

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591239

研究課題名 (和文) 小児横紋筋肉腫における予後因子の同定を目的としたゲノム解析

研究課題名 (英文) Genome-wide analysis of rhabdomyosarcoma and identification of its prognostic factors

研究代表者

井田 孔明 (IDA KOHMEI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 60313128

**研究成果の概要：**

横紋筋肉腫の発症に關与する標的遺伝子を同定することを目的に、計 30 例の RMS 臨床検体と細胞株 8 株について、高密度 SNP アレイを用いた網羅的ゲノム解析を行った。その結果、頻度の高いゲノムコピー数の変化は、2p、2q、13p 領域の高度増幅および 1p、9p の LOH であった。2p に存在する ALK、1p に存在する NEGR1 につき解析を行ったところ、これらは癌腫を越えて機能する標的分子である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：横紋筋肉腫、SNP アレイ、分子標的

**1. 研究開始当初の背景**

横紋筋肉腫(RMS)は小児軟部腫瘍の中で最も頻度が高く、組織学的には胎児型(embryonal type; ERMS)と胞巣型(alveolar type; ARMS)に大別される。近年の集学的治療により ERMS の治療成績は改善されてきたが、ARMS は他の小児固形腫瘍と比べても依然として最も予後不良の腫瘍の一つである。ARMS ではこれまでに特徴的な2つの染色体転座 t(2;13)、t(1;13)が報告されており、これにより生じる融合遺伝子 *PAX3-FKHR* と *PAX7-FKHR* の発がんに対する機能的役割の解明が進められている。*PAX* ファミリーはシヨ

ウジョウバエの分節遺伝子の転写因子であり、転座による融合遺伝子形成によりこれらの標的遺伝子の異常活性化が生じ、腫瘍化が起こると推測されている。しかし、これらの転座をもつトランスジェニックマウスを作製しても RMS を発症しないことから、RMS の発症には付加的な異常が必要であることが推測されている。

**2. 研究の目的**

横紋筋肉腫の発症分子機構を解明し、標的分子に基づいた腫瘍攻撃の選択性の高い新たな治療法の開発を目的として、最新のアレ

イ技術を用いて、RMS のゲノムワイドなマッピングを行う。

### 3. 研究の方法

(1) Affymetri 社 50K/250K GeneChip microarray を用いたゲノム異常の網羅的探索

検体としては、RMS 胞株 8 株、臨床検体 30 例 (ERMS ; 7 例、ARMS ; 18 例、不明 ; 5 例) を用いた。腫瘍試料から抽出したゲノム DNA を適切な制限酵素で消化し、断端に共通のアプターを付加した後、PCR により増幅する。PCR 産物の精製後に DNaseI 処理によりさらに断片化し、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う。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、平均解像度 24kb ~ 6kb でゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数の解析を行った。

(2) 標的遺伝子の同定と遺伝子性状の解析

解析した腫瘍におけるゲノムコピー数の変化のうちホモ欠失、LOH、UPD、gain および amplification の共通領域内に存在する遺伝子(群)につき、FISH 解析、real-time PCR 解析を行った。また Heteroduplex mobility assay 法、直接塩基配列決定法による変異解析により、腫瘍化との関連性のさらなる検証を行った。さらに培養細胞を用いて、発現導入解析を行い標的遺伝子の性状解析を試みた。

### 4. 研究成果

(1) RMS における molecular allelo karyotype

解析した 38 例中 20 例が染色体全体にわたるゲノムの量的増加がみられる hyperdiploidy な腫瘍群であった。残り、18 例は diploidy な集団であり、ゲノムの量的変化としては、増加よりもむしろ loss が高頻度に生じていた。これらの結果より、RMS はゲノム上、明確に 2 群の subgroup に分類されることが判明したが、組織型や臨床的因子との相関は認められなかった。38 例中 28 例に複数のゲノム異常が検出されたが 10 例にはほとんど微細なゲノム変異も検出されず、RMS の中にはゲノム変異をほとんどもたないサイレンとな腫瘍群が存在することが判明した。

hyperdiploidy な腫瘍群に高頻度なゲノム変異としては染色体 1 番、2 番、7 番、12 番の gain、diploidy な腫瘍群に高頻度なゲノム変異は 1p、9p の LOH であった。両群に共通する特徴的な高頻度なゲノム変異 2q、13p 領域の高度増幅であり、特に ARMS に高頻

度であった(図 1)。

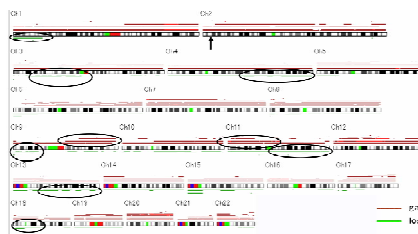
(2) RMS における 2q の高度増幅

解析した 38 例中 1 例で 2q23 領域に、約 1.4Mb の 13q の高度増幅が検出されたが、この領域内に ALK 遺伝子が存在することが判明した。ALK は、インスリン受容体ファミリーに属する膜貫通型チロシンキナーゼであり、成人の未分化大細胞性リンパ腫でみられる t(2;5)により生じる融合遺伝子として同定されたがん遺伝子である。5q35 上の *NPM1* と融合することにより、チロシンキナーゼの恒常的活性を来たし、その下流である *RAS/ERK*、*JAK/STAT* または *PI3K/AKT* 経路を活性化して細胞増殖を促進する。稀な固形腫瘍である inflammatory myofibroblastic tumor でも複数の相手遺伝子と転座を起こしていることが報告されており、また最近では、非小細胞肺癌の約 6% で 2p23 逆位により *EML4-ALK* 融合遺伝子が生じることが見出された。我々はこれまでに、超高密度 SNP アレイ (GeneChip) を用いて神経芽腫の網羅的ゲノム解析を行い、*ALK* を含む 2p23 領域の高度増幅を検出した。さらにこの遺伝子の機能獲得型変異を見出し、*ALK* が増幅と変異という 2 つの異なるメカニズムによって造腫瘍性を来たす神経芽腫の標的分子であることを明らかにした。このため RMS の発症分子機構における *ALK* の意義を明らかにするために RMS の細胞株と臨床検体につき発現解析と変異解析を行った。その結果、細胞株 6/8 株 (75%)、新鮮腫瘍 18/30 (60%) で *ALK* の発現が検出されたが有意な変異は検出されなかった。

(3) RMS における 1p 領域のホモ欠失

細胞株 SJRH 4 で 1p31 域に約 360Kb のホモ欠失を検出し、この領域内に唯一 *NEGR1* が存在することをみだしたが、*NEGR1* は神経芽腫細胞株 NB -19 でもホモ欠失が検出され、SJNB -6 の duplication の切断点に存在することも判明した。*NEGR1* は IgLON 細胞接着因子ファミリーの一員で神経細胞の接着や成長に関与することが知られている。このため更に発現解析を行ったところ、細胞株の 60%、新鮮腫瘍 42% で発現の消失または低下が認められた。特に予後不良群である ARMS において有意な発現低下または消失が認められた ( $P=0.0038$ ) RMS の 28 検体において Heteroduplex mobility assay 法、直接塩基配列決定法による変異解析を行ったが有意な変異は検出されなかった。次に *NEGR1* のホモ欠失が認められる SJRH 4 および NB -19 細胞株において、*NEGR1* の発現ベクターをリポフェクション法により導入し、機能解析を行ったところ、両者に有意な細胞増殖の低下が認められた ( $P=0.027$ 、 $P=0.031$ )。これらの結果より、*NEGR1* は RMS および神経芽腫に共通

したがん抑制遺伝子である可能性が示唆された。



1 横紋筋肉腫における molecular allelokaryotyping

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計31件)

1. Ohnishi H, Taki T, Yoshino H, Takita J, Ida K et al., A complex t(1;22;11)(q44;q13;q23) translocation causing MLL-p300 fusion gene in therapy-related acute myeloid leukemia, **Eur J Haematol.** 81 pp475-pp480, 2008 査読有 .
2. Chen Y\*, Takita J\*, et al., Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma, **Nature** 455, pp.971-974, 2008 **\*Theses authors contributed equally.** 査読有 .
3. Suzuki M, Kato M, Yuyan C, Takita J, et al., Whole genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high density single nucleotide polymorphism genotyping microarrays, **Cancer Sci.** 99, pp.564-570, 2008 査読有 .
4. Amemiya S, Akahane M, Takita J, Igarashi T, Ohtomo K. Imaging findings of upper abdominal involvement by acute megakaryoblastic leukaemia, **Pediatr Radiol.** 38, pp.457-461, 2008 査読有 .
5. Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, et al., Japan Marrow Donation Program (JMDP), Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies, **Biol Blood Marrow Transplant.** Jan;15(1Suppl), pp39-41, 2008 査読有 .
6. Nannya Y, Yokota H, Sato Y, Yamamoto G, Asai T, Ichikawa M, Watanabe T, Kumano K, Hangaishi A et al, Molecular and cytogenetic response of chronic myelogenous leukemia treated with imatinib mesylate: one institutional experience in Japan, **Int J Hematol.** 88, pp159-pp164 2008 査読有 .
7. Ishiura H, Morikawa M, Hamada M, Watanabe T, Kako S, Chiba S, Motokura T, Hangaishi A et al., Lymphomatoid granulomatosis involving central nervous system successfully treated with rituximab alone, **Arch Neurol.** May 65 pp662-pp665, 2008 査読有 .
8. Suzuki H, Suzuki T, Kamijo A, Oota S, Sato H, Hangaishi A et al., Antileukemic immunity associated with antineutrophil antibody production after allogeneic hematopoietic SCT for myeloid/NK-cell precursor acute leukemia, **Bone Marrow Transplant.** 42 pp285-287, 2008 査読有 .
9. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, Nakasone H, Sato H, Watanabe T, Hosoya N, Izutsu K, Asai T, Hangaishi A et al., Long-term ultra-low-dose acyclovir against varicella-zoster virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, **Am J Hematol.** 83 pp472-476, 2008 査読有 .
10. Suzuki H, Hangaishi A, Hosoya N et al., Herpes simplex encephalitis and subsequent cytomegalovirus encephalitis after chemoradiotherapy for central nervous system lymphoma: a case report and literature review, **Int J Hematol.** 87 pp538-pp541, 2008 査読有 .
11. Yoshimi A, Asai T, Hangaishi A, Takahashi T et al., Hemorrhagic cystitis in a patient receiving gemtuzumab ozogamicin for relapsed acute promyelocytic leukemia after cord blood transplantation, **Ann Hematol.** 87 pp851-pp852, 2008 査読有 .

12. Kataoka K, Izutsu K, Nagai S, Hangaishi A, Motokura T et al., Elevated serum levels of soluble interleukin-2 receptor in chronic eosinophilic leukemia/hypereosinophilic syndrome with FIP1L1-PDGFR alpha fusion gene, **Int J Hematol.** 87 pp440-441, 2008 査読有.
13. Kataoka K, Yamamoto G, Nannya Y, Yoshimi A, Okada S, Asai T, Kumano K, Hangaishi A et al., Successful engraftment following HLA mismatched cord blood transplantation for patients with anti-HLA Abs, **Bone Marrow Transplant.** 42 pp129-pp130, 2008 査読有.
14. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, Nakasone H, Sato H, Watanabe T, Hosoya N, Izutsu K, Asai T, Hangaishi A et al., Clinical features of late cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation, **Int J Hematol.** 87 pp310-pp331, 2008 査読有.
15. Suzuki HI, Asai T, Tamaki Z, Hangaishi A et al., Drug-induced hypersensitivity syndrome with rapid hematopoietic reconstitution during treatment for acute myeloid leukemia, **Haematologica.** 93 pp469-pp470, 2008 査読有.
16. Suzuki T, Izutsu K, Kako S, Ohta S, Hangaishi A et al., A case of adult Langerhans cell histiocytosis showing successfully regenerated osseous tissue of the skull after chemotherapy, **Int J Hematol.** 87 pp284-pp288, 2008 査読有.
17. Nagai S, Asai T, Watanabe T, Oshima K, Hangaishi A et al. Simultaneous appearance of central nervous system relapse and subarachnoid hemorrhage during the treatment for acute promyelocytic leukemia, **Ann Hematol.** 87 pp593-pp599, 2008 査読有.
18. Oshima K, Kanda Y, Nakasone H, Arai S, Nishimoto N, Sato H, Watanabe T, Hosoya N, Izutsu K, Asai T, Hangaishi A et al., Decreased incidence of acute graft-versus-host disease by continuous infusion of cyclosporine with a higher target blood level, **Am J Hematol.** 83 pp226-pp232, 2008 査読有.
19. Komuro H, Saihara R, Shinya M, Takita J et al., Identification of side population cells (stem-like cell population) in pediatric solid tumor cell line, **J Pediatr Surg.** 42, pp.2040-2045, 2007 査読有.
20. Kunishima S, Yoshinari M, Nishio H, Ida K et al., Haematological characteristics of MYH9 disorders due to MYH9R702 mutations, **Eur J Haematol.** 78 pp220-226, 2007 査読有.
21. Chen Y, Takita J, Mizuguchi M, Ida K et al., Mutation and expression analyses of the MET and CDKN2A genes in rhabdomyosarcoma with emphasis on MET overexpression, **Genes Chromosomes Cancer** 46, pp348-358, 2007 査読有.
22. Hangaishi A, Kurokawa M, Drug-induced thrombocytopenia, **Nippon Rinsho.** 28;65 Suppl 8:pp465-pp466, 2007 査読有.
23. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, Nakasone H, Kaneko M, Sato H, Watanabe T, Hosoya N, Izutsu K, Asai T, Hangaishi A et al., False positive Aspergillus galactomannan antigenaemia after hematopoietic stem cell transplantation, **J Antimicrob Chemother.** 61 pp411-pp416, 2007 査読有.
24. Arai S, Asai T, Uozaki H, Hangaishi A, Kanda Y et al., Splenic peliosis in a patient with aplastic anemia during danazol therapy, **Int J Hematol.** 86 pp329-pp332, 2007 査読有.
25. Nagai S, Ichikawa M, Takahashi T, Sato H, Yokota H, Oshima K, Izutsu K, Hangaishi A et al., The origin of neoplastic mast cells in systemic mastocytosis with AML1/ETO-positive acute myeloid leukemia, **Exp Hematol.** 35 pp1747-pp1752, 2007 査読有.

26. Oshima K, Kanda Y, Nakasone H, Arai S, Nishimoto N, Sato H, Watanabe T, Hosoya N, Izutsu K, Asai T, Hangaishi A et al., Decreased incidence of acute graft-versus-host disease by continuous infusion of cyclosporine with a higher target blood level, **Am J Hematol.** 83 pp226-pp232, 2007 査読有.
27. Oshima K, Kanda Y, Asano-Mori Y, Nishimoto N, Arai S, Nagai S, Sato H, Watanabe T, Hosoya N, Izutsu K, Asai T, Hangaishi A et al., Presumptive treatment strategy for aspergillosis in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients, **J Antimicrob Chemother.** 60 pp350-pp355, 2007 査読有.
28. Yamamoto G, Nannya Y, Kato M, Sanada M, Levine RL, Kawamata N, Hangaishi A et al., Highly sensitive method for genome-wide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays, **Am J Hum Genet.** 81 pp114-pp126, 2007 査読有.
29. Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A et al., Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms, **Leukemia.** 21 pp992-pp997, 2007 査読有.
30. Shinohara A, Asai T, Izutsu K, Ota Y, Takeuchi K, Hangaishi A et al., Durable remission after the administration of rituximab for EBV-negative, diffuse large B-cell lymphoma following autologous peripheral blood stem cell transplantation for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. **Leuk Lymphoma.** 48 pp418-pp420, 2007 査読有.
31. Sanada M, Uike N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A et al., Unbalanced translocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms, **Leukemia.** 21 pp992-pp997, 2007 査読有.

〔学会発表〕(計15件)

1. 滝田順子, 加藤元博, 陳玉彦, 大平美紀, 真田昌, 菊地陽, 本村あい, 康勝好, 井田孔明, 五十嵐隆, 中川原章, 林泰秀, 小川誠司, 高密度SNPアレイを用いた神経芽腫における網羅的ゲノム解析. 第24回日本小児がん学会, 千葉, 2008年11月14日~16日
2. Takita J, Chen Y, Kato M, Yamamoto G, Sanada M, Nannya Y, Kikuchi A, Igarashi T, Ogawa S, Hayashi Y, High-Resolution Copy Number Analysis and Identification of Target Genes in Neuroblastoma Using High-Density SNP-genotyping Microarrays. *Advances in Neuroblastoma Research*, Chiba, May 21-24, 2008
3. 井田孔明, 古屋彩夏, 康勝好, 滝田順子, 小太刀康夫, 狩野博嗣, 高見澤勝, 五十嵐隆, 特発性血小板減少性紫斑病の2例 重症例に対する急性期の治療について, 第111回日本小児科学会学術集会, 東京, 2008年4月25~27日
4. 滝田順子, 加藤元博, 陳玉彦, 大木健太郎, 山本豪真, 真田昌, 南谷泰仁, 滝智彦, 五十嵐隆, 林康秀, 小川誠司, 超高密度SNPアレイを用いたMLL再構成陽性小児白血病における molecular allelo karyotyping, 第70回日本血液学会総会, 京都, 2008年10月11日~12日
5. 井田孔明, 柏井洋文, 朝海廣子, 古屋彩夏, 康勝好, 滝田順子, 骨髄非破壊の前処置による臍帯血移植を行った難治性ランゲルハンス細胞組織球症の1例, 関東甲信越地区小児がん登録研究会, 東京, 2007年3月24日
6. Takita J, Chen Y et al., Molecular allelokaryotyping analysis of neuroblastoma using high-density SNP-genotyping microarrays, The 100<sup>th</sup> American Association for Cancer Research Annual Meeting, Los Angeles, U.S.A. April 14-18, 2007
7. 井田孔明, 古屋彩夏, 康勝好, 滝田順子, 五十嵐隆, 骨髄非破壊の前処置による臍帯血移植を施行した難治性ランゲルハンス細胞組織球症の1例, 第110回日本小児科学会学術集会, 京都, 2007

年 4 月 20 日 ~ 22 日

8. 滝田順子, 陳玉彦, 加藤元博, 山本豪, 真田昌, 南谷泰仁, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司, 神経芽腫の網羅的ゲノム解析、第 110 回日本小児科学学会学術集会, 京都, 2007 年 4 月 20 日 ~ 22 日
9. 滝田順子, 神経芽腫の網羅的ゲノム解析, 第 16 回小児血液腫瘍症例検討会, 東京, 2007 年 7 月 7 日
10. 滝田順子, 加藤元博, 中村文彦, 山本豪, 陳玉彦, 真田昌, 南谷泰仁, 菊地陽, 林泰秀, 小川誠司, 五十嵐隆, 超高密度 SNP アレイおよび高密度タイリングアレイを用いた乳児白血病における molecular allele karyotyping ならびにメチル化領域の網羅的解析, 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム, 東京, 2007 年 9 月 15 日
11. Takita J, Chen Y et al., Molecular allelokaryotyping analysis and identification of the NBA17as a candidate gene for 17q gain in neuroblastoma, The 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Oct 3-5, 2007
12. Takita J, Kato M et al., High-resolution copy number analysis of rhabdomyosarcoma genomes using SNP genotyping microarrays, The 3<sup>rd</sup> Congress of Asian Society for Pediatric Research, Tokyo, Oct 6-8, 2007 (Young investigator Award 受賞)
13. 滝田順子, 加藤元博, 中村文彦, 山本豪, 陳玉彦, 真田昌, 南谷泰仁, 陳玉彦, 井田孔明, 康勝好, 古屋彩夏, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司, 高密度アレイを用いた乳児白血病の網羅的なゲノム・エピゲノム解析, 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会 横浜, 2007 年 10 月 11 日 ~ 13 日
14. 井田孔明, 康勝好, 古屋彩夏, 滝田順子, 当科で RIST を施行した乳幼児非悪性疾患の 4 例, 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会, 2007 年 10 月 11 日 ~ 13 日
15. 滝田順子, 陳玉彦, 加藤元博, 山本豪, 南谷泰仁, 真田昌, 古屋彩夏, 康勝好, 井田孔明, 菊地陽, 五十嵐隆, 林泰秀, 小川誠司, 横紋筋肉腫における網羅的

ゲノム解析, 第 49 回日本小児血液学会・第 23 回日本小児がん学会学術集会・第 5 回日本小児がん看護研究会・第 4 回血友病看護研究会・第 12 回財団法人がんの子供を守る会公開シンポジウム, 仙台, 2007 年 12 月 14 日 ~ 16 日

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

井田 孔明 (IDA KOHMEI)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 6 0 3 1 3 1 2 8

### (2) 研究分担者

滝田 順子 (TAKITA JUNKO)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 0 0 3 5 9 6 2 1

半下 石明 (HANGAISHI AKIRA)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 2 0 3 4 4 4 5 0