

ノン・ハイリスク群小児悪性固形腫瘍の安全性と治療後QOLの向上への新たな標準治療法開発のための多施設
共同臨床研究

ゲノム・病理・血清リスク分類による評価

研究分担者 高木正稔（東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 講師）

研究要旨： ノンハイリスクの神経芽腫を同定するための方法について、ゲノム、病理学的観点から検討を行った。神経芽腫病理組織を検討し、ステージI、IIの腫瘍ではDNA損傷応答機構の活性化が起こっていることが明らかとなった。またステージIII、IVではDNA損傷応答機構の活性化が認められない症例が多く、DNA損傷応答機構のキープレーヤーであるATMの欠損が認められる症例があった。これは従来から報告されている神経芽腫における11q欠損例にあたった。MYCN増幅は神経芽腫の予後不良因子であるが、それを同定するための簡便な方法を確立した。

A. 研究目的

ノンハイリスクの神経芽腫を同定するための方法について、ゲノム、病理学的観点から検討を行う。で、ATMは毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (AT) の責任分子でDNA損傷応答において中心的な役割を持つ分子である。神経芽腫でしばしば欠失が報告されている染色体11qに位置する。神経芽腫のリスクとDNA損傷応答がどのような関係にあるか病理学的な検討を行う。またゲノムレベルでATMの異常について検討する。MYCN増幅は神経芽腫の予後不良因子であることが知られている。MYCN増幅はサザンプロット、FISH法などにより診断されるが、検出方法が煩雑であることが難点である。デジタルPCRをもちいてより簡便なMYCN増幅の検出方法を確立する。

B. 研究方法

神経芽腫病理組織を用い ATM のリン酸化を指標に DNA 損傷応答を免疫組織染色により検討した。

腫瘍 DNA を用いて、マイクロサテライト解析

により ATM の欠損を検討した。

デジタル PCR で Evergreen 色素を用いて MYCN 増幅を検出した。

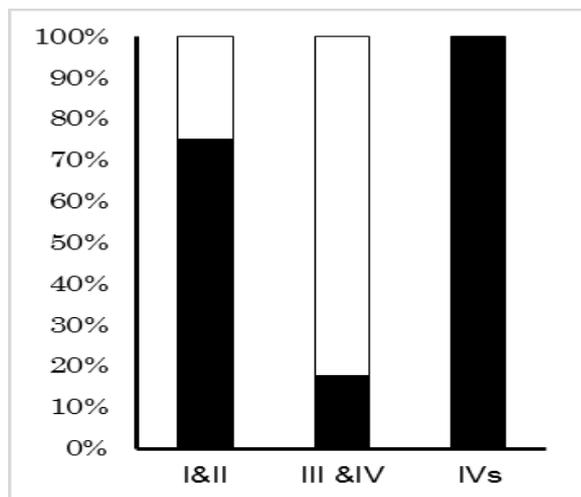
（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。

C. 研究結果

DNA損傷応答機構が起こると、ATMのリン酸化が起こることが知られている。このATMのリン酸化を指標に、DNA損傷応答の活性化をモニタリングすることができる。25例の神経芽腫由来組織をATMリン酸化特異抗体で免疫組織染色したところ、ステージI、IIの腫瘍ではATMのリン酸化が認められ、DNA損傷応答機構の活性化が起こっていることが明らかとなった。一方ステージIII、IVではATMのリン酸化の認められない例が多く、DNA損傷応答機構の活性化が起こっていない例が多いことが明らかとなった（図1）。また一部の症例でATMの発現量自体も減弱していた。

図1

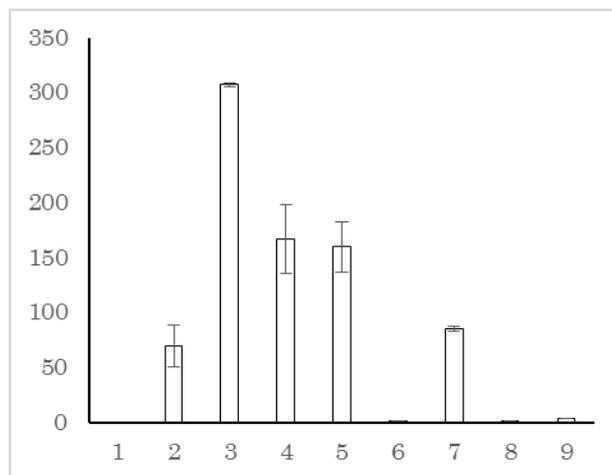


黒色のカラムはATMのリン酸化が起こっていた例の割合、白色のカラムはATMのリン酸化が認められなかった例の割合

いくつか神経芽腫細胞株についてFISH法を用いてATM領域の欠失を検討したところ、NMB、SK-N-AS、NGP、SK-N-DZでATM領域の欠失があることが明らかとなった。また78例の神経芽腫検体について、マイクロサテライト解析を用いてATM領域の解析を行った。その結果、14.1%(11/78例)にATM領域の欠失がみられた。そのうち、予後不良とされているステージIII、IVにおいては22.2%(10/45例)と高い割合で欠失していることが明らかとなった。

デジタルPCRを用いて正常人末梢血由来DNAおよび、MYCN増幅が既知の神経芽腫細胞株IMR32、CHP134、SK-N-BE、NMB、SK-N-DZおよび、MYCN増幅のない既知の神経芽腫細胞株SK-N-AS、NB69、NBL由来DNAを用いてMYCN増幅を検討した。既報の結果と同様にMYCN増幅をデジタルPCRで検出することができた(図2)。

図2



1;正常、2; IMR32、3; CHP134、4;SK-N-BE、5;NMB、6;SK-N-AS、7;SK-N-DZ、8;NB69、9;NBL

D. 考察

11番染色体上のATM遺伝子が、神経芽腫の進行や予後を決定する上で重要な役割を担っていると考えられる。

神経芽腫の予後推定にはMYCN増幅を検出することが重要である。MYCN増幅はサザンプロット、FISH法などにより診断されるが、検出方法が煩雑であり、結果を得るまでに時間がかかることが難点である。デジタルPCRをもちいてより簡便なMYCN増幅の検出することができた。本方法であれば検体受領から12時間以内に解析結果を得ることができる。また費用も比較的安価で、技術的難な難易度も低い。本方法を発展させ予後不良因子として知られる11q欠損や17q増幅を同時に検出できれば、よりの確なノンハイリスク・ハイリスクの神経芽腫の分子診断が行えると考えられる。

E. 結論

ノンハイリスク神経芽腫でDNA損傷応答の活性化がみられた。

11q欠損のあるハイリスク神経芽腫でATMの

欠損が認められた。

MYCNの増幅がデジタルPCRで簡便に検出することができた。

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 根本佳乃, 玉一博之, 西井理菜, 土田里香, 宮本智史, 齋藤正博, 清水俊明, 花田良二, 金子英雄, 深尾敏幸, 小山高敏, 大平美紀, 中川原章, 水谷修紀, 高木正稔. 神経芽細胞腫におけるATMの機能喪失. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会 2014年11月28日 - 11月30日 岡山
2. 根本佳乃, 玉一博之, 西井理菜, 土田里香, 宮本智史, 齋藤正博, 清水俊明, 花田良二, 金子英雄, 深尾敏幸, 小山高敏, 大平美紀, 中川原章, 高木正稔, 水谷修紀. 神経芽腫におけるATMの機能喪失. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日 - 27日 横浜
3. 根本佳乃, 西井理菜, 土田里香, 花田良二, 大平美紀, 中川原章, 水谷修紀, 高木正稔. 神経芽細胞腫におけるATMの機能喪失. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日 - 27日 横浜
4. 西井理菜, 根本佳乃, 大平美紀, 中川原章, 水谷修紀, 高木正稔. 神経芽腫における神経分化に關与するC11orf65の機能解析. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日 - 27日 横浜
5. 西井理菜, 根本佳乃, 大平美紀, 中川原章, 水谷修紀, 高木正稔. 神経芽腫における神経分化に關与するC11orf65の機能解析. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日 - 27日 横浜