

図2. BBJ-JCCGバイオバンク検体分譲の流れ

研究センターで保存し、JCCG内の研究者のみに分譲する。

以上の方針について小児固形腫瘍の各研究グループに諮り、大筋で合意した。ただしJNBSGのみは中央診断施設が成育外にあるため、中央診断後の余剰検体が成育を介してBBJに提供される仕組みとなった。

なお、検体分譲の際には、BBJからBBJ-IDを用いて患者を指定し、成育の検体保存センター事務局に請求する。同事務局はこれを研究グループの登録コードに置き換えてデータセンターから臨床情報を収集し、該当するBBJ-IDを付してBBJに返送する、という流れとした(図2)。

D. 考察

本邦の小児がんの治療成績は、全体的には向上してきたものの、特に固形腫瘍には未だ標準治療が確立せず、治療成績が満足すべき域に達していないものも少なくない。しかしながら、現在使用可能な薬剤による治療成績はほぼ限界に近づいており、これ以上の向上は困難と考えられる。このような点から小児がん領域における治療

開発の今後の方向性を考えた場合、成人がん領域で急速に普及しつつある分子標的薬を始めとする新規抗がん剤を、小児がん領域でも導入していく必要がある。そのためには多施設で医師主導治験まで視野に入れた臨床研究が可能な管理体制を構築するとともに、トランスレーショナル研究に必要な腫瘍サンプルが集積できるシステムの構築が必須である。さらに今日では、がんの病態解明には腫瘍細胞(体細胞)のみを対象とした異常の解析だけではなく、正常細胞(生殖細胞系列)を対象とした遺伝学的な特性や遺伝子変異の解析が必要となってきている。このため、小児がん領域においても中央診断後の余剰検体を系統的に収集・保存するだけでなく、正常細胞(主として末梢血リンパ球)も保存の対象とし、広範囲の研究者に提供することによって小児がん検体を利用した研究が実施できる体制の構築が求められている。

本分担研究では、本邦の小児がん研究グループを統合して結成されたJCCGの固形腫瘍部門を基盤として、高リスク症例を対象とした臨床試験実施のサポートを行う

とともに、匿名化のための登録とそれに続く中央診断と診断後の余剰検体保存、バイオバンクへの試料提供および検体分譲のための手順を小児固形腫瘍の研究グループ間で統一した。今後の本邦における小児固形腫瘍の研究は、このような共通の基盤に基づいて実施されるようになることが期待される。

E 結論

JCCG における小児がん研究の一環として JCCG に所属する JNBSG、JPLT、JWiTS が実施する高リスク症例を対象とした臨床試験の研究計画作成支援およびデータ管理を実施するとともに、BBJ と小児固形腫瘍研究グループが連携して臨床検体を保存し、分譲するための共通の手順を確定した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務報告）

合同検討会の実施

担当責任者 大喜多 肇 国立成育医療研究センター研究所
小児血液・腫瘍研究部分子病理研究室 室長

研究要旨

日本小児がん研究グループ（JCCG）の固形腫瘍分科会（日本小児がん臨床試験共同機構）に所属する小児固形腫瘍研究グループのうち、日本神経芽腫研究グループ（JNBSG）、日本小児肝癌研究グループ（JPLT）、日本ウイルス腫瘍研究グループ（JWiTS）が、計画・実施する高リスク症例に対する臨床試験の中央病理診断計画を作成するとともに、臨床試験参加予定施設の担当者による合同検討会を実施し、臨床試験のキック・オフを行った。小児固形腫瘍は、複数の診療科にわたり、がん種横断的に関わる担当者が多く、合同検討会実施により効率的かつ有効な検討が可能であった。

A. 研究目的

小児の神経芽腫群腫瘍、肝腫瘍、腎腫瘍には、組織型（亜型）と病期や分子異常により、リスクの高い腫瘍が存在する。我が国では、日本神経芽腫研究グループ（JNBSG）、日本小児肝癌研究グループ（JPLT）、日本ウイルス腫瘍研究グループ（JWiTS）が中心となってこれらの腫瘍に対する臨床研究を行ってきたが、他の腫瘍のグループ（リンパ腫・白血病、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、脳腫瘍）とともに質の高い臨床試験を効率的に行うために、日本小児がん研究グループ（JCCG）が結成された。本分担研究では、神経芽腫、肝腫瘍、腎腫瘍の高リスクの腫瘍の治療成績を向上させるための臨床試験の中央病理診断計画を策定するとともに、病理診断や検体保存等の基盤領域について検討するとともに、臨床試験実施のための合同検討会を実施することを目的とする。

B. 研究方法

日本小児がん研究グループ（JCCG）の

固形腫瘍分科会（小児固形がん臨床試験共同機構）に所属する臨床試験グループの合同検討会を実施し、臨床試験参加予定施設の担当者を集め、高リスク試験のキック・オフを行う、また、臨床試験についての討議を行う。日本神経芽腫研究グループ（JNBSG）、日本小児肝癌研究グループ（JPLT）、日本ウイルス腫瘍研究グループ（JWiTS）が実施する高リスク症例に対する臨床試験の中央病理診断の手順を策定し、臨床試験開始とともに実施する。

（倫理面への配慮）

中央病理診断にあたっては、説明と同意（インフォームドコンセント）の上で、対象患者個人のプライバシー保護にも配慮して、匿名化したうえで実施する。

C. 研究結果

1. 合同検討会の実施

平成 26 年 12 月 6 日に小児固形腫瘍臨床試験共同機構（JCCG 固形腫瘍分科会）運営委員会及び関連研究班との合同で、小児

固形腫瘍 6 グループ代表者および病理・放射線等基盤分野の代表者による会議を開催し、臨床試験準備及び実施の進行状況を討議し、各臨床試験とバイオバンクジャパンの検体保存に関わる連携、それに関連して小児固形がん金津研究実施計画書と小児固形がんの共通手順書の改訂についての合意を得るとともに、平成 27 年 1 月開催予定の合同検討会について討議を行った。

平成 27 年 1 月 23 日に小児固形腫瘍臨床試験共同機構（JCCG 固形腫瘍分科会）運営委員会及び関連研究班との合同で会議を開催し各研究の進捗とともに、国立成育医療研究センターにて倫理申請し承認された、バイオバンクジャパンと連携した検体保存を実施するために改訂された小児固形がん観察研究実施計画書と共通取扱い手順書が示され、共通の基盤部分について討議がなされた。

平成 27 年 1 月 24 日、25 日に、慶應義塾大学医学部にて JNBSG, JPLT, JWITS とともに、他の 3 固形腫瘍グループ（日本横紋筋肉腫研究グループ（JRSG）、日本ユウイング肉腫検討グループ（JESS）、日本小児脳腫瘍コンソーシアム（JESS））及び関連研究班とともに臨床試験参加予定施設の担当者による合同検討会を開催した。神経芽腫については、「高リスク神経芽腫に対する ICE 療法を含む寛解導入療法と BU+LPAM による大量化学療法を用いた遅延局所療法第 II 相臨床試験」JNBSG NBHR15 の臨床試験キック・オフ、その他、新規薬剤の医師主導治験について情報提供、情報交換、また、既に実施されている高リスク神経芽腫に対する遅延局所療法第 II 相試験の進捗状況報告、フォローアップ状況の報告等、討議し。肝芽腫については、「高リスク小児肝芽腫に対する Dose-dense cisplatin 療法と外科療法の多施設共同臨床第 II 相試験」のキック・オフとともに今後のプロトコルの検討、病理報告等がなさ

れた。腎腫瘍については、「Rhabdoid Tumor of the Kidney に対する集学的治療法の観察研究」についての進捗状況が説明され、また、中央病理診断報告もなされた。また、神経芽腫、肝腫瘍、腎腫瘍共通の議題として、臨床試験、中央病理診断、分子診断とバイオバンクジャパンとの連携による検体保存について進捗状況、共通基盤としてのデータセンター報告とともに討議された。各臨床試験のプロトコル、バイオバンクジャパンとの連携等の詳細は各分担研究者の項にゆずる。

2. 中央病理診断

神経芽腫、肝芽腫、腎腫瘍の高リスク腫瘍に対するプロトコルの中央病理診断については、参加施設の利便性等を考慮し、既に開始されている小児固形腫瘍観察研究と同様の方法を採用することとした。中央病理診断は、登録症例の診断の根拠となる生検・手術時の標本全て及び代表的な部位の未染色標本 10 枚を、国立成育医療研究センター内の中央病理診断事務局へ送付すること、その際に切り出し図、施設の病理診断書等の情報を添付すること、中央病理診断事務局から、腫瘍ごとに定める担当者（2 ないし 3 名）へ送付し、そのコンセンサスをもって中央病理診断とこと等を定めた。また、必要に応じて FISH 等の分子マーカー解析も実施することとした。

D. 考察

小児固形腫瘍、特に高リスク腫瘍の治療のためには、小児腫瘍内科、小児外科および関連する外科系診療科、放射線科等の複数の診療科の協力が不可欠である。神経芽腫、肝芽腫、腎腫瘍ともに、治療を担当する小児腫瘍内科、小児外科、放射線科医は、共通であり、一同に会して同時に合同検討会を行うことは、単なる時間的問題に限らず、討議をする上でのメリットも大きい。

小児固形がんの治療成績は、特に高リス

クの腫瘍を中心に、いまだに十分な治療成績が得られていないものが多い。そのためには、より精度の高いリスク分類に基づいた多施設共同臨床試験を行うとともに、そのために病理診断、放射線診断・治療、新規薬剤開発等、がん種横断的領域の基盤をより整備していくことが望まれる。本分担研究では、日本小児がん臨床研究グループの固形腫瘍分科会での高リスク腫瘍の中央病理診断の策定とともに、神経芽腫、肝芽腫、腎腫瘍等の合同検討会を実施したが、今後、合同検討会を通じてより良い治療プロトコールが開発されることが期待される。

E. 結論

高リスク小児固形腫瘍の臨床試験のために神経芽腫、肝芽腫、腎腫瘍の合同検討会を実施し、各腫瘍の高リスクプロトコールのキックオフないし概略説明を行い、討議するとともに、臨床試験の中央病理診断の計画を策定した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム・病理リスク分類による評価の実施に関する研究

担当責任者 上條 岳彦 埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所 所長

研究要旨

今年度から埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所は、JNBSG の分子診断・検体センターとして解析をスタートした。2015年2月25日までに JNBSG32 症例を受け付け、29 例を解析した。分子診断のリスク分類として、MYCN qPCR, MYCN 2-color FISH, DNA 含量解析を行い、さらに 11qLOH 解析を施行する体制を整備した。

A. 研究目的

JNBSG における高リスク神経芽腫プロトコールは、現行の「高リスク神経芽腫に対する遅延局所療法第II相臨床試験」プロトコールが進行中であり、次期高リスクプロトコールは「高リスク神経芽腫に対する ICE 両方を含む寛解導入療法と BU+LPAM による大量化学療法を用いた遅延局所療法第II相臨床試験 - JNBSG NBHR15-」である。このリスク分類には分子診断として MYCN qPCR, MYCN 2-color FISH, DNA 含量解析、11qLOH 解析が必要となる。本研究ではこの分子診断を円滑に推進し、余剰検体を適切に保管して、臨床研究・付随研究を支援することを目的とする。

B. 研究方法

1. MYCN qPCR は MYCN 遺伝子を増幅し、FAM-TAMURA プローブでラベルして解析する。NAGK 遺伝子を VIC-TAMURA プローブラベルで解析し、MYCN 値を NAGK 値で標準化する。

2. MYCN 2-color FISH は LLSI N-MYC (2p24)/CEP Dual color ProbeSet を使用して、蛍光顕微鏡で鏡検する。

3. DNA 含量解析は、PI 染色後に BD FACSCalibur™ を用いて解析する。

4. 11qLOH 解析は、アジレント社の SureScan マイクロアレイスキャナを用いて解析する。

（倫理面への配慮）

全ての検体は臨床各施設において連結可能匿名化されて埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所に送付され、解析後に結果を匿名化番号にて報告している。研究者の説明に基づき自由意思により研究に参加する者のみを研究対象とする。本研究はヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省告示）」に従って実施する。

本研究計画遂行に当たっては「ヒトゲノム研究に関する基本原則」（科学技術会議生命倫理委員会）を十分に理解し、「ヒトゲノム・遺伝子 解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省共同告示第1号）（平成16年12月28日全部改正）（平成17年6月29日一部改正）（平成20年12月1日一部改正）」を遵守して実施する。また、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に該当

する研究を包含する研究申請を行い、承認済みである。

C. 研究結果

2014年11月17日からJNBSGの分子診断・検体センターとして解析をスタートして、2015年2月25日までにJNBSG32症例を受け付け、29例を解析した。解析中が3例である。高リスク該当症例は18/29症例であった。解析結果は、MYCN コピー数 増幅 8/18 例、Gain 1/18 例、等倍 9/18 例であった。DNA 含量では diploidy 10/18 例、Diploidy+Hyperdiploidy 4/18 例、未検査 4/18 例を示した。

D. 考察

2014年11月17日からJNBSGの分子診断・検体センターとして解析をスタートし、順調に分子診断を行っている。

次期の高リスクプロトコールは「-JNBSG NBHR15-」であり、既に1例が登録されている。リスク分類に INRG 分類を用いて国際標準化を検討することから、11qLOH 解析を円滑に行う必要があり、マイクロアレイを使用して他のゲノムリスクの判定と共に行っていくことを検討していく。

今後も神経芽腫高リスク症例の円滑な臨床試験の推進を目指して、ゲノム・病理リスク分類における分子診断を順調に行っていくことを継続したい。

E. 結論

今年度から埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所は、JNBSGの分子診断・検体センターとして解析をスタートした。2015年2月25日までにJNBSG32症例を受け付け、29例を解析した。

G. 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(corresponding author). Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway. *Eur J Cancer*. 50(8): 1555-1565, 2014.

2) Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y. RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. *Cancer Lett*. 348(2014): 167-176, 2014.

3) 上條岳彦、檜山英三、肝芽腫の診断と治療、「最新肝癌学」、日本臨牀社、2014.

2. 学会発表

上條岳彦。「多診療科医師合同シンポジウム 難治性固形腫瘍を考えるー基礎から臨床まで：神経芽腫」神経芽腫の基礎生物学 Basic Biology of Neuroblastoma. 第56回小児血液・がん学会学術集会. 2014年11月28~30日. 岡山市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

次世代シーケンシングによる治療反応性関連遺伝子の解明

担当責任者 檜山 英三 国立大学法人広島大学自然科学研究支援開発センター 教授

研究要旨

日本小児肝がんグループスタディの治療プロトコールに参加した高リスク群症例のうち治療奏功例と非奏功例を対象に、その原発巣から抽出した DNA, RNA を用いてエクソーム解析、RNA シークエンス解析を行い、治療抵抗性に関係する遺伝子の同定を行った。具体的には、次世代エクソーム解析と RNA シークエンスの結果から、リスク分類毎に検討し、特に高リスク肝芽腫で変異が高率に出現している遺伝子や発現が変動している遺伝子候補を抽出した。その結果、肝芽腫に集中的発生している遺伝子変異とともに、Wnt/ β カテニンシグナル標的遺伝子発現調節に係る変異が認められた。さらに、遺伝子発現解析から TERT の活性化から BRG1 (also called SMARCA4), a SWI/SNF-related chromatin remodeling protein を介して β -catenin-TCF 複合体を活性化している経路の関与が悪性度に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

小児がん全体の治癒率が上昇してきているが、進行神経芽腫や腎ラブドイド腫瘍、高リスク肝芽腫など小児固形がんの一部は、現在もなお予後不良である。これには、環境因子がほとんど関与しない小児がんの発がんの多様性と、発生過程における正常プログラムの破綻が関係していることが示唆されていたが、具体的な証明は得られていなかった。神経芽腫においては、MYCNをはじめ悪性度と関連した分子マーカーが見出されているが、肝芽腫においては臨床的に有用なバイオマーカーは未だない。肝芽腫は、神経芽腫や腎芽腫とともに小児の中でも乳幼児期に好発し、そのほとんどが4歳までに発症する。さらに、近年、低出生体重児に肝芽腫が好発することもしられている。そこで、小児肝がん研究グループ(JPLT)で2000年ころから蓄積してきた腫瘍と正常のペア検体を持ちいて、今回の検討をおこなった。肝

芽腫の発生進展に関わるものとしてWnt/ β

-catenin シグナル系の異常があり、さらに、テロメラーゼの活性化が予後と関連している可能性を報告し、JPLTではそれらの検討をおこなってきた。そこで、本研究班では、肝芽腫では、Wntシグナルの異常、テロメラーゼ活性化などとの関連も含めて、臨床検体を用いて解析し、バイオマーカーの探索も行った。

B. 研究方法

JPLT2 プロトコールにて治療した 300 例以上の症例のうち、治療前に、正常組織と腫瘍組織が同意を得て保存されている症例のうち、正常組織 DNA、腫瘍 DNA、腫瘍 RNA が高グレードで十分量分離保存されている 49 例を対象とした。

PRETEXT 分類では I: 9, II: 15, III: 16, IV: 9 で、遠隔転移を 13 例に認めていた。

リスク分類は、次のように定義している。標準

リスク肝芽腫は、組織学的に肝芽腫と診断され、PRETEXT 分類 I, II, III でかつ、PRETEXT の追加因子として、M1, P2, V3, E, H, N 因子のいずれもないもので、血清アルファフェトプロテイン (AFP) が 100 ng/ml 以上の症例としている。遠隔転移のある症例または血清 AFP が 100 ng/ml 未満の症例を超高リスク群とし、その他の症例を高リスク群としている。

1) 遺伝子変異検索：正常組織（正常肝組織または血液細胞）由来の DNA と治療前腫瘍組織の DNA を用いて、エクソーム解析 (True Seq イルミナ社製) を用いて、全エクソン領域の各遺伝子変化について検討した。データ解析には、広島大学で開発した解析用システムを用いた。さらに上記の症例のうち、Wnt シグナル系の異常は、CTNNB1 (β -catenin) に加え、APC, Axin1, Axin2 の変異を検索した。

2) 遺伝子発現検索：さらに、腫瘍からの十分量かつ質の高い RNA が抽出できた 34 例について RNA シークエンス解析 (イルミナ社製) にて、腫瘍の遺伝子発現を網羅的に検討した。Wnt シグナル系の標的遺伝子としては、MYC, cyclin D1, Axin, survivin, MMP7 について検討した、

3) リアルタイム PCR 法の検討：
エクソーム解析での遺伝子変異を高頻度に認めた遺伝子や、RNA シークエンスで発現の変化を認めた遺伝子は、リアルタイム PCR にてその発現レベルを検索した。

4) テロメアバイオロジー関連遺伝子検索
今回は腫瘍と正常組織の由来 DNA を制限酵素 Hinf I 処理して、テロメアプローブ (TTAGGG)₄ でのサザンブロット法で得られるシグナルの長

さ TRF (terminal restriction fragment) 長を測定した。また、TRAP (telomeric repeat amplification protocol) 法にてテロメラーゼ活性を測定するとともに、ヒトテロメラーゼの触媒部分である TERT (telomerase reverse transcriptase) の発現レベルを RT-PCT で測定した。また、Wnt/ β -カテニンシグナルとの関連を検討した結果、TERT が BRG1 (also called SMARCA4), a SWI/SNF-related chromatin remodeling protein を介して β -catenin-TCF 複合体を活性化することで、Wnt/ β カテニンシグナル依存性蛋白の発現を亢進させていることが明らかになっている。そこで、TERT と β catenin の間の存在し β catenin 調節を行っている BRG-1 (SMARCA4) 遺伝子発現を同様に RT-PCR 法にて検討した。

上記の結果から、肝芽腫のバイオマーカーとなりうる候補遺伝子について検討した。

C. 研究結果

1) 遺伝子変異検索：

エクソーム解析の結果から、肝芽腫検体では様々な変化が見出されたが、49 症例で正常検体に比べて高頻度に変化を認めた遺伝子が 323 遺伝子を抽出した。そのうち、上位 15 遺伝子について検索した。このうち 3 つがムチン関連遺伝子 (MUC) であり、これらの発現が肝芽腫発症に関連している可能性が示唆された。

さらに、インプリンティング関連遺伝子、肝細胞増殖因子、さらに転写因子がみとめられ、これらの変異が癌化や悪性度と関連している可能性が示唆された。

さらに 1 番及び 2 番染色体異常が数多くみだされ、特に予後不良例に染色体異常が多くみられた (図 1)。こうした、染色体異常部位に存在する

遺伝子の機能を検索すると（図2）、細胞増殖、がん化、再生に関わる遺伝子が多く存在していた。

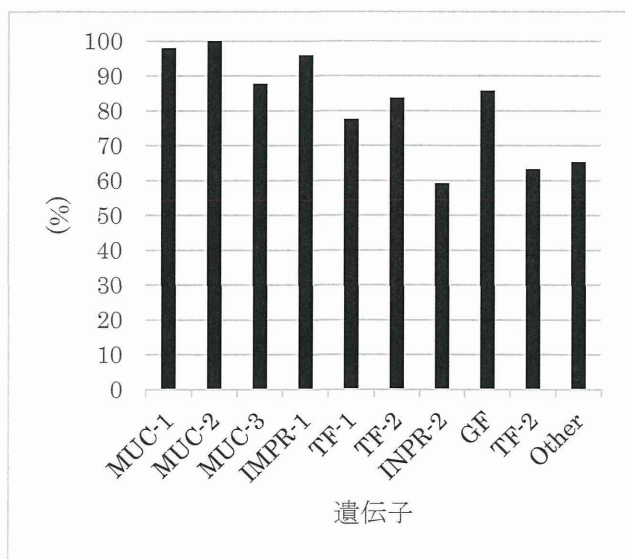


図1：エクソーム解析から高頻度に変異が検出された遺伝子 MUC:ムチン関連遺伝子、IMPR:インプリンティング関連遺伝子、TF:転写因子、Other:その他

2) 遺伝子発現検索

層別化クラスタリングにて、遺伝子発現量の差で高リスク群、超高リスク群症例を層別しうる遺伝子が 232 遺伝子抽出された。これらの遺伝子の詳細までは検討するに至らなかったが Wnt シグナル系の遺伝子や AFP、HGF などは含まれていた。一部の解析から、アミノ酸や解糖経路の代謝経路に関わる遺伝子群、胎児発生における転写後調節に関わる遺伝子群が見出された。

3) リアルタイム PCR 法の検討：

高頻度に遺伝子変異を認めた MUC 遺伝子群とインプリンティング遺伝子に関して、49 例を含む肝芽腫検体 cDNA を用いたリアルタイム PCR を

施行した。MUC 遺伝子は、肝細胞にては通常発現していない遺伝子であり、これらが発現誘導されている腫瘍が見出された。また、インプリンティング遺伝子の 2 遺伝子は、ほとんどの腫瘍にて、遺伝子誘導が認められた。

また、これらの遺伝子群には、TERT や Wnt シグナルターゲット遺伝子が含まれていた。

4) テロメアバイオロジーの検討：

テロメラーゼ活性レベルが予後と関連した。しかし、興味あることに、TERT 発現レベルは、高リスク、長江陸腫瘍で活性化が顕著であった。そこで、Wnt シグナルターゲット遺伝子の発現レベルを比較検討した。その結果、検索した 6 遺伝子ともに TERT 高発現腫瘍の方が高値であり、特に 3 遺伝子 (MYC, CCND1, ABCSB1) は有意に高値であった。(P < 0.05)

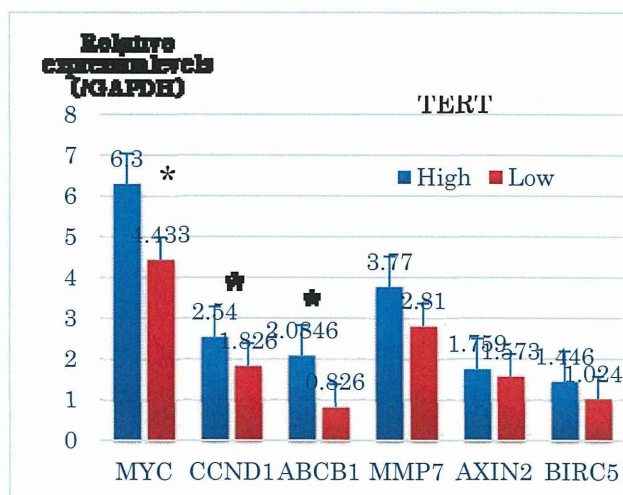


図2：TERT 発現と Wnt/β catenin 標的遺伝子の発現量 (* : P < 0.05)

D. 考察

肝芽腫検体のエクソームの解析の結果、ムチン関連遺伝子、インプリンティング遺伝子、さらに一部の転写因子が、肝芽腫の発症と進展に関与し

ていることが示唆された。さらに、RNA シークエンスの結果で抽出された遺伝子群にもこれらの関連した遺伝子や下流の遺伝子が含まれていた。遺伝子発現の定量的解析が十分に施行できていないが、ムチン関連遺伝子、インプリンティング遺伝子、が肝芽腫発症と、悪性度の上昇に関与していると考えられた。

遺伝子発現解析で抽出された遺伝子群の中に TERT や Wnt シグナルターゲット遺伝子がふくまれていたことから、TERT の発現を 2 群に分けて Wnt シグナルターゲット遺伝子の発現の比較検討を行った。RT-PCR での検討結果は、Wnt/ β -カテニン標的遺伝子である MYC, CCND1 and ABCB1 遺伝子の活性化レベルが TERT の活性化と連動しており、従来の検討から TERT の発現レベルが予後と関連していたことから、これらの遺伝子発現が悪性度を左右していると考えられた。よって、これらの遺伝子発現レベルが悪性度のバイオマーカーとなりうるとともに、Wnt/ β -カテニンシグナルの抑制が治療の標的となる可能性が示唆された。さらに、TERT の発現として c-myc が強力なプロモーターであることが知られており、c-myc は Wnt/ β -カテニンシグナルの標的遺伝子であることから、Wnt/ β -カテニンシグナルで活性化した c-myc が TERT の発現を亢進させて、さらに c-myc の発現が促されることになる悪循環が生じ、細胞はさらに増殖に向かうことになり、これが悪性化の一因と考えられた。

以上から、肝芽腫の発症には、胎内でのエピジェネティックな変化と一部ゲノムレベルでのジェネティックな変化が関与していることが示唆された。中でも Wnt/ β -catenin シグナルの異常によって癌化し肝芽腫が発症し、さらに、TERT や c-myc の活性化が悪性度の上昇に関与している可能性が示唆された(図 3)。これらの機序をさ

らに解明すべく、現在、メチル化解析や次世代シークエンサーデータの詳細な解析を、今後行う予定である。これらの成果が得られれば、個々の活性化ルートに依存した分子標的療法が可能となると考えられる。

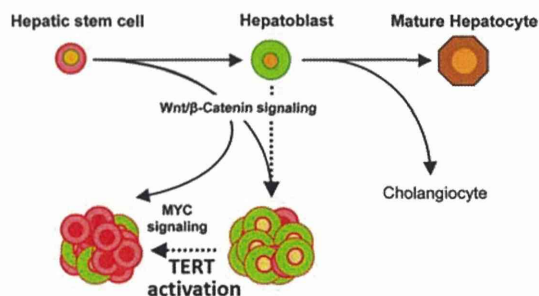


図 3 : 肝芽腫の発生機序と悪性化機序

E. 結論

肝芽腫検体のエクソームと RNA シークエンス解析の結果、ムチン関連遺伝子、インプリンティング遺伝子、さらに一部の転写因子が、肝芽腫の発症と進展に関与していることが示唆された。また、RNA シークエンスやリアルタイム PCR から、肝芽腫の発症と進展には、TERT や Wnt/ β -カテニン標的遺伝子群の発現レベルの変化が関与していた。これらの詳細な検討から、肝芽腫診断や悪性度評価の新たなバイオマーカーが見出せることが期待される。さらに、これらから分子標的を見出せれば、新たな治療法開発につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiyama E. Pediatric Hepatoblastoma: diagnosis and treatment. *Translational Pediatrics*, in press
- 2) Czauderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, Häberle B, Malogolowkin MH, Meyers RL. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy.

Curr Opin Pediatr. 2014 26:19-28. doi:
10.1097/MOP.0000000000000046.

2. 学会報告等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務報告）

「ラブドイド腫瘍の予後予測と治療有効性（微小遺残病変：MRD）に関わる遺伝子解析」に関する研究

担当責任者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 参与

研究要旨

腎ラブドイド腫瘍の長期生存率は25-30%であり、最も予後不良な小児がんである。これまでの研究によると、原因遺伝子はSMARCB1であり、その変異により発生する。腎ラブドイド腫瘍の発生にSMARCB1胚細胞変異がどのような頻度で関与するのか、予後予測や治療効果のモニタリングに使用可能なバイオマーカーの開発をめざして、研究を開始した。

A. 研究目的

ラブドイド腫瘍は小児腎腫瘍の7%を占め、長期生存率25-30%の最も予後不良な小児がんである。これまでの研究により、原因遺伝子はSMARCB1であり、その変異により発生する。欧米の報告では患者の1/3は胚細胞変異により、残り2/3は体細胞変異により生じているが、わが国の多数例を対象にした腎ラブドイド腫瘍に対する胚細胞遺伝子研究は、これまで行われてこなかった。

生存率改善のためには、25-30%の長期生存者に発生する腫瘍と予後不良患者の腫瘍の遺伝子異常やメチル化異常に違いを明らかにすること、その結果から予後予測や治療効果のモニタリングに利用できるバイオマーカーを開発することが重要である。ラブドイド腫瘍の発生に関与するSMARCB1胚

細胞変異の頻度を明らかにすること、およびバイオマーカーの開発が、研究の目的である。

B. 研究方法

これまでに日本腎芽腫スタディグループ（JWITS）で収集した腎ラブドイド腫瘍検体30例と、これから開始されるラブドイド腫瘍の治療研究の登録例を研究の対象にする。SNPアレイCGHによる染色体異常の解析、SMARCB1遺伝子変異解析、同一患者の腫瘍と正常腎組織が対となった検体を対象にする、網羅的遺伝子発現・メチル化解析を実施する。

（倫理面への配慮）

検体を研究に使用することについて、親から文書で同意を得た。

C. 研究結果

これまで JWITS で収集したラブドイド腫瘍は30例である。そのうち10例では、正常腎組織または末梢血がペアで保存されていた。腫瘍30例の SNP アレイ解析を開始した。原因遺伝子である SMARCB1 の位置する 22q11.2 部位にホモ欠失またはヘミ欠失を示す腫瘍、同部位に異常のない腫瘍に分類された。22番染色体以外の染色体異常については、腎芽腫に比して少ない傾向を示した。

D. 考察

研究を開始したばかりなので、考察に耐えるデータは出ていない。ラブドイド腫瘍の原因遺伝子 SMARCB1 の位置する 22q11.2 の欠失が、もっとも頻度の高い染色体異常であるようだ。22q11.2 欠失のない腫瘍や同部のヘミ欠失を示す腫瘍については、SMARCB1 遺伝子の微小変異があると予想して、塩基配列解析を実施する予定である。

欧米の研究によると、ラブドイド腫瘍の30%は SMARCB1 胚細胞遺伝子変異により発生すると報告されている。これまで我が国では、SMARCB1 胚細胞変異研究はまったく行われてこなかったもので、正常組織、末梢血の保存してある10例について SMARCB1 変異解析を実施し、我が国のラブドイド腫瘍患者の中に胚細胞遺伝子変異のある患者がどのくらいいるのか、明らかにしたい。

E. 結論

多数のラブドイド腫瘍を対象にした遺伝子研究を開始した。腎芽腫の頻度や遺伝子異常は日欧で著しく異なるが、ラブドイド腫瘍においても同様な所見が得られるのかどうか、研究結果が待たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kumon K, Kaneko Y. Social and biological factors influencing the outcomes of children with Wilms tumors in Kenya and other Sub-Saharan countries. *Transl Pediatr* 3(1): 42-46, 2014.
- 2) Oue T, Koshinaga T, Okita H, Kaneko Y, Hinotsu S, Fukuzawa M. Bilateral Wilms tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol. *Pediatr Blood Cancer* 61(7): 1184-1189, 2014.
- 3) Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y. RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. *Cancer Letters* 348(2014): 167-176, 2014.
- 4) Izumi H, Kaneko Y. Trim32 facilitates degradation of MYCN on spindle poles and induces asymmetric cell division in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 74(19): 5620-5630, 2014
- 5) Izumi H, Kaneko Y. Symmetry breaking

in human neuroblastoma cells. Mol Cell Oncol. 1, e968510, 2014.

- 6) Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Tanaka Y, Horie H, Hinotsu S, Koshinaga T, Yoneda A, Ohtsuka Y, Taguchi T, Fukuzawa M. A high incidence of WT1 abnormality in bilateral Wilms tumors in Japan and the penetrance rates in children with WT1 germline mutation. Brit J Cancer 2015 Feb 17 ahead of print

2. 学会発表

- 1) Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Koshinaga T, and Fukuzawa M. Parental inheritance and WT1 abnormality types may affect the penetrance rate of hereditary Wilms tumor. Am Soc Hum Genet 64th Ann Meet Oct 2014 San Diego, CA, USA.
- 2) 金子安比古、大喜多肇、春田雅之、新井康仁、大植孝治、越永従道、福澤正洋：WT1 遺伝子異常タイプとその親由来が遺伝性 Wilms 腫瘍の浸透率に影響する。日本人類遺伝学会第 59 回大会。2014.11. 東京都。
- 3) Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Koshinaga T, Yoneda A, Ohtsuka Y, Fukuzawa M. Parental inheritance and WT1 abnormality types may affect the penetrance rate of hereditary Wilms tumor. 第 56 回日本小児血液・がん学会。2014.11. 岡山市。

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

III. 学会等発表実績

委託業務題目「難治性小児悪性固形腫瘍における診断バイオマーカーの同定と新規治療法」

機関名 広島大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
肝芽腫の縦隔再発に対してICG蛍光法を使用した経験（口頭）	栗原 将, 鬼武美幸, 小倉 薫, 檜山英三	岡山市 (第55回日本中国四国小児がん研究会)	2014/4/26	国内
Detection of Cancer Stem Cells in Childhood Cancers (口頭)	Hiyama E.	Dailen, China (BIT' S 4th Annual World Congress of Molecular & Cel)	2014/4/27	国外
JPLT (肝芽腫) (口頭)	檜山 英三	大阪市 (第51回日本小児外科学会)	2014/5/9	国内
小児がん (口頭)	檜山英三	東京都 (がん政策サミット)	2014/5/17	国内
Telomere Biology in Neuroblastoma: Focusing on ATRX/DAXX Genes and Alternative-Strengthening of Telomere (ALT) (ポスター)	Hiyama E.	Cologne, Germany (ANR Congress 2014)	2014/5/13-16	国外
Central venous catheter-related complications in children with malignancy (ポスター)	Kurihara S, Hiyama E, Onitake Y, Miki M, Nakamura K, Kawaguchi H, Kobayashi M	Calgary, Canada (PAPS2014)	2014/5/25-29	国外
Clinical feature of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma (ポスター)	Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Yamaoka E, Fukuba I, Hiyama K	Calgary, Canada (PAPS2014)	2014/5/25-29	国外
Surgical managements for refractory neuroblastoma in young children (ポスター)	Hiyama E, Kurihara S, Onitake Y, Ueda Y, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kobayashi M	Edinburgh, Scotland. (BAPS61st Annual Congress)	2014/6/22-25	国外
DNAメチル化解析による肝芽腫の新規予後予測マーカーの確立 (口頭)	本多昌平, 湊 雅嗣, 鈴木 拓, 春田雅之, 金子安比古, 檜山英三, 武富紹信	横浜市 (第73回日本癌学会学術集会)	2014/9/25	国内
小児固形腫瘍における循環遊離DNAと循環がん細胞のがん診断への応用 (口頭)	檜山英三, 檜山桂子, 林 陽子, 森原なぎさ, 平野尚子, 福場郁子, 山岡絵美, 栗原 将	横浜市 (第73回日本癌学会学術集会)	2014/9/27	国内
Outcome and morbidity of primary resection of hepatoblastoma in JPLT-1 and 2 protocols (ポスター)	Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, yano M, Oue T, Iehara T, Hoshino K, Koh K, Tanaka Y, Kurihara S	Toronto, Canada (S10P2014)	2014/10/22-25	国外
Molecular diagnosis of lung cancer	Hiyama E	Bali, Indonesia (APSR2014)	2014/11/13	国外
肺転移を有した肝芽腫6例の外科的検討 (口頭)	栗原 将, 鬼武美幸, 三木瑞香, 中村和洋, 小林正夫, 檜山英三	岡山市 (第56回日本小児血液・がん学会学術集会)	2014/11/28-30	国内
Surgical Strategy for Mediastinal Neuroblastic Tumors in Children: a Single Institution Experience (ポスター)	Fumino S, Furukawa T, Aoi S, Higuchi K, Sakai K, Iehara T, Hosoi H, Tajiri T	Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research)	2014/5/13-16	国外

Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in rat models of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia (口頭)	Sakai K, Kimura O, Furukawa T, Higuchi K, Wakao J, Kimura K, Fumino S, Aoi S, Masumoto K, Tajiri T	Canada (The 47th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons)	2014/5/24-29	国外
Validity and reliability of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from 2 territorial centers in Japan (ポスター)	Fumino S, Kimura K, Iehara T, Nishimura M, Nakamura S, Souzaki R, Nishie A, Taguchi T, Hosoi H, Tajiri T.	Tront, Canada (46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology)	2014/10/21-26	国外
Japan Neuroblastoma Study Group (JNBSG) MYCN amplification is not solely the prognostic factor in treating of high-risk neuroblastoma : a late phase II study of Japan Neuroblastoma Study Group (JNBSG) (ポスター)	Matsumoto K, Shichino H, Kuroda T, Hishiki T, Soejima T, Kaneko T, Nakazawa A, Takimoto T, Takahashi H, Fukushima T, Hara J, Kaneko M, Ikeda H, Tajiri T, Nakagawara A	Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research)	2014/5/13-16	国外
Mega-dose double conditioning chemotherapy of Thiotepa and Melphalan is feasible about renal function for the treatment of pediatric solid tumor (ポスター)	Yamazaki F, Kiyotani C, Shioda Y, Osumi T, Terashima K, Tomizawa D, Matsumoto K	Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research)	2014/5/13-16	国外
進行神経芽腫に対する化学療法 (口頭) (シンポジウム)	松本公一	岡山市 (第56回日本小児血液・がん学会学術集会)	2014/11/28-30	国内
JNBSG Feasibility of delayed local control treatment in patients with high risk Neuroblastoma : report of a pilot study from the Japan Neuroblastoma Study Group (JNBSG) (ポスター)	Shichino H, Matsumoto K, Iehara T, Takimoto T, Takahashi H, Nakazawa A, Tajiri T, Masaki H, Fukushima T, Hara J, Ikeda H, Mugishima H, Nakagawara A	Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research)	2014/5/13-16	国外
Diagnostic usefulness of (18)F-FDG-PET/ CT for detection of extramedullary disease in children with acute myeloid leukemia: three cases report (ポスター)	Matsui M, Okuma Y, Yamanaka J, Uryu H, Sato N, Shichino H, Matsushita T	Toronto(The 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology)	2014/10/21-26	国外
A preliminary report of a diagnostic study with (18)F-FDG-PET (PET) for detection of extramedullary disease (EMD) in pediatric acute myeloid leukemia (AML) (ポスター)	Matsui M, Okuma Y, Yamanaka J, Uryu H, Mori N, Sato N, Shichino H, Mastushita T	岡山市 (The56th Congress of JSPHO)	2014/11/28-30	国内
THE NEW GUIDELINE FROM THE INTERNATIONAL NEUROBLASTOMA RISK GROUP (INRG) PROJECT HAS PROFOUND EFFECTS ON CLINICAL TRIALS WHICH EMPLOYED IMAGE DEFINED RISK FACTORS (ポスター)	Yoneda A, Nishikawa M, Inoue M, Soh H, Tazuke Y, Yamanaka H, Nomura M, Deguchi K, Matsuura R, Fukuzawa M, Tajiri T, Iehara T, Nakagawara A.	Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research 2014)	2014/5/13-16	国外

CHARACTERISTICS OF IMAGE DEFINED RISK FACTORS (IDRFs) IN PATIENTS ENROLLED THE LOW RISK PROTOCOL (JNB-L-10) FROM THE JAPAN NEUROBLASTOMA STUDY GROUP (JNBSSG) (ポスター)	Yoneda A, Tajiri T, Iehara t, Kitamura M, Nakazawa A, Takahashi H, Takimoto T, Nakagawara A.	Toronto, Canada (SIOP (46th))	2014/10/22-25	国外
神経芽腫マス・スクリーニング休止後の臨床像の変化—小児の外科的悪性腫瘍登録データの解析より— (口頭)	米田光宏, 田尻達郎, 伊勢一哉, 大植孝治, 小野 滋, 佐藤智行, 杉藤公信, 菱木知郎, 平井みさ子, 文野誠久, 本多昌平, 風間道郎, 杉山正彦, 中田光政, 仲谷健吾, 脇坂宗親, 近藤知史, 上原秀一郎, 鬼武美幸, 木下義晶, 米倉竹夫, 檜山英三, 家原知子	広島市 (第41回日本マス・スクリーニング学会)	2014/8/22-23	国内
肛門管癌 VMAT による陰部皮膚炎の軽減効果 (口頭)	太田陽介, 川口弘毅, 村岡修, 辻野佳世子, 副島俊典, 小坂賢吾, 西田素子, 田代康介, 山本佳子, 西村美穂, 橋口周子	東京都 (日本放射線腫瘍学会第27回日本高精度放射線外部照射研究会)	2015/2/22	国内
咽頭摘出後の放射線治療における笛型電気式人工咽頭を用いたコミュニケーション手段の有用性 (口頭)	嘉村陽子, 岩江信法, 平山裕次, 米澤宏一郎, 入江啓介, 夢原瞬, 副島俊典, 辻野佳世子, 太田陽介, 川口弘毅, 村岡修, 木村紳一郎, 荻野匡俊, 藤田郁夫	東京都 (第38回日本頭頸部癌学会)	2014/12/13	国内
患者選択による温存乳房部分割照射と通常分割照射: 選択割合と急性反応について (口頭)	川口弘毅, 辻野佳世子, 松本葉子, 太田陽介, 副島俊典	大阪市 (第307回日本医学放射線学会関西地方会)	2014/6/12-13	国内
Combining V20, VS5, pulmonary fibrosis, and age improves prediction of radiation pneumonitis after chemoradiotherapy for NSCLC (口頭)	Tsujino K, Hashimoto t, Shimada T, Ota Y, Yoden E, Fujii O, Satouchi M, Negoro S, Adachi S, Soejima T.	神戸市 (The 15th Asian Oceanian Congress of Radiology.)	2014/9/24-28	国内
N2非小細胞肺癌に対する導入化学放射線療法; WJOG5308L (口頭)	副島俊典	京都市 (第55回日本肺癌学会学術集会)	2014/11/14-16	国内
皮膚リンパ腫に対する放射線治療 (ポスター)	副島俊典, 辻野佳世子, 太田陽介, 松本葉子, 田代康介, 小坂賢吾, 黒田明, 土井久典, 村山徹, 村田洋三	横浜市 (日本放射線腫瘍学会第27回学術大会)	2014/12/11-13	国内
放射線診断肺炎で死なせないために (口頭)	辻野佳世子, 川口弘毅, 松本葉子, 太田陽介, 副島俊典	横浜市 (日本放射線腫瘍学会第27回学術大会)	2014/12/11-13	国内
「多診療科医師合同シンポジウム 難治性固形腫瘍を考える—基礎から臨床まで: 神経芽腫」 神経芽腫の基礎生物学Basic Biology of Neuroblastoma (口頭)	上條岳彦	岡山市 (第56回日本小児血液・がん学会学術集会)	2014/11/28-30	国内
Tumor sphere specific transcription factor CDX1 regulates stem cell-related gene expression and aggressiveness in neuroblastoma (ポスター)	Takenobu H & Kamijo T	Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research)	2014/5/13-16	国外
Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulates MYCN/ATM/p53 pathway (ポスター)	Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T.	Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research)	2014/5/13-16	国外
Parental Inheritance and WT1 abnormality types may affect the penetrance rate of hereditary Wilms tumor (ポスター)	Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Koshinaga T, and Fujiwara Y	San Diego, California, USA (American Society of Human Genetics, 64 th Annual Meeting)	2014/10/18-22	国外

WT1 遺伝子異常タイプとその親由来が遺伝性Wilms 腫瘍の浸透率に影響する (口頭)	金子安比古、大喜多肇、春田雅之、新井康仁、大植孝治、越永従道、福澤正洋	東京都 (日本人類遺伝学会第59回大会)	2014/11/19-22	国内
Parental inheritance and <i>WT1</i> abnormality types may affect the penetrance rate of hereditary Wilms tumor (口頭)	Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Koshinaga T, Yoneda A, Ohtsuka Y, Fujiwara Y	岡山市 (第56回日本小児血液・がん学会学術集会)	2014/11/28-30	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Pediatric hepatoblastoma: diagnosis and treatment	Hiyama E	Translational Pediatrics	2014年	国外
Clinical features of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma	Kurihara S, Hiyama E, Onitake Y, Yamaoka E, Hiyama K	Journal of Pediatric Surgery	2014年	国外
FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions	Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E, Yamamoto T	Genes Cells	2014年	国外
Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy	Czuderna P, Lopez-Terrada D, Hiyama E, Häberle B, Malogolowkin MH, Meyers RL	Current Opinon in Pediatrics	2014年	国外
NCYM, a Cis-Antisense Gene of MYCN, Encodes a De Novo Evolved Protein that Inhibits GSK3 β Resulting in the Stabilization of MYCN in Human Neuroblastomas	Suenaga Y, SM Rafiqul Islam, 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, Nakagawara A	PLOS Genetics	2014年	国外
Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma	Nakamura Y, Suganami A, Fukuda M, Hasan MK, Yokochi T, Takatori A, Satoh S, Hoshino T, Tamura Y, Nakagawara A	Cancer Medicine	2014年	国外
Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults. A report from the International Neuroblastoma Risk Group Project	Mosse YP, Deyell RJ, Berthold F, Nakagawara A, Ambros PF, Monclair T, Cohn SL, Pearson AD, London WB, Matthay KK	Pediatric Blood	2014年	国外
Efficacy of preoperative transcatheter arterial chemoembolization combined with systemic chemotherapy for treatment of unresectable hepatoblastoma in children	Hirakawa M, Nishie A, Asayama Y, Fujita N, Ishigami K, Tajir T, Taguchi T, Honda H.	Japanese Journal of Radiology	2014年	国外
Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in a rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia	Sakai K, Kimura O, Furukawa T, Fumino S, Higuchi K, Wakao J, Kimura K, Aoi S, Masumoto K, Tajiri T	Journal of Pediatric Surgery	2014年	国外
Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children	Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S.	Ann Hematol	2014年	国外