プレナリーセッション)

3) Kiyokawa N, Iijima K, Yoshihara H, Ohki K, Kato M, Fukushima T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi H, Koh K, Manabe A, Ohara A. An analysis of Ph-like ALL in Japanese patients. 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, USA, December 6-10, 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

表3 ALL 関連キメラ遺伝子スクリーニング結果 (TCCSG)

	頻度(%)	H22	H23	H24	総計
総症例数		198	172	146	516
解析不能検体数		5	9	1	15
キメラ遺伝子検出症例数		50	48	45	143
TEL-AML1 検出例数	16~22 ³⁾	22	29	24	75
E2A-PBX1 検出例数	5~6 ³⁾	11	6	12	29
minor BCR-ABL 検出例数	3~5 ³⁾	9	5	3	17
major BCR-ABL 検出例数		1	0	1	2
MLL-AF4 検出例数	2 ³⁾	3	1	1	5
MLL-AF9 検出例数	<1 ³⁾	1	2	1	4
MLL-ENL 検出例数	<1 ³⁾	1	2	1	4
SIL-TAL1 検出例数		2	3	2	7

表4 ALL 関連キメラ遺伝子スクリーニング結果 (JPLSG)

	H23		H24		総計
	T-11	T-11	B-12		
総症例数	3	58	58		119
キメラ遺伝子検出症例数	1	7	13		21
TEL-AML1 検出例数	1	0	4		5
E2A-PBX1 検出例数	0	1	4		5
minor BCR-ABL 検出例数	0	1	2		3
major BCR-ABL 検出例数	0	0	2		2
MLL-AF4 検出例数	0	0	1		1
MLL-AF9 検出例数	0	0	0		0
MLL-ENL 検出例数	0	0	0		0
SIL-TAL1 検出例数	0	5	0		5
MLL-AF6 検出例数	0	0	0		0

表5 慢性骨髄性白血病疑い例における BCR-ABL スクリーニング (JPLSG)

	H22	H23	H24	総計
総検体数	17	10	20	47
minor BCR-ABL	0	0	3	3
major BCR-ABL	16	9	14	39
双方検出例	1	1	0	2

H23年度分は平成24年2月末集計

