

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791301  
 研究課題名(和文) 神経芽腫における SNP アレイを用いた全遺伝子解析に基づく生物学的多様性解析  
 研究課題名(英文) detecting heterogeneity of neuroblastomas with a whole genetic analysis using SNP array  
 研究代表者 宗崎 良太 (Ryota Souzaki)  
 九州大学 大学病院 医員

研究者番号：10403990

研究成果の概要(和文): 神経芽腫において、同一腫瘍内のheterogeneityや染色体レベルでの*MYCN* 遺伝子の微量な変化が予後に影響を与えていると考え、マイクロダイゼクション(LCM)とSNP arrayを用いて神経芽腫における*MYCN*遺伝子の微細な遺伝子量変化を検討したところ、定量的PCR法で*MYCN*微量増加を示す症例には、*MYCN*増幅細胞を少数認める症例や、FISHで*MYCN* gainの細胞と認識される2p gainの症例を認めた。今後、LCMやSNP array解析を用いてより正確な*MYCN*増幅の判定が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文): We thought that a small change of dosage of the *MYCN* gene due to intratumoral heterogeneity and a chromosomal gain of *MYCN* gene affected the prognosis in neuroblastoma. Therefore, the microdissection and SNP array were performed to determine the dosage of the *MYCN* gene and we found the cases with a small number of *MYCN* amplified cells and a large number of *MYCN* gain cells. It was thought that a judgment of more accurate *MYCN* amplification was necessary using LCM and SNP array analysis in future

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児外科

キーワード：神経芽腫、SNP アレイ、生物学的多様性

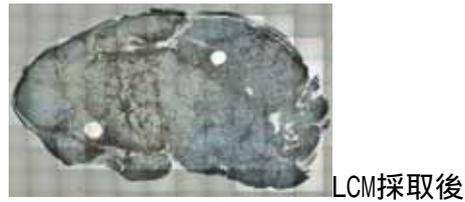
## 1. 研究開始当初の背景

小児固形腫瘍でもっとも頻度の高い腫

瘍である神経芽腫は、生物学的悪性度が

腫瘍により大きく異なり、転移再発を繰り返し腫瘍死するものから自然退縮するものまで様々である。そのため、治療前に開腹生検により腫瘍細胞の生物学的悪性度をMYCN遺伝子・病理学的診断により判定し、それに応じた治療法を選択している。しかしながら、それらの検索においては悪性度が低いと判断された症例においても、aggressiveな経過をとる症例が存在しており、MYCN遺伝子や病理学的診断のみではまだ、十分予後を反映しているとはいえない。SNP arrayを用いることで、より増幅の程度少ない微量な遺伝子量の差を判定できるため、神経芽腫において最も強力な予後因子であるMYCN遺伝子量の変化を詳細に検討することとした。

また、神経芽腫において生物学的多様性(heterogeneity)の存在が指摘されており、より悪性度の高い細胞集団がその腫瘍全体の予後をより正確に反映していると考えられている。今回、我々はマイクロダイセクション法(LCM)を用い、より小さな細胞集塊を採取することで、腫瘍の悪性度をより正確に判定することとした。LCMとは顕微鏡的な観察を行いながら、任意の領域の細胞を選択的にレーザーにて切断し採取する方法であり(図1)、採取した組織からDNA及び、RNAを抽出して定量的PCRなどでコントロール遺伝子と比較することで、腫瘍内部における生物学的多様性(heterogeneity)の詳細な解析が可能となると考えられる。



## 2. 研究の目的

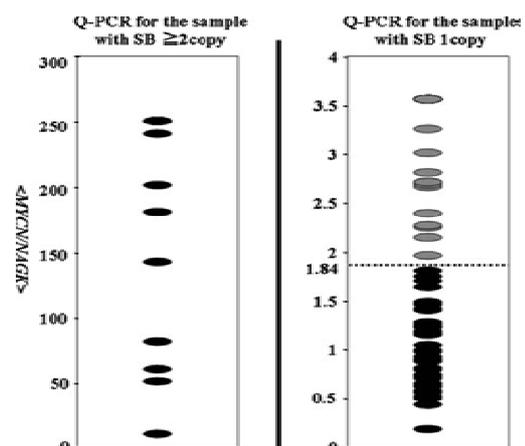
今回我々は、近年報告されつつあるSNP-arrayを用いて、神経芽腫の最も強力な予後因子であるMYCN遺伝子の微量な遺伝子量の変化を計測するとともに、今回、マイクロダイセクション法を用いてMYCN遺伝子量の差が組織学的に偏って存在している症例があることを示し、神経芽腫組織内に生物学的多様性(heterogeneity)があることを証明し、更なる悪性度の層別化を行うことを研究目標とした。

## 3. 研究の方法

まず、今回、神経芽腫において最も強力な予後因子であると言われているMYCN遺伝子について、SNParrayとLCMを用いて詳細に検索した。神経芽腫63例の凍結組織片からDNAを抽出しサザンプロット(SB)法とQ-PCRでMYCN増幅判定を行った。SB法は2copy以上、Q-PCRは1.84以上を微量増加、5.00以上を増幅と定義した。また、全63例についてパラフィンブロックからLCMを用いて細胞集塊を採取し、Q-PCRでMYCN増幅を判定した。FISHは23例に行い、MYCN非増幅、MYCN gain、MYCN増幅を判定した。SNP arrayは凍結組織片から抽出したDNAをHuman CMV370-Duo (Illumina)にて解析した。

## 4. 研究成果

SB法で1copyの54症例中12例はQ-PCR法で



MYCN の微量増加と判定された。

この微量増加を示した 12 例のうち 11 例を SNP array で解析し、2p の状態から MYCN 領域のみ増幅している「MYCN 増幅群」、distal 2p が全体的に gain している「2p gain 群」、変化のない「非変化群」の 3 群に分類した。

	The status of Chr. 2	2p gain	MYCN 増幅
MYCN 増幅群 (n=2)		(-)	(+)
2p gain 群 (n=4)		(+)	(-)
非変化群 (n=5)		(-)	(-)

11 例のうち 2 例は「MYCN 増幅群」と判定され、うち 1 例は中心部が壊死した症例で、LCM を用いて腫瘍細胞のみを採取すると MYCN の増幅を示し、FISH では MYCN 増幅細胞を認めた。残る 1 例については、LCM の解析は正常で、FISH は行わなかった。2 例とも腫瘍死していた。11 例中 4 例は「2p gain 群」と判定され、うち 1 例は LCM で採取した全細胞集塊で MYCN 微量増加を認め、FISH で全ての細胞が MYCN gain であった。他の 1 例では、LCM で採取した細胞集塊の 1 か所のみ MYCN 微量増加を認め、FISH で 15%の細胞が MYCN gain 細胞であった。残りの 2 例は LCM の解析は正

生存していた。11 例中 5 例は「非変化群」と判定され、LCM や FISH の解析は正常であった。この 5 例は全例生存していた。

Q-PCR 法で MYCN 微量増加を示す症例には、MYCN 増幅細胞を少数認める症例や、FISH で MYCN gain の細胞と認識される 2p gain の症例を認めた。今後、LCM や SNP array 解析を用いてより正確な MYCN 増幅の判定が必要と考えられた。

### 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 4 件)

1. Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Matsuzaki A, Hara T, Taguchi T.

Risks and benefits of ending of mass screening for neuroblastoma at 6 months of age in Japan. J Pediatr Surg. 44(12):2253-7:2009

2. Kinoshita Y, Souzaki R, Tajiri T, Ieiri S,

Hashizume M, Taguchi T. A preoperative evaluation for neo-infantile liver tumors using a three-dimensional reconstruction of multidetector row CT. Oncol Rep. 21(4):881-6.2009

3. Souzaki R, Tajiri T, Higashi M, Kinoshita Y,

Tanaka S, Kohashi K, Tsuneyoshi M, Taguchi T. Clinical implications of a slight increase in the gene dosage of MYCN in neuroblastoma determined using quantitative PCR. Pediatr Surg Int. 24(10):1095-100. 2008

4. Kinoshita Y, Tajiri T, Souzaki R, Tatsuta K,

Higashi M, Izaki T, Takahashi Y, Taguchi T. Diagnostic value of lectin reactive alpha-fetoprotein for neoinfantile hepatic tumors and malignant germ cell tumors: preliminary

cases	Age (month)	stage	mass	SB	Q-PCR	LCM(PCR) Max.	LCM(PCR) Min.	SNP array	FISH	outcome
1	3	4S	-	T	2.7	16.4	0.54	MYCN増幅群	増幅	dead
2	48	4	-	T	2.27	0.96	0.52	MYCN増幅群	N.D.	dead
4	13	4	-	T	3.56	4.82	3.65	2p gain群	gain	alive
3	48	4	-	T	3.25	2	1.12	2p gain群	gain	dead
5	12	4	-	T	2.28	1.13	1.03	2p gain群	N.D.	dead
6	108	4	-	T	2.4	0.58	0.32	2p gain群	N.D.	dead
7	7	3	+	T	2.8	0.43	0.42	非変化群	N.D.	alive
8	7	3	+	T	1.98	0.96	0.69	非変化群	N.D.	alive
9	6	2B	+	T	2.16	1.73	0.83	非変化群	非増幅	alive
10	6	1	+	T	3.04	0.33	0.29	非変化群	非増幅	alive
11	4	4S	-	T	2.7	0.9	0.6	非変化群	N.D.	alive
12	38	4	-	T	2.65	0.99	0.87	N.D.	amp.	dead

Mass: mass screening, Q-PCR: 定量的PCR, N.D.: 未検査  
LCM(PCR) Max & Min: LCM採取組織に対するPCRの値の最大値&最小値

常で、FISH は行わなかった。この 4 例中 1 例

study. J Pediatr Hematol Oncol.  
30(6):447-50.2008

〔学会発表〕(計 件)

- 1.Souzaki R, et al.Clinical implications of the slight increase for the gene dosage of MYCN determined using quantitative PCR in neuroblastoma.ANR 2008; May 2008,Makuhari
2. 宗崎良太、他:神経芽腫における定量的 PCR 法で判定された MYCN 遺伝子量微量増加の意義:第 45 回日本小児外科学会、2008 年 5 月、筑波
3. 宗崎良太、他:神経芽腫における MYCN 増幅、MYCN gain,2p gain の検討: 第 24 回小児がん学会:2008 年 11 月:幕張
4. 宗崎良太、他:MYCN gain と 2p gain : 第 46 回日本小児外科学会、2009 年 5 月、大阪
- 5.Souzaki R, et al. The correlation between MYCN gain detected by FISH and distal 2p gain detected by SNP array in neuroblastoma. Pasific Association of Pediatric surgeons. May 2009,Hongkong
- 6.宗崎 良太、他: マイクロダイゼクションと SNP array を用いた神経芽腫の悪性度の層別化. 第 25 回小児がん学会、2009 年 11 月、千葉

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宗崎 良太 (Ryota Souzaki )

研究者番号 : 1 0 4 0 3 9 9 0

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号 :