

神経芽腫群腫瘍におけるテロメア維持機構と  
染色体異常の解析

日本大学大学院医学研究科博士課程

外科系小児外科学専攻

菅原 大樹

修了年 2022 年

指導教員 上原 秀一郎

神経芽腫群腫瘍におけるテロメア維持機構と  
染色体異常の解析

日本大学大学院医学研究科博士課程

外科系小児外科学専攻

菅原 大樹

修了年 2022 年

指導教員 上原 秀一郎

## 目次

概要	1
緒言	5
対象と方法	9
結果	19
考察	26
まとめ	31
謝辞	32
表	33
図	39
図説	46
引用文献	48
研究業績	52

## 【概要】

### はじめに

神経芽腫群腫瘍は、3 番目に多い小児固形悪性腫瘍であり、本邦では年間 150 例前後の新規症例が発生している。神経芽腫群腫瘍は、組織病理学的に神経芽腫、神経節芽腫、および神経節腫に分類される。神経芽腫と比して神経節芽腫、神経節腫は予後良好であるが、臨床的には神経節芽腫、神経節腫の中でも予後不良群は存在している。予後は診断時年齢、臨床病期、生物学的因子と強く関連し、中でも *MYCN* 遺伝子は強力な予後不良因子であることが知られている。集学的治療により神経芽腫群腫瘍患児の全体的な予後は著しく改善されたが、高リスク群患児の 5 年生存率は約 50%と小児腫瘍の中でも不良である。高リスク神経芽腫では約 40%で *MYCN* 遺伝子増幅が起こっている。近年、残りの 60%における治療抵抗性に関連したメカニズムとして、テロメアが注目されている。一般的に腫瘍細胞の多くは細胞分裂ごとに短くなるテロメアを伸長または維持し、テロメア短縮によるアポトーシスを防いでいる。この機構はテロメア維持機構 (telomere maintenance mechanisms: TMM) と呼ばれ、多くのがんで報告され、神経芽腫においても TMM の亢進との関連性が報告されている。TMM の亢進は、テロメア伸長を制御するテロメララーゼをコードする *TERT* 遺伝子の活性化によるもの

と、テロメラーゼ非依存性テロメア維持機構 (Alternative length of telomerase : ALT) によって起こり、TMM が亢進している神経芽腫は予後不良である。一方、神経節芽腫および神経節腫における TMM に関するまとまった症例数での報告はない。本研究では神経芽腫において *TERT* mRNA 発現量および ALT の特定のマーカーである C-circle を qPCR で測定し、神経芽腫を用いて TMM を解析する系を確立した。そして、この系を用いて TMM の亢進が神経節芽腫や神経節腫においても生じているかを検討した。また TMM の亢進を呈する神経芽腫群腫瘍の染色体異常の特徴を明らかにすることを試みた。

## 対象と方法

2014 年から 2018 年に日本小児がんグループ (JCCG) 神経芽細胞腫委員会 (JNBSG) に登録された神経芽腫群腫瘍を対象とした。すべての腫瘍は、組織病理学的に神経芽腫、神経節芽腫、または神経節腫と診断され、国際神経芽腫病期分類 (International Neuroblastoma Staging System : INSS) に従って病期分類された。*MYCN* 遺伝子のコピー数は、FISH および定量的リアルタイム PCR 分析を使用した診断アプローチとして施行した。全ての腫瘍を年齢、INSS、および *MYCN* ステータスによって高リスクと低・中間リスクに分類した。研究計画は埼玉県立がんセンターの倫理委員会によって承認された (承認番号 : 764)。

## 結果

本研究では神経芽腫 257 症例の *TERT* mRNA 発現解析および ALT のマーカーである C-circle を qPCR で解析した。*TERT* mRNA 高発現および ALT 陽性群は、高年齢(>月齢 18)、国際神経芽腫病期分類 (International Neuroblastoma Staging System : INSS) stage4、高リスク群に多く発症し、これまでの海外からの報告と同様で実験の再現性がとれた。神経節芽腫 48 症例中 12 症例 (ALT 陽性 5 症例、*TERT* mRNA 遺伝子高発現 6 症例、どちらも認めたもの 1 症例) および神経節腫 18 症例中 1 症例 (*TERT* mRNA 遺伝子高発現 1 症例) にて TMM の亢進が生じていた。神経節芽腫において神経芽腫と同様に *TERT* mRNA 高発現および ALT 陽性群は、高年齢(>月齢 18)、INSS stage4、高リスク群に多く発症する傾向を認めた。

*TERT* 遺伝子構造異常を確認するため FISH 解析および *TERT* 遺伝子シーケンス解析を施行した。結果は、神経芽腫で 15 例 (再編成 : 13 例、増幅 : 1 例、プロモーター領域の変異 : 1 例)、神経節芽腫で 1 例 (再編成) 構造異常を認め、神経節腫では異常を認めなかった。神経芽腫では *TERT* 遺伝子のゲノム異常が主なメカニズムであったが、神経節芽腫においては *TERT* 遺伝子のゲノム異常は 1 例のみであり、神経芽腫とは異なるメカニズムで *TERT* 遺伝子 mRNA の高発現

が生じている可能性があることを示した。また、ALT 陽性神経芽腫および神経節芽腫のゲノムアレイ解析から ALT 陽性腫瘍で 7 番染色体長腕に共通する増加領域を見出し、この領域が ALT 陽性神経芽腫群腫瘍の予後と相関する可能性があることを示唆された。

## 結論

本研究より、神経芽腫群腫瘍において、神経芽腫のみならず神経節芽腫および神経節腫においても TMM の亢進を認めた。TMM の亢進が神経芽腫群腫瘍において予後不良因子となりうる可能性が示唆された。また、ALT 陽性神経芽腫群腫瘍の予後と相関する可能性がある領域を 7 番染色体長腕に同定した。

## 【緒言】

### 神経芽腫

神経芽腫群腫瘍は脳腫瘍、胚細胞腫瘍に次いで3番目に多い小児悪性固形腫瘍であり、本邦では年間150例前後の新規患児が発症している。神経堤由来の交感神経系の組織である副腎髄質や交感神経幹から発生し、組織病理学的に神経芽腫 (Neuroblastoma: NB)、神経節芽腫(Ganglioneuroblastoma: GNB)、および神経節腫(Ganglioneuroma: GN)に分類される(1-4)。神経芽腫群腫瘍の治療は国際神経芽腫リスクグループ (The International Neuroblastoma Risk Group: INRG) のリスク分類に基づき、低リスクでは無治療経過観察もしくは外科手術、中間リスクでは化学療法や外科手術、高リスクでは化学療法に加え造血幹細胞移植や放射線療法などの集学的治療が行われる。予後は診断時年齢、病期、病理組織分類、*MYCN* 遺伝子増幅、11番染色体短腕の部分欠失、および核倍数性 (ploidy) などと強く関連し、中でも *MYCN* 遺伝子増幅は神経芽腫群腫瘍の強力な予後不良因子である。*MYCN* 非増幅例の神経芽腫群腫瘍の5年無再発生存率が76.4%、5年全生存率が86.1%であるのに対し、*MYCN* 増幅例の神経芽腫群腫瘍では5年無再発生存率が48.1%、5年全生存率が55.2%と有意に低いことが報告されている(5)。神経芽腫群腫瘍の中でも神経芽腫および神経節芽腫は、自然退縮の



ため無治療経過観察される予後良好な症例から、強力な集学的治療を行っても生存率 30～40%の予後不良な症例までさまざまな臨床像を示す症例が存在する(4, 6)。一方、神経節腫は一般的に良性腫瘍と考えられているが、神経節腫から神経芽腫へ脱分化し悪性化した症例の報告もされている(7,8)。このように神経芽腫群腫瘍は非常に多様な予後と治療反応性を示す。集学的治療による副作用や腫瘍の治療抵抗性などが問題とされており、高リスク群でより予後不良なものを分けるマーカーの発見や新しい治療法に関して研究されている。

#### テロメア維持機構

高リスク神経芽腫の 40%で *MYCN* 遺伝子増幅が認められるが、残りの 60%における治療抵抗性のメカニズムについては長い間不明であった。近年、治療抵抗性メカニズムの解明と新規治療標的薬の開発のため高リスク神経芽腫における分子生物学的解析が精力的に実施されている。高リスク神経芽腫における次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム解析から、*ATRX* 遺伝子の変異と *TERT* 遺伝子再編成による *TERT* 遺伝子の発現上昇が高リスク神経芽腫で生じていることが明らかになった(9-11)。これらの遺伝子異常を呈する神経芽腫腫瘍の特徴は、*MYCN* 遺伝子の増幅を伴わず高年齢で発症し予後不良であった。*MYCN* 遺伝子、*TERT* 遺伝子および *ATRX* 遺伝子はテロメア維持機構 (telomere maintenance

mechanisms: TMM) に関与する遺伝子である(12)。多くの腫瘍細胞は細胞増殖を維持するために細胞分裂ごとに短くなるテロメアを伸長し、テロメア短縮によるアポトーシスを防いでいる。*TERT* 遺伝子はテロメア伸長を制御するテロメラーゼをコードしており、神経芽腫では *MYCN* による *TERT* 遺伝子の転写活性化や *TERT* 遺伝子再編成 (*TERT* rearrangement) および *TERT* 遺伝子プロモーター領域変異 (*TERT* Promotor region heterozygote mutation) により転写が活性化し、テロメア DNA が維持される(11, 13, 14)。一方、テロメラーゼをコードしない神経芽腫の約 10%は *ATRX* 遺伝子欠失を呈し、テロメラーゼ非依存性テロメア維持機構 (alternative lengthening of telomeres (ALT) mechanism) によってテロメア DNA を維持していることが知られている(9)。

TMM の亢進を認める神経芽腫は特に予後不良である(15)。高リスク神経芽腫症例にて、*MYCN* 遺伝子増幅群、*TERT* 遺伝子高発現群、ALT 陽性群、それ以外に分類し予後との相関を解析すると、5年および10年無再発生存曲線解析において *TERT* 遺伝子高発現群と ALT 陽性群は *MYCN* 遺伝子増幅群と同等に高リスク神経芽腫症例の中でも特に予後不良であった(16)。また Koneru らは高リスク神経芽腫症例を *TERT* 遺伝子高発現群と ALT 陽性群とそれ以外に分類し、*TERT* 遺伝子高発現群と ALT 陽性群は全生存曲線解析および無再発生存曲線解析において、高リスク神経芽腫症例の中でも予後不良であることを示した(17)。一方、

非高リスク神経芽腫においても TMM の亢進が認められる神経芽腫は特に予後不良であった (15)。近年、この他にも神経芽腫における TMM の解析が精力的に実施されている。一方で神経節芽腫および神経節腫において *TERT* 遺伝子高発現について報告されているが、多検体での報告はない(18, 19)。また、ALT 陽性は神経節芽腫 7 症例中 1 症例で報告されているのみであり(20)、神経節芽腫および神経節腫において TMM の解析についてまとまった症例数での報告はない。

本研究では、本邦における神経芽腫を用いて TMM を解析する系を確立し、この系を用いて TMM の亢進が神経節芽腫や神経節腫においても生じているかを明らかにし、神経芽腫群腫瘍において TMM の亢進が予後不良因子になりうる可能性について検討すること、また TMM の亢進を呈する神経芽腫群腫瘍の染色体異常の特徴を明らかにすることを目的とした。

## 【対象と方法】

### 対象

2014年から2018年に日本小児がんグループ（JCCG）神経芽細胞腫委員会（JNBSG）に登録された神経芽腫群腫瘍を対象とした。すべての腫瘍は、組織病理学的に神経芽腫、神経節芽腫、または神経節腫と診断され、国際神経芽腫病期分類（International Neuroblastoma Staging System : INSS）に従って病期分類された（21）。*MYCN* 遺伝子のコピー数は、FISH および定量的リアルタイム PCR 分析を使用した診断アプローチとして施行した。全ての腫瘍を年齢、INSS、および *MYCN* ステータスによって高リスクと低・中間リスクに分類した。研究計画は埼玉県立がんセンターの倫理委員会によって承認された（承認番号：764）。

### DNA 抽出

生組織または凍結組織に Lysis Buffer 750  $\mu$ l（組成：50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS）と proteinase K (10 mg/ml)（ニッポンジーン）22.5  $\mu$ l を加え、55°C で 1 晩インキュベートし組織を溶解した。その後 85°C 45 分にて proteinase K を失活化したのち 5M NaCl 22.5  $\mu$ l とイソプロパノール 525  $\mu$ l を加え転倒混和後、16000 G 室温にて遠心し上清を

廃棄した。70%エタノールを 500  $\mu$ l を加え転倒混和後、16000 G 室温にて 5 分間遠心し上清を廃棄した。沈殿した DNA に TE 400  $\mu$ l を加え DNA を溶解し、RNase (DNA-free 1mg/ml) (ニッポンジーン) 2  $\mu$ l を添加・転倒混和し、37°C 30 分インキュベートした。TE 飽和フェノール 400  $\mu$ l を添加し転倒混和した。16000 G 室温にて 5 分間遠心し上層を新しい 1.5 ml チューブに移し、フェノール/クロロホルム 400  $\mu$ l を添加し転倒混和した。16000 G 室温にて 5 分間遠心し上層を新しい 1.5 ml チューブに移し、フェノール/クロロホルム 400  $\mu$ l を添加し転倒混和した。16000 G 室温にて 5 分間遠心し上層を新しい 1.5 ml チューブに移し、クロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) 400  $\mu$ l を添加し転倒混和後、16000 G 室温にて 5 分間遠心し上層を新しい 1.5 ml チューブに移した。3M 酢酸ナトリウム 30  $\mu$ l および 99.5%エタノール 500  $\mu$ l を添加しタッピングにより混和後、16000 G 室温で 5 分間遠心した。上清をデカントにて廃棄し、70%エタノールを 800  $\mu$ l 添加し転倒混和後 16000 G 室温で 5 分間遠心した。上清を廃棄し、適度に室温にて風乾後、適当量の TE を添加しタッピングし 37°C にて DNA を溶解し DNA 試料とした。

### RNA 抽出

凍結組織を 2 ml チューブに入れ ISOGENII (ニッポンジーン) 1 ml を添加

後ホモジナイズした。400  $\mu$ l の RNase フリー水を加え 15 秒間ボルテックスにて混和したのち、室温にて 10 分間静置した。12000 G 室温にて 15 分間遠心し上層を新しい 1.5 ml チューブに移した。75%エタノール 400  $\mu$ l を加え転倒混和後、室温にて 10 分間静置し、12000 G 室温にて 8 分間遠心した。上清を廃棄後、75%エタノール 400  $\mu$ l を加え転倒混和し、12000 G 室温にて 8 分間遠心し上清を廃棄した。適度に室温にて風乾後、適当量の RNase フリー水を加え RNA を溶解し RNA 試料とした。

#### cDNA 合成と real time-PCR

組織から抽出した RNA サンプルを鋳型として、プロトコルに従い逆転写反応を行った。逆転写産物全量 (20  $\mu$ l) に対して 80  $\mu$ l の TE を加えて cDNA 試料とし、その後の発現解析に用いた。作製した cDNA を鋳型にプライマーと TaqMan probe 用いて real time-PCR (条件 : 30°C 10 分、42°C 30 分、99°C 5 分) を行った。内在性コントロールとして *ACTB* を用いた。*TERT* 遺伝子の発現解析には TaqMan gene expression assay (Applied Biosystems) を用いた。Cut off 値は、高リスク神経芽腫の *TERT* mRNA 発現量の中央値(=0.37)を超えるものを *TERT* mRNA 高発現とした (10)。

## C-circle アッセイ

C-circle アッセイは下記のように以前に報告された方法に改良を加え実施した (22, 23)。ALT 陽性神経芽腫細胞株 SK-N-FI および検体の精製した DNA を 16 ng/μl に調製し、表のように反応液 (16 ng/μL ゲノム DNA 1.0 μL、BSA 0.2 μL、10% Tween-20 0.1 μL、100 mM dATP 0.1 μL、100 mM dTTP 0.1 μL、100 mM dCTP 0.1 μL、100 mM dGTP 0.1 μL、1 M DTT 0.04 μL、10×φ29 buffer 0.1 μL) を加えた。そこに、それぞれポリメラーゼ入りのサンプル (φ29 polymerase 0.375 μl、MilliQ 水 6.885 μl) と、ポリメラーゼなしのサンプル (MilliQ 水 7.26 μl) を作製し、PCR (条件 : 30°C 8 時間、65°C 30 分) を行った。増幅終了後、10 μl PCR 反応液に 30 μl 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) を加え、これを以後の qPCR に用いるテンプレートとした。qPCR は、テロメアとコントロールとしてシングルコピー遺伝子である VAV2 のプライマー (テロメア : 20 μM forward primer 5'-CGGTTTGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3'、20 μM reverse primer 5'-GGCTTGCCCTACCCTACCCTACCCTACCCTACCCT-3'、VAV2 : 20 μM forward primer 5'-TGGGCATGACTGAAGATGAC-3'、20 μM reverse primer 5'-ATCTGCCCTCACCTTCTCAA-3') を用いて、反応液 (SYBR Green Ma

ster mix 5  $\mu$ L、MilliQ 水 1.8 $\mu$ L、Dye II 0.2  $\mu$ L、20  $\mu$ M プライマーペア 1.0  $\mu$ L、テンプレート 2.0  $\mu$ L) や増幅条件 (テロメア : 50°C 2 分、95°C 15 分、95°C 15 秒と 60°C 2 分を 28 サイクル、95°C 15 秒、60°C 1 分、95°C 15 秒、60°C 15 秒、*VAV2* : 50°C 2 分、95°C 15 分、95°C 15 秒と 56°C 15 秒と 72°C 1 分を 40 サイクル、95°C 15 秒、60°C 1 分、95°C 15 秒、60°C 15 秒) で試行した。上記細胞株 SK-N-FI の C-circle 値を 196 に補正した時、検体の C-circle 値が 7.5 以上の時に ALT 陽性と判断した (23)。C-circle アッセイの副産物として得られたテロメア伸長 (Telomere Contents : TC) は、上記細胞株 SK-N-FI の TC 値を 14 に補正した時に検体の TC 値が 12 以上の時にテロメア伸長陽性と判断した (23)。

#### FISH 法による *TERT* 遺伝子構造異常解析

生検体をスタンプしたスライドガラスをメタノール固定液 (メタノール : 酢酸 =3:1) に 20 分間浸し、核を固定し風乾した。固定したスライドガラスを 75 °C に温めた Denature 液に 2 分 30 秒間静置後、冷 70%エタノール、冷 80%エタノールそして冷 99.5%エタノールに 2 分間ずつ静置し、37 °C ホットプレート上にて表面を乾燥させた。Probe は SureFISH (Agilent) にて *TERT* 遺伝子を含むテロメア側 (chr5:1091546-1291839、ラベル : FITC) と *TERT* 遺伝子上流を含むセン



トロメア側 (chr5:1383281-1583190、ラベル : Cy3) を作製した。プローブ Mix (CEP Hybridization Buffer 3.5  $\mu$ l、FISH Probe 0.25  $\mu$ l、MilliQ 水 1.25  $\mu$ l) を 1.5 mL チューブに調製し、75 °C に温めた恒温水槽で 5 分間静置し、その後 1 サンプルあたり 5  $\mu$ l を 37 °C ホットプレート上にて表面を乾燥させたスライドガラスに滴下し泡が入らないようにカバーガラスをかけペーパーボンドでシールし、湿潤箱に入れたのち 37 °C インキュベーターにて **overnight** で静置した。その後、カバーガラスとペーパーボンドを剥がし、恒温水槽で 45 °C に温めた Wash Buffer-1 (バスケット入り), -2, -3 および 2XSSC の順で 7 分間スライドガラスを静置した。次にスライドガラスを NP-40 Buffer (室温) に 5 分間静置し、MQ 水 (室温) にスライドガラスを浸した。DAPI 溶液 10  $\mu$ L と Fluorescence Mounting Medium1 滴を滴下し泡が入らないようにカバーガラスで覆い、余分な液体を拭き取ったのち、マニキュアでシールした。オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 にて BZ-X Analyzer を用いて画像を取得した。核の長径に対してシグナル同士が 10% 以上離れていた場合に *TERT* 遺伝子構造異常ありとした。

### Array CGH

Microarray-based comparative genomic hybridization : Array CGH は、8x60K ヒトゲノム CGH またはヒトゲノムカスタマイズ 8x60K CGH + SNP マ

マイクロアレイキット(デザイン ID; 085563 または 086552、Agilent)を使用し  
て、製造元のプロトコルに従って神経芽腫検体に対して実施した。1p loss、11q  
loss、17q gain、および *MYCN* 増幅を含む染色体異常プロファイルと組み合わ  
せて、各腫瘍をゲノムサブグループに分類した (24, 25)。

### *ATRX* 遺伝子解析

*ATRX* 遺伝子のコピー数多型分析は、TaqMan qPCR 分析およびカスタマイズ  
された 8x60K CGH + SNP 分析(設計 ID; 086552、Agilent)によって施行した。  
qPCR 分析は各種プライマー (*ATRX*: 20  $\mu$ M forward primer 5'-tgaacaagaagt  
ggagagttcatc-3'、20  $\mu$ M reverse primer 5'-gggaaacaggagtgagtttaaca-3'、Taq  
Man probe Universal ProbeLibrary #82、*SMARCA1*: 20  $\mu$ M forward prime  
r 5'-TCCTGGACCTCACATGGTTT-3'、20  $\mu$ M reverse primer 5'-CTGGCATC  
CTTGTCTCCGA-3'、10  $\mu$ M TaqMan probe : FAM-ACGATGGGTCCCATCTCT  
CCGTGT-BHQ1) 反応液 (TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X) 5  $\mu$ l、  
20  $\mu$ M *ATRX* forward primer 0.2  $\mu$ l、20  $\mu$ M *ATRX* reverse primer 0.2  $\mu$ l、  
10  $\mu$ M *ATRX* probe 0.1  $\mu$ l、20  $\mu$ M *SMARCA1* forward primer 0.2  $\mu$ l、20  $\mu$   
M *SMARCA1* reverse primer 0.2  $\mu$ l、10  $\mu$ M *SMARCA1* probe 0.1  $\mu$ l、Milli  
Q 水 3  $\mu$ l、Template (gDNA 50 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l) と増幅条件 (50°C 2分、95°C 1

分、95°C 1 秒、60°C 20 秒を 40 サイクル) により施行された。*ATRX* 対立遺伝子の数の値は、X 染色体 q25-q26.1 に位置する *SMARCA1* をコントロールとしてゲノム DNA の qPCR を行ない、*ATRX* / *SMARCA1* の比率として示し、男性と女性の患者で 0.66 未満を *ATRX* 遺伝子欠失と定義した。

*ATRX* mRNA の発現解析は、上記 *ATRX* のプライマーと内在性コントロールとして *ACTB* を用いて qPCR を施行した (反応液: TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X) 5 µl、20 µM *ATRX* forward primer 0.2 µl、20 µM *ATRX* reverse primer 0.2 µl、10 µM *ATRX* probe 0.1 µl、*ACTB* 0.5 µl、MQ 3 µl、Template (cDNA) 1 µl) (増幅条件は *ATRX* コピー数解析と同様)。ALT 陰性神経芽腫で *ATRX* mRNA 発現量が最も低かった腫瘍の 70% 未満を示した ALT 陽性腫瘍を *ATRX* mRNA の発現低下とし、20% 未満の腫瘍を *ATRX* mRNA の発現消失とした。

#### *TERT* 遺伝子プロモーターおよび *ATRX* 遺伝子のシーケンス解析

*TERT* 遺伝子のプロモーターと *ATRX* 遺伝子変異解析はそれぞれゲノム DNA を PCR により増幅した (*TERT* promotor: 20 µM forward primer 5'-CTCCCA GTGGATTCGCGGGC-3'、20 µM reverse primer 5'-CCCACGTGCGCAGCAG GAC-3'、*ATRX*: 1 forward 5'-AGCAGCAGCTACAGTGACGA-3'、1 reverse

5'-GTTCTGGCAGCACCAATTTT-3', 2 forward 5'-GGTGAGCAGGATGAG TCACA-3', 2 reverse 5'-CGTCGCCTTTTCTTTTTCTG-3', 3 forward 5'-TGAGCCAGAAGAAGGGAAAA-3', 3 reverse 5'-ATTCGTGTTTTGGAGGCAAG-3', 4 forward 5'-CAGGCCCTGATTTTGTGTT-3', 4 reverse 5'-GGTTGCTAAAAGCAGGCATAA-3', 反応液 : AmpliTaq Gold® 360 Master Mix 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ M forward primer 0.5  $\mu$ l, 20  $\mu$ M reverse primer 0.5  $\mu$ l, 360 G C Enhancer 1  $\mu$ l, MQ 7  $\mu$ l, Template (gDNA 50 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 増幅条件 : *TERT* promotor : 95°C 10 分、95°C 20 秒と 60°C 20 秒と 72°C 20 秒を 40 サイクル、72°C 1 分、*ATRX* : 95°C 10 分、95°C 20 秒と 60°C 20 秒と 72°C 3 分を 30 サイクル、72°C 3 分) (26)。得られた PCR 産物は QIAquick PCR purification kit を用いてプロトコルに従い EB buffer 100  $\mu$ l にて精製した。精製した PCR 産物は表の条件にて BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用いてシーケンス反応を行い、BigDye XTerminator™ Purification Kit にて精製後、DNA シーケンサー 3500xL を用いて解析した。シーケンス反応に用いたプライマーは *TERT* 遺伝子のプロモーター変異解析については PCR と同様のプライマーを用いた。*ATRX* 変異解析については、PCR のプライマーに加えプライマー (*ATRX* : 1 forward 5'-ATTGTGAGCTGCACTGCTTG-3', 1 reverse 5'-TTCATTCAGCACTGGCTCTG-3', 2 forward 5'-CAAGCAAGTGCTTCCACT

GA-3', 2 reverse 5'-CAGTTCCCTTTTTTCGAGACG-3', 3 forward 5'- AAGAT  
GCTTCACCCACCAAG-3', 3 reverse 5'- CGGCACAAATTGACTGTGAG-3') を  
用いた。

### 統計学的分析

患者は、生物学的および臨床的側面に従ってグループ化した。グループ間の特性の違いの有意性は、 $\chi^2$  検定または Fisher's exact 検定、Student's t 検定、および Welch's t 検定を施行し、 $P < 0.05$  を「統計学的有意差あり」とした。

## 【結果】

### 神経芽腫の C-circle、*TERT* mRNA、TC 発現解析

神経芽腫(n=257)、神経節芽腫(n=48)、神経節腫(n=18)の年齢、性別、*MYCN* ステータス、INSS、リスク分類、ploidy などの臨床像は表のようになった(表 1)。

神経節芽腫群腫瘍それぞれにおける ALT、*TERT* mRNA 発現、TC の結果に関して臨床像との相関を図にした(図 1)。それらの中からまず神経芽腫に関して解析をおこなった。神経芽腫の C-circle と *TERT* mRNA の発現量を qPCR で測定し、年齢・INSS・*MYCN* ステータス・リスク分類・Ploidy との解析を施行した。ALT 陽性症例は 249 例中 36 例[14.5%]であった。ALT 陽性症例は月齢 18 以上(月齢 $\geq$ 18: 135 例中 36 例[26.7%]、月齢 $<$ 18: 114 例中 0 例[%]  $P<0.05$ )、INSS stage4 (stage4: 142 例中 28 例[19.7%]、stage1-3: 84 例中 6 例[7.1%]  $P<0.05$ )、高リスク群(高リスク群: 131 例中 29 例[22.1%]、低中間リスク群: 114 例中 5 例[4.4%]  $P<0.05$ )、ploidy (diploidy: 130 例中 28 例[21.5%]、aneuploidy: 100 例中 8 例[8.0%]  $P<0.05$ ) で有意に高い割合であった(表 2)(図 2A)。

*TERT* mRNA 高発現症例は 169 例中 64 例[37.9%]であった。*TERT* mRNA 高発現症例は月齢 18 以上(月齢 $\geq$ 18: 100 例中 50 例[50.0%]、月齢 $<$ 18: 69 例中 14 例[20.2%]  $P<0.05$ )、INSS stage4 (stage4: 48 例中 103 例[46.6%]、stage1-

3:53 例中 16 例[30.2%]  $P<0.05$ )、高リスク群(高リスク群:100 例中 57 例[57.0%]、低中間リスク群: 63 例中 7 例[11.1%]  $P<0.05$ ) で有意に高い割合であった。しかしながら ploidy (diploidy: 91 例中 40 例[44.0%]、aneuploidy: 66 例中 19 例[28.8%]  $P=0.0527$ ) では有意差を認めなかった(表 2)(図 2A)。

*MYCN* ステータスに関しては ALT 陽性では *MYCN* 非増幅で 181 例中 35 例[19.4%]、*MYCN* 増幅で 67 例中 1 例[1.5%] ( $P<0.05$ ) であった。ALT 陽性かつ *MYCN* 増幅が認められた 1 症例は FISH 解析から *MYCN* 増幅細胞が 10%で認められており、ALT 陽性クローンと *MYCN* 増幅クローンからなる腫瘍であると考えられ、既知の通り *MYCN* 増幅と ALT 陽性は相互排他的であった。*TERT* mRNA 高発現は *MYCN* 増幅 54 例中 41 例[75.9%]で生じており、*MYCN* 非増幅 114 例中 23 例[20.2%] ( $P<0.05$ ) で生じていた。

また ALT と *TERT* mRNA 高発現のテロメア長の違いを解析するため、ALT 陽性高リスク神経芽腫( $n=30$ )、*TERT* mRNA 高発現高リスク神経芽腫( $n=55$ )、ALT 陰性かつ *TERT* mRNA 低発現高リスク神経芽腫( $n=20$ )、および非高リスク神経芽腫( $n=115$ )の 4 つのグループに分け解析を施行した。結果、ALT 陽性神経芽腫において TC の実測値は他群と比較して優位に高値であった(ALT 陽性 vs *TERT* mRNA 高発現:  $P<0.05$ 、ALT 陽性 vs *TERT* mRNA 低発現/ALT 陰性、非高リスク:  $P<0.05$ ) (図 2B)。

### 神経節芽腫および神経節腫の C-circle、TERT mRNA、TC 発現解析

神経芽腫と同様に、神経節芽腫の C-circle(n=44)と TERT mRNA (n=31)の測定し、年齢・INSS・MYCN ステータス・リスク分類・Ploidy との解析を施行した。ALT 陽性症例は 6 例[13.6%]、TERT mRNA 発現のあるものは 7 例[22.6%]であった。ALT 陽性症例は INSS stage4 (stage4 : 13 例中 5 例[38.5%]、stage1-3 : 27 例中 0 例[0%] P<0.05)、高リスク群 (高リスク群 : 13 例中 5 例[38.5%]、低中間リスク群 : 27 例中 0 例[0%] P<0.05) で有意に高い割合であった。TERT mRNA 高発現は INSS stage4 (stage4 : 10 例中 5 例[50%]、stage1-3 : 19 例中 2 例[10.5%] P<0.05) のみで有意に高い割合であった。検体数が少なく C-circle も TERT mRNA とともに年齢、ploidy では有意差を認めなかった。MYCN ステータスに関しては神経節芽腫では MYCN 増幅のものは認めなかった。神経節腫では ALT 陽性は認めず : 16 例中 0 例、TERT mRNA 高発現は 1 例(8 例中 1 例【12.5%】)のみ認めた (表 3) (図 3A)。

神経芽腫と同様に qPCR での TC の実測値を高リスク群神経芽腫で ALT 陽性 (n=5)、TERT mRNA 高発現(n=2)、TERT mRNA 低発現(n=4)、低リスク群神経芽腫(n=25)の 4 つのグループに分け解析をした。高リスク ALT 陽性群において TC の実測値は、検体が少なく高リスク TERT mRNA 高発現群とは有意差を認め



なかったが、高リスク *TERT* mRNA 低発現/ALT 陰性群、非高リスク群と比較して有意に高値であった (ALT 陽性 vs *TERT* mRNA 高発現 :  $P=0.0952$ 、ALT 陽性 vs *TERT* mRNA 低発現/ALT 陰性、非高リスク群 :  $P<0.05$ ) (図 3B)。神経節腫では TC の高値を認めなかった。

#### *TERT* 遺伝子高発現メカニズムの解析

*MYCN* 非増幅で *TERT* mRNA 高発現を呈する神経芽腫 23 例、神経節芽腫 7 例、神経節腫 1 例に対して *TERT* 遺伝子構造異常を確認するため FISH 解析を施行した。*TERT* 遺伝子構造異常が確認できたものは、神経芽腫で 14 例 (60.9% : 再編成 13 例、増幅 1 例)、神経節芽腫で 1 例 (16.7% : 再編成 1 例)、神経節腫では認めなかった。神経芽腫の 1 例においては *TERT* 遺伝子構造異常は認めなかったが、*TERT* 遺伝子プロモーター領域の変異を認めた (表 4) (図 4)。神経節芽腫と神経節腫では *TERT* 遺伝子プロモーター領域の変異は生じていなかった。*MYCN* 非増幅神経芽腫では *TERT* 遺伝子のプロモーター領域の変異または構造異常が *TERT* mRNA の高発現を生じる主たるメカニズムであるが、神経節芽腫では神経芽腫と異なるメカニズムによって *TERT* mRNA の高発現が生じている可能性が示唆された。*TERT* 遺伝子のゲノム異常は認めなかったが *TERT* mRNA 高発現を呈した神経芽腫 5 例、神経節芽腫 6 例および神経節腫 1 例にて、共通し

た染色体異常が生じているかを明らかにするため、CGH および CGH + SNP array 解析を実施した。神経節芽腫 3 例および神経節腫 1 例については染色体異常が認められず正常細胞の影響が考えられたため本解析から除外した。17q の部分増加が 8 例中 7 例、11q の部分欠失が 8 例中 6 例、ついで 7q の増加が 8 例中 5 例（全体の増加 4 例、部分増加 1 例）と 11q の部分増加が 8 例中 5 例に認めた。ゲノム異常を基としたリスク分類では 8 例中 7 例が *MYCN* 非増幅例で予後不良である P3s と P4s に分類された（図 5）。

#### ALT 陽性神経芽腫における *ATRX* 遺伝子欠失解析

ALT 陽性神経芽腫 32 例に *ATRX* の exon9 を対象としたゲノム DNA qPCR を施行し、11 例[34.4%]で *ATRX* 欠失（X 染色体の欠失ではない）を確認した。また、ALT 陽性神経芽腫 32 例において *ATRX* mRNA（exon9）発現解析を実施したところ、12 例において *ATRX* mRNA の発現低下および消失が生じていた。ALT 陰性神経芽腫と比較して ALT 陽性神経芽腫では有意に発現低下が認められた（ $p=0.018$ ）。*ATRX* 遺伝子欠失が確認された 11 例中 9 例に、*ATRX* mRNA の発現低下または消失が確認された。*ATRX*（exon9）に欠失がないにもかかわらず、*ATRX* mRNA（exon9）の発現低下している神経芽腫 3 例を見出した。この 3 例では転写調節領域や exon1 を含む欠失が考えられたことより、*ATRX* の他の領域

の欠失を解析できるカスタム CGH +SNP array を実施し、1 例において intron1 を含む欠失を確認した。この症例では *ATRX* 転写調節領域や exon1 を含む領域が欠失しているため、*ATRX* の発現消失が生じていたと考えられた（表 5）。

#### ALT 陽性神経節芽腫における *ATRX* 遺伝子の解析

神経節芽腫において *ATRX* 遺伝子異常の報告はない。我々は神経節芽腫においても ALT 陽性症例で *ATRX* 遺伝子異常が生じているかを明らかにするため、ALT 陽性神経節芽腫 6 例で *ATRX* 遺伝子解析を *ATRX* ゲノム qPCR、カスタム CGH +SNP array およびサンガーシーケンス法にて実施した。男児 4 例中 3 例にて、qPCR とカスタム CGH +SNP array 両方で exon9 を含む欠失を同定し、発現解析にてにおいても *ATRX* mRNA の発現減少または消失が確認された。*ATRX* の欠失が生じていなかった男児 1 例はサンガーシーケンス解析により c.2518dup が生じていることを確認した。女児 1 例ではゲノム qPCR とカスタム CGH +SNP array 解析から、片方の X 染色体の欠失および残存アレルでは *ATRX* の部分欠失が認められた。また、他の女児 1 症例ではゲノム qPCR 解析からは exon9 を含む欠失が片アレルで生じており、サンガーシーケンス解析により c.178\_2220del2023 と c.2518dup が認められた。この症例では *ATRX* 遺伝子変異が対立遺伝子で生じていると考えられた。ALT 陽性神経節芽腫の全症例にて

*ATRX* 遺伝子異常を同定した (表 5)。

#### ALT 陽性神経芽腫群腫瘍における染色体異常

ALT 陽性神経芽腫群腫瘍において特徴的な染色体異常があるかを ALT 陽性神経芽腫 24 例および ALT 陽性神経節芽腫 6 例にて解析した。全例にて 17q の増加 (うち 3 例は Chr.17 の増加) を認め、11q の部分欠失が 29 例 (97.0%) に生じていた。他の染色体異常では 7q の部分増加および全体増加が 24 例 (80.0%)、2p の部分増加が 18 例 (60.0%)、7p の部分増加および全体増加が 15 例 (50.0%)、11p の部分増加および全体増加 13 例 (43.3%)、18q の部分増加および全体増加 13 例 (43.3%) と多く認めた。ゲノム異常によるリスク分類では P3s が 27 例 (90.0%)、P2s、P4s、W3s がそれぞれ 1 例であった (図 6)。

17q の部分増加と 11q の部分増加の次に多検体で異常が認められた 7q の増加に着目し、共通微小増加領域 16.5 Mb (hg19: chr.17 127892164- 144419786) を同定した (図 7)。

## 【考察】

本研究では神経芽腫においてテロメア維持機構である *TERT* mRNA 高発現および ALT 陽性は年齢、INSS stage4、高リスク群で有意に高い割合で起こっており、また ALT 陽性は *MYCN* 遺伝子増幅とは相互排他的であるという海外で報告されているデータと同様な結果が得られた (9-11, 15-17)。このことから再現性がとれ本解析系が有用であることが確認された。神経節芽腫や神経節腫において多数検体での *TERT* mRNA の発現解析、および ALT の解析の報告はされていない。

本研究では神経節芽腫において 43 例中 6 例 (14.0%) で ALT 陽性を、また 31 例中 7 例 (22.6%) で *TERT* 遺伝子の高発現を認めた。1 例は ALT 陽性と *TERT* 遺伝子の高発現の両方を認めたため、神経節芽腫では 12 例で TMM の亢進が生じており、12 例のうち 10 例 (83.3%) は予後不良な nodular type であった。神経芽腫では高リスク神経芽腫の中でも TMM の亢進を呈する腫瘍は特に予後不良であることが知られていることより (9-11, 15-17)、nodular type の神経節芽腫でも TMM の亢進を呈する腫瘍は特に予後不良である可能性が考えられた。神経節腫 16 例の解析では ALT 陽性例はなく *TERT* mRNA 高発現を 1 例認めた。低・中間リスク神経芽腫で TMM の亢進を呈する腫瘍は予後不良であることから (15)、TMM の亢進を呈した intermixed type 神経節芽腫および神経節腫についても予後

不良である可能性が考えられる。本研究で使用された検体に関しての予後データは得られておらず、あくまでも推測になってしまうため、今後さらに多くの検体での解析を進めるとともに予後データと合わせた詳細な検討が必要である。

様々な癌腫において *TERT* 遺伝子高発現による TMM の亢進が報告されていることからテロメラーゼを標的とした分子標的薬 (Imetelstat, BIBR1532, Sodium metaarsenin および telomestatin) が開発されている (28)。これらの分子標的薬は、神経芽細胞腫をはじめとした様々なテロメラーゼ活性が高い細胞株で有効性が示されているが、その毒性と強い副作用のため臨床試験が中止または開始されていない。6-thio-2'-deoxyguanosine(6-thio-dG)は、これまでのテロメラーゼ阻害剤と異なったメカニズムによりテロメア伸長を阻害するため、副作用が少ないと考えられている (29)。テロメラーゼ活性を示す神経芽腫モデルで 6-thio-dG の有効性が報告されている (16)。一方、ALT 陽性腫瘍に対する分子標的薬の開発も進行している。ATM 阻害剤である AZD0156 は ALT 陽性神経芽細胞腫において *in vitro* および *in vivo* で temozolomide と irinotecan との併用で相乗効果が報告された (30)。TMM の亢進している神経節芽腫や神経節腫が治療抵抗性であるなら ALT によるものかテロメラーゼの活性化によるものなのかを明らかにした上で、これらの分子標的薬が有用となる可能性がある。

神経芽腫において *TERT* mRNA 高発現は *MYCN* 増幅および *TERT* 遺伝子再編

成によって生じる (10)。本研究においても神経芽腫では *MYCN* 非増幅で *TERT* mRNA 高発現の症例では *TERT* 遺伝子再編成が多く確認された。また *TERT* mRNA 高発現で *TERT* 遺伝子再編成がない症例でも、*TERT* 遺伝子増幅や *TERT* 遺伝子プロモーター領域へテロ接合変異が確認された。*TERT* 遺伝子増幅や *TERT* 遺伝子プロモーター領域の変異は神経芽細胞腫においてはこれまでの報告と同様非常に稀であった。*TERT* 遺伝子の mRNA 高発現を呈する神経芽腫では *TERT* 遺伝子のゲノム異常が 23 例中 15 例で生じており、主なメカニズムであった。一方、神経節芽腫においては *TERT* 遺伝子 mRNA 高発現 7 例中 6 例で *TERT* 遺伝子のゲノム異常が認められず、神経芽腫とは異なるメカニズムで *TERT* 遺伝子 mRNA の高発現が生じていると考えられた。*TERT* 遺伝子の発現は様々な転写因子や転写抑制因子によって制御されている (31)。我々は *TERT* 遺伝子高発現で *TERT* 遺伝子ゲノム異常や *MYCN* 増幅のない神経芽腫群腫瘍で *TERT* 遺伝子の発現調節因子をコードする領域のゲノム異常が生じていると考え CGH 解析を行った。11q の欠失および 17q の増加が高頻度に認められたが、*TERT* 遺伝子の発現が低い ALT 陽性腫瘍でも同様な結果であったため、候補を絞ることができなかった。今後、*TERT* 遺伝子のゲノム異常や *MYCN* 増幅に依存しない *TERT* 遺伝子高発現のメカニズムを明らかにするため、より多くの検体で解析する必要がある。

本研究では神経節芽腫で初めて *ATRX* 遺伝子に変異が生じていることを明らかにした。*ATRX* 遺伝子変異が ALT 陽性神経節芽腫のすべてで生じていた。これらの中には qPCR では発現低発現や欠失を認めないが、シーケンスによって *ATRX* 遺伝子変異を認めた症例を 4 例認めた。これらは qPCR で設定したプライマー領域の欠失は認めなかったためであると考えられる。qPCR にシーケンスを組み合わせることでより検出できる可能性が示唆された。

神経節芽腫をはじめとした他の腫瘍と同様に *ATRX* 遺伝子変異神経節芽腫症例では ALT によりテロメア維持機構が亢進していることを明らかにした。しかしながら、*ATRX* 遺伝子異常だけでは ALT は生じないと考えられている (32、33)。ALT 陽性神経節芽腫群腫瘍の array CGH 解析から、ALT 陽性神経節芽腫群腫瘍では 17q 増加が全症例で、また 11q 部分増加が 97% の症例で認められた。17q 増加と 11q 部分欠失は ALT 陰性神経節芽腫群腫瘍においても高頻度に認められることから (図 5)、*ATRX* 遺伝子変異などによって生じる ALT は 17q 増加と 11q 部分欠失の後に生じるイベントであることが示唆された。ALT 陽性神経節芽腫群腫瘍で 17q 増加と 11q 部分欠失について多い 7q 増加に着目したところ、7q の共通染色体増加領域 (16.5 Mb) を見出した。この領域には *BRAF* 遺伝子が位置していた。*BRAF* 遺伝子の下流である *MAPK* が活性化している神経節芽腫は予後不良である (15)。以上より、7q 増加が ALT 陽性に関与していることが示唆され、ALT 陽



性神経芽腫群腫瘍において 7q 共通染色体増加領域の染色体増加が予後マーカーとして有用である可能性が示唆された。

## 【まとめ】

神経節芽腫や神経節腫を含む神経芽腫群腫瘍において、テロメア維持機構亢進が予後因子となる可能性が示唆された。また ALT 陽性神経芽腫群腫瘍において予後と相関する可能性のある領域を 7q に同定した。

【謝辞】

本研究を実行するにあたりまして、懇切丁寧な研究のご指導を賜りました埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 上條岳彦所長、春田雅之主任に深謝いたします。

本研究に関して、ご指導・ご校閲を賜りました日本大学医学部外科学系小児外科分野 越永従道教授、上原秀一郎准教授に深謝いたします。

本研究を行うにあたりまして、多大なるご協力をいただきました日本大学医学部外科学系小児外科分野の医局員の皆様に深謝いたします。

【表】

		神経芽腫 (n=257)		神経節芽腫 (n=48)		神経節腫 (n=18)	
		n	Percent(%)	n	Percent(%)	n	Percent(%)
月齢	< 18	115	45	5	10	0	0
	≥ 18	142	55	43	90	18	100
性別	男性	149	58	31	65	2	11
	女性	108	42	17	35	16	89
INSS	1,2 or 3	85	33	30	63	14	78
	4	149	58	14	29	0	0
	4S	15	6	0	0	0	0
	Unknown	8	4	4	8	4	22
MYCN status	Not Amplified	183	71	48	100	17	94
	Amplified	71	28	0	0	0	0
	Unknown	3	1	0	0	1	6
Risk分類	High	139	54	9	19	0	0
	Low or Intermediate	114	45	37	77	14	78
	unknown	4	2	2	4	4	22
Ploidy	diploidy	134	52	33	69	11	61
	aneuploidy	101	39	10	21	1	6
	unknown	22	9	5	10	6	33

1：神経芽腫、神経節芽腫および神経節腫の診断時のリスクに基づく患者情報

	ALT(n=249)			P値	TERT(n=169)			P値
	ALT(+)	n	percent(%)		TERT-H	n	percent(%)	
<b>月齡</b>								
<18	0	114	0	<0.05	14	69	20	<0.05
≥18	36	135	27		50	100	50	
<b>性別</b>								
男性	17	147	12	-	42	100	42	-
女性	19	102	19		22	69	32	
<b>INSS</b>								
1,2 or 3	6	84	7	<0.05	16	53	30	<0.05
4	28	142	20		48	103	47	
4S	0	14	0		0	0	0	
unknown	2	9	22		0	13	0	
<b>MYCN Status</b>								
Not Amplified	1	67	1	<0.05	23	114	20	<0.05
Amplified	35	181	19		41	54	76	
unknown	0	1	0		0	1	0	
<b>Risk分類</b>								
Low or Intermediate	5	114	4	<0.05	7	62	11	<0.05
High	29	131	22		57	101	56	
unknown	2	4	50		0	6	0	
<b>Ploidy</b>								
Aneuploidy	8	100	8	<0.05	19	66	29	>0.05
Diploidy	28	130	22		40	91	44	
unknown	0	19	0		5	12	42	

2 : 神経芽腫における ALT と TERT mRNA 発現のリスク因子との相関

	ALT(n=44)			P値	TERT(n=31)			P値
	ALT(+)	n	percent(%)		TERT-H	n	percent(%)	
<b>月齡</b>								
<18	0	5	0	1	1	3	33	>0.05
≥18	6	39	15		6	28	21	
<b>性別</b>								
男性	4	29	14	-	4	19	21	-
女性	2	15	13		3	12	25	
<b>INSS</b>								
1,2 or 3	0	27	0	<0.05	2	19	11	<0.05
4	5	13	38		5	10	50	
4S	0	0	0		0	0	0	
unknown	1	4	25		0	2	0	
<b>MYCN Status</b>								
Not Amplified	6	44	14	1	7	31	23	1
Amplified	0	0	0		0	0	0	
<b>Risk分類</b>								
Low or Intermediate	0	27	0	<0.05	3	19	16	>0.05
High	5	13	38		4	10	40	
unknown	1	4	25		0	2	0	
<b>Ploidy</b>								
Aneuploidy	1	8	13	1	2	7	29	>0.05
Diploidy	5	31	16		4	20	20	
unknown	0	5	0		1	4	25	

3： 神経節芽腫の ALT と TERT 発現に関して、診断時のリスクに基づく患者情報

	検体番号	INSS	月齢	<i>TERT</i> expression	<i>TERT</i> genomic abnormality
神経芽腫 <i>MYCN</i> 非増幅	3	4	18	0.37	rearrangement
	14	2A	27	1.65	rearrangement
	62	4	66	0.51	rearrangement
	94	4	34	1.57	rearrangement
	95	4	47	1.35	rearrangement
	144	3	42	0.70	rearrangement
	158	4	48	0.62	rearrangement
	237	4	48	7.74	rearrangement
	240	4	76	1.45	rearrangement
	254	4	36	2.81	rearrangement
	289	4	40	0.48	rearrangement
	320	4	36	0.61	rearrangement
	323	4	69	7.35	rearrangement
	182	4	42	1.33	amplification
	146	4	42	0.43	promoter mutation
	32	4	22	0.55	-
	180	4	17	2.36	-
	249	4	37	1.70	-
	295	3	29	0.43	-
	298	3	56	1.59	-
198	4	62	0.64	ND	
213	3	39	0.52	ND	
243	1	19	0.44	ND	
神経節芽腫 <i>MYCN</i> 非増幅	194	4	36	6.55	rearrangement
	9	4	57	0.71	-
	153	4	14	0.49	-
	207	1	44	0.41	-
	233	4	39	0.76	-
	270	4	66	0.58	-
	280	2A	32	1.24	-

表 4: *TERT* mRNA 高発現の神経芽腫および神経節芽腫における *TERT* 遺伝子変異解析

	sample number	INSS	age(month)	gender	<i>ATRX</i> mRNA expression	<i>ATRX</i> genomic abnormality by qPCR and SNP+ CGH
High Risk NB	80	4	91	F	0.019	Loss
	130	4	45	M	0.019	Loss
	18	4	59	F	0.020	Loss
	76	4	68	M	0.021	Loss
	127	4	50	M	0.022	Loss
	64	4	45	M	0.038	Loss
	50	4	58	M	0.050	Loss
	220	4	71	F	0.062	Loss
	266	4	43	M	0.078	Loss
	13	4	121	M	0.095	Loss
	52	4	56	F	0.097	Loss
	81	4	51	M	0.098	Loss
	159	4	86	M	0.070	<i>ATRX</i> promotor region loss
	98	4	48	F	0.025	Retain*
	115	4	88	M	0.090	Retain*
	246	4	49	F	0.173	Retain*
	297	4	37	F	0.270	Retain*
	276	4	42	F	0.418	Retain*
	271	4	120	M	0.505	Retain*
	6	4	75	F	3.039	Retain*
48	4	41	M	0.134	ND	
142	4	20	F	0.271	ND	
209	4	39	F	0.297	ND	
91	4	28	M	0.384	ND	
46	4	71	F	0.437	ND	
37	4	45	F	0.492	ND	
Non-high Risk NB	260	3	49	F	0.075	Retain*
	173	3	73	F	0.139	Retain*
	229	-	95	F	0.174	Retain*
	144	3	42	M	0.284	Retain*
	285	-	45	M	0.365	Retain*
	214	2A	76	M	0.227	ND
GNB	216	4	39	M	0.017	Loss
	261	-	40	M	0.049	Loss
	88	4	53	F	0.092	Loss/c.2518dup
	120	4	43	F	0.106	Loss
	78	4	25	M	0.261	Loss
	233	4	39	M	0.786	c.2518dup

ATRX mRNA 発現減少

ATRX mRNA 発現消失

ND：発現解析のみ施行

Retain\*：発現解析とCGH解析のみ施行し、CGH+SNP arrayおよびシーケンス解析は施行していない

表 5：ALT 陽性の神経芽腫、神経節芽腫における *ATRX* 遺伝子変異解析。

ALT 陽性の神経芽腫、神経節芽腫の年齢、INSS、性別のステータスと、qPCR による *ATRX* mRNA 発現量と CGH +SNP array または qPCR による *ATRX* 遺伝子コピー数変異



解析の結果を表にまとめた。神経芽腫では 32 例中 12 例【37%】で *ATRX* 遺伝子欠失、1 例で *ATRX* プロモーター領域の変異を認めた。神経節芽腫では 6 例全てで *ATRX* 遺伝子変異を認めた。

【図】

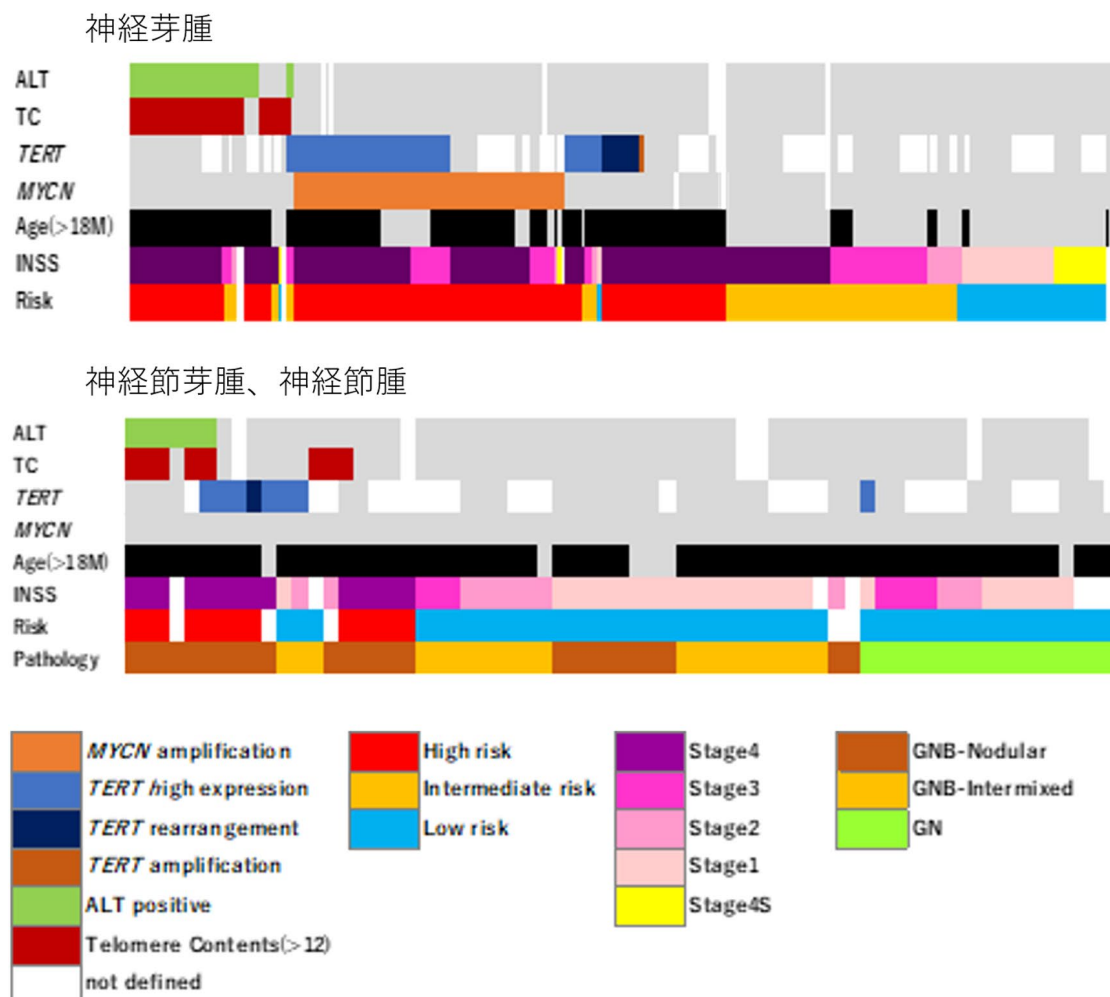


図1：神経芽細胞腫、神経節神経芽細胞腫および神経節神経腫に関する各種ステータス

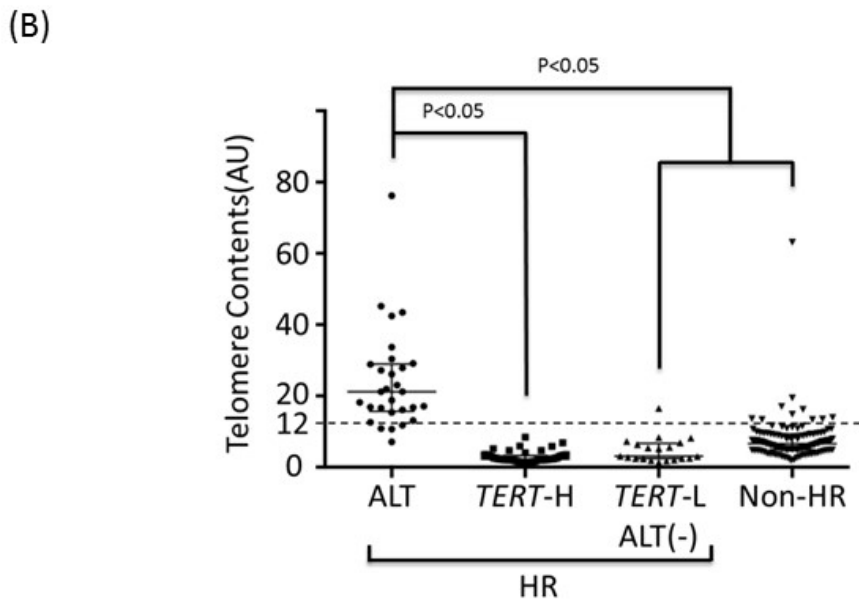
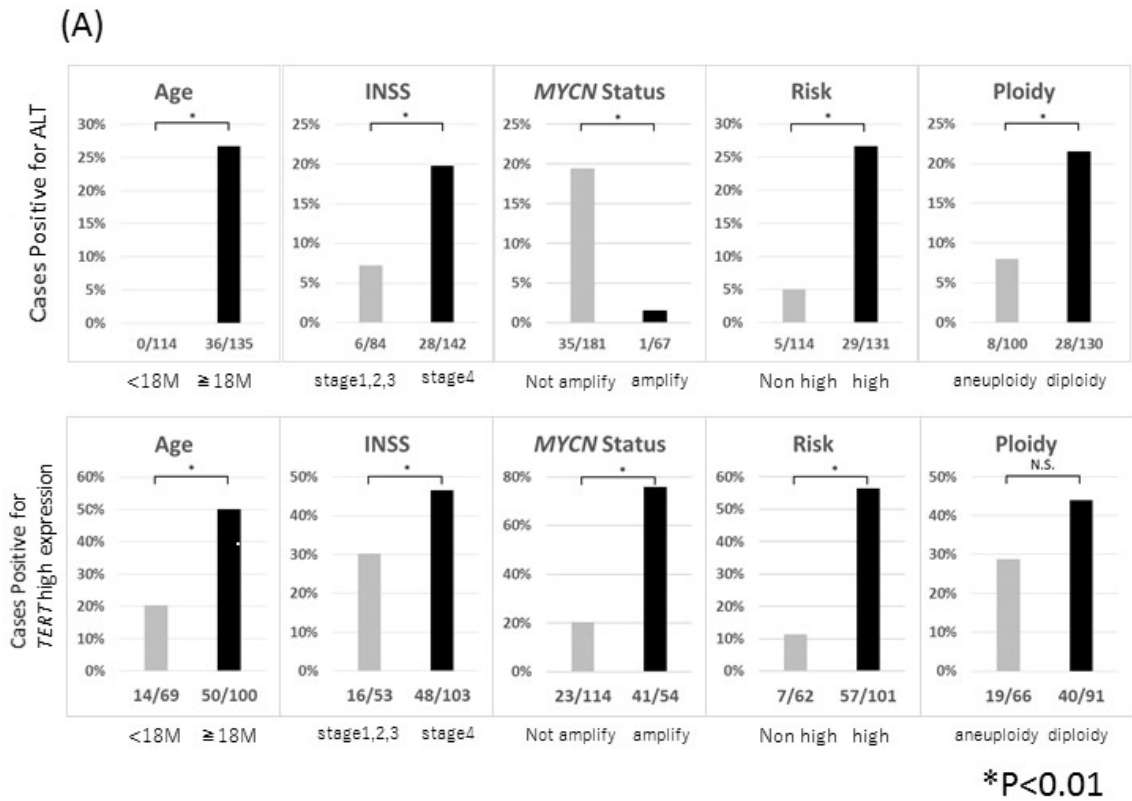


図2：神経芽腫におけるALTとTERT mRNA発現のリスク因子との相関

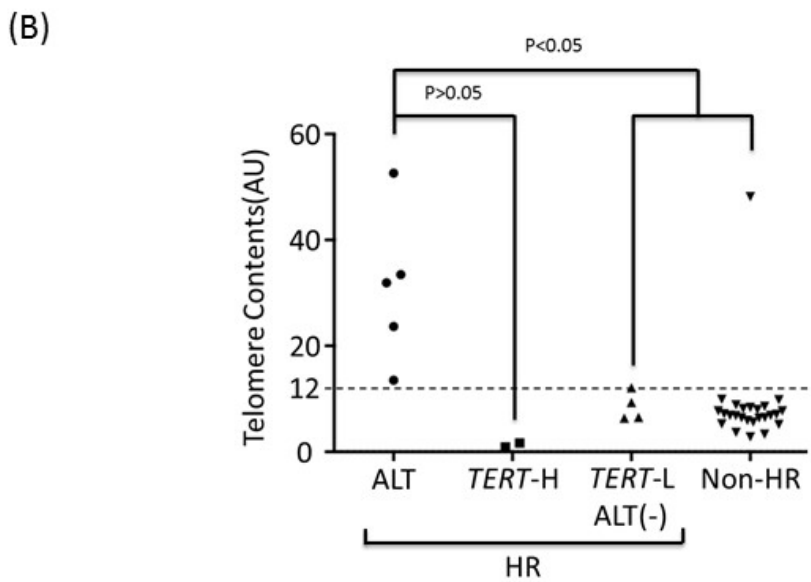
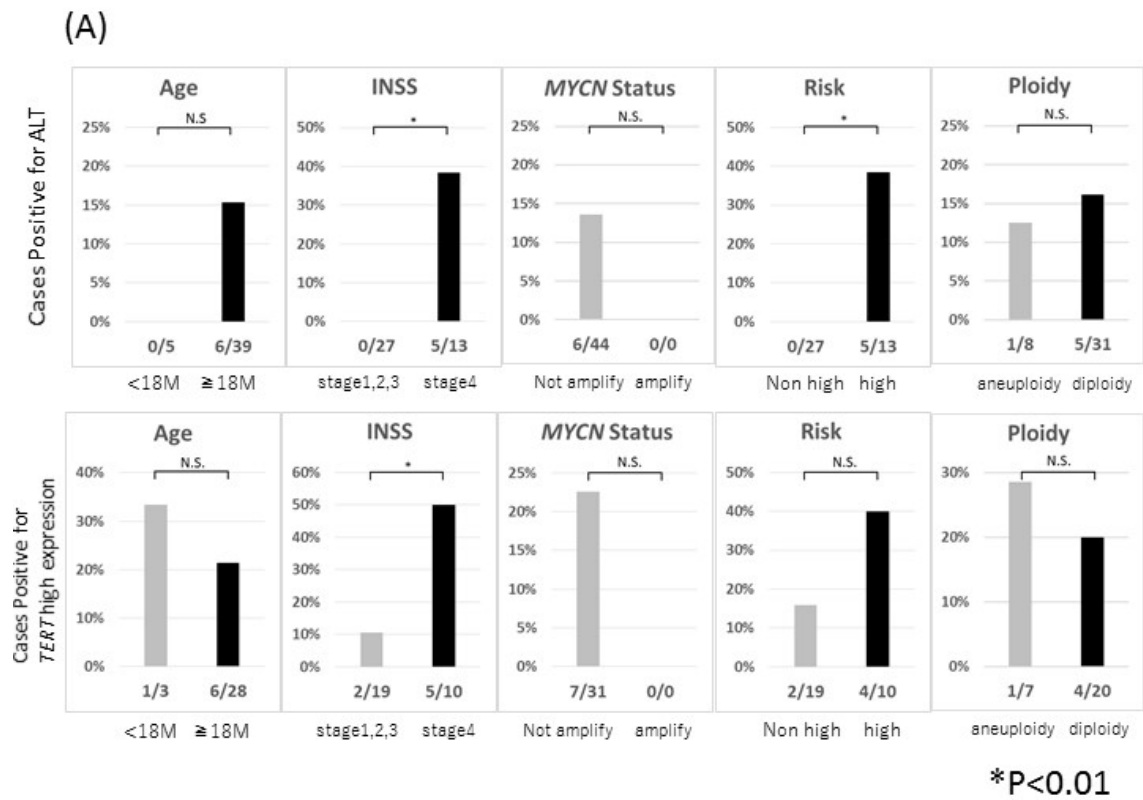
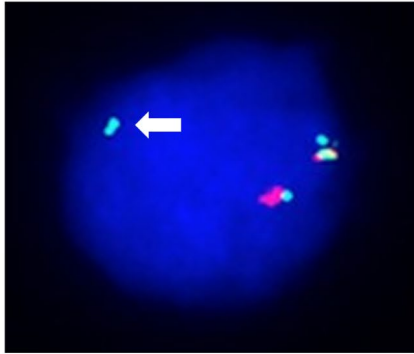
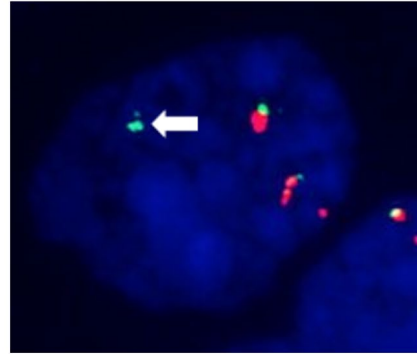


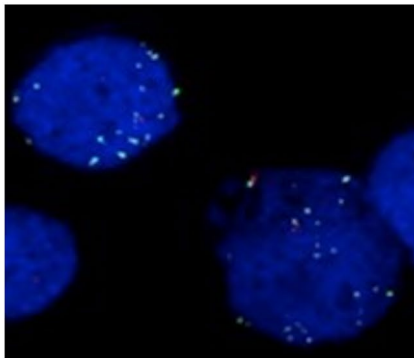
図3：神経節芽腫におけるALTとTERT mRNA発現のリスク因子との相関



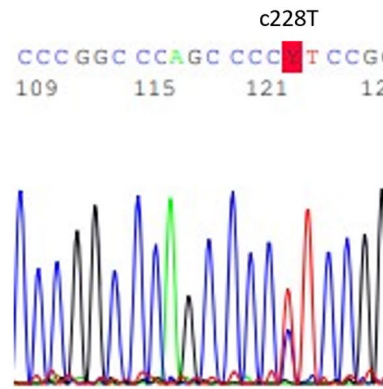
Neuroblastoma (323)  
*MYCN* not amplified, *TERT*-High



Ganglioneuroblastoma (194)  
*MYCN* not amplified, *TERT*-High



Neuroblastoma (182)  
*MYCN* not amplified, *TERT*-High  
*TERT* amplified



Neuroblastoma (146)  
*MYCN* not amplified, *TERT*-High

図4：神経芽腫および神経節芽腫の*TERT*遺伝子構造異常の解析





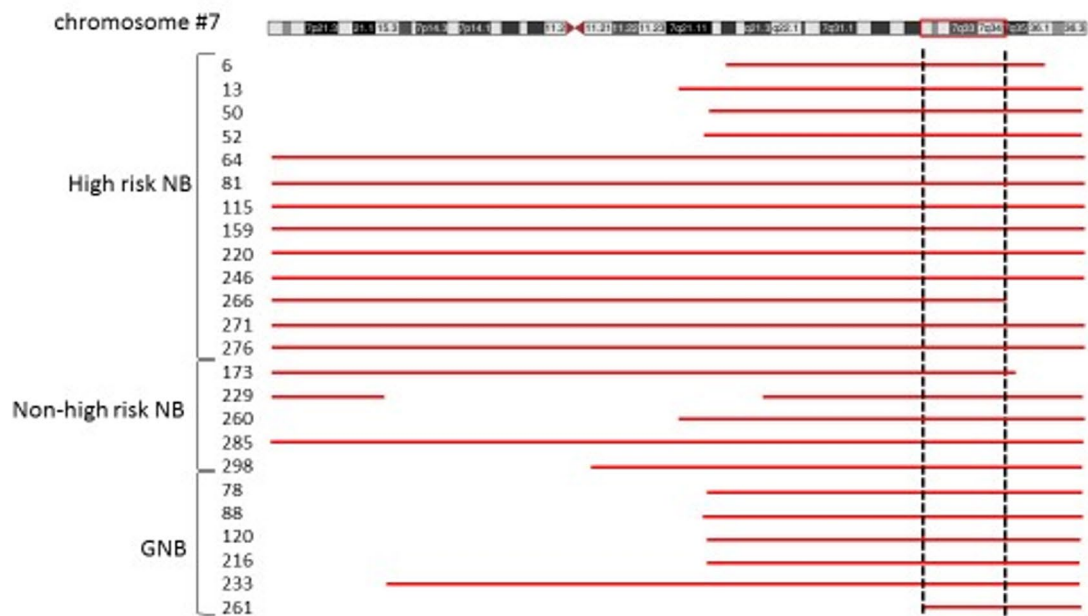


図7：ALT陽性の神経芽腫および神経節芽腫における7qの共通微小増加領域



## 【図説】

図 1：神経芽細胞腫、神経節神経芽細胞腫および神経節神経腫に関する各種ステータス  
神経芽細胞腫、神経節神経芽細胞腫および神経節神経腫の臨床像、*MYCN* ステータス、*TERT* mRNA 発現、C-circle 活性、および TC に関して図に示した。

図 2：神経芽腫における ALT と *TERT* mRNA 発現のリスク因子との相関

(A) 年齢 (灰色：18 か月未満、黒：18 か月以上)、INSS (灰色：stage 1~3、黒：stage 4)、*MYCN* ステータス (灰色：*MYCN* 非増幅、黒：*MYCN* 増幅)、リスク分類 (灰色：低または中リスク、黒：高リスク)、および ploidy (灰色：aneuploidy、黒：diploidy) 毎に分けた割合を示した。結果、神経芽腫では ALT 陽性と *TERT* mRNA 発現ともに年齢、INSS、リスク分類において予後不良群で有意差をもって高値であった ( $P<0.05$ )。ploidy では ALT 陽性では有意差を認めたが、*TERT* mRNA 発現では有意差を認めなかった。*MYCN* ステータスでは ALT 陽性では *MYCN* 非増幅で、*TERT* mRNA 発現では *MYCN* 増幅で有意差をもって高値であった ( $P<0.05$ )。

(B) 神経芽腫検体の TC を高リスク ALT 陽性 (n=30)、高リスク *TERT* mRNA 高発現 (n=55)、高リスク *TERT* mRNA 低発現/ALT 陰性 (n=20)、非高リスク (n=115) の 4 群で比較した。TC は 12 以上を”有意に上昇あり”と定めた。結果、ALT 陽性高リスク群神経芽腫において TC の実測値は他群と比較して優位に高値であった (ALT 陽性 vs *TERT* mRNA 高発現： $P<0.01$ 、ALT 陽性 vs *TERT* mRNA 低発現/ALT 陰性、非高リスク： $P<0.01$ )。

図 3：神経節芽腫における ALT と *TERT* mRNA 発現のリスク因子との相関

(A) 年齢 (灰色：18 か月未満、黒：18 か月以上)、INSS (灰色：stage 1~3、黒：stage 4)、*MYCN* ステータス (灰色：*MYCN* 非増幅、黒：*MYCN* 増幅)、リスク分類 (灰色：低または中リスク、黒：高リスク)、および ploidy (灰色：aneuploidy、黒：diploidy) 毎に分けた割合を示した。結果、神経節芽腫では ALT 陽性と *TERT* mRNA 発現ともに INSS のみで予後不良群で有意差をもって高値であった ( $P<0.05$ )。リスク分類でのみ ALT 陽性で有意差を認めたが、その他のリスク因子では ALT 陽性も *TERT* mRNA 発現でも有意差を認めなかった。

(B) 神経芽腫検体の TC を高リスク ALT 陽性 (n=5)、高リスク *TERT* mRNA 高発現 (n=2)、高リスク *TERT* mRNA 低発現/ALT 陰性 (n=4)、非高リスク (n=25) の 4 群で比較した。結果、高リスク ALT 陽性群において TC の実測値は、検体が少なく高リスク *TERT* mRNA 高発現群とは有意差を認めなかったが、高リスク *TERT* mRNA 低発現/ALT 陰性群、非高リスク群と比較して有意に高値であった。ALT 陽性 vs *TERT* mRNA

高発現：P=0.0952、ALT 陽性 vs *TERT*mRNA 低発現/ALT 陰性、非高リスク群：  
P<0.01)。

#### 図 4：FISH 法による神経芽腫および神経節芽腫の *TERT* 遺伝子構造異常の解析

FISH 法による神経芽腫および神経節芽腫の *TERT* 遺伝子構造異常の解析を施行した。FISH 法でシグナル（緑色：*TERT* 遺伝子領域、赤色：*TERT* 遺伝子上流領域）が細胞の長径 10%以上離れているものを *TERT* 遺伝子再編成ありとした（矢印）。神経芽腫の 1 例で *TERT* 遺伝子領域のシグナルの増幅を認めた。シーケンス解析より 1 例で *TERT* 遺伝子プロモーター領域ヘテロ接合変異を認めた。

#### 図 5：*TERT*mRNA 高発現の神経芽腫と神経節芽腫における CGH および CGH + SNP array 解析

*MYCN* 非増幅かつ *TERT* 遺伝子構造異常を認めない *TERT* 神経芽腫 (n=5) と神経節芽腫 (n=3) に CGH および CGH + SNP array を施行し、染色体異常 (L : loss、G : gain) を図にした。17q の部分増加が 7 例、11q の部分欠失が 6 例、7q の増加が 5 例（全体の増加 4 例、部分増加 1 例）と 11q の部分増加が 5 例に認めた。ゲノム異常を基とした分類では 7 例が *MYCN* 非増幅例で予後不良である P3s と P4s に分類された。

#### 図 6：ALT 陽性の神経芽腫、神経節芽腫における CGH 解析

ALT 陽性の神経芽腫（高リスク群：n=18、非高リスク群：n=6）および神経節芽腫 (n=6) の CGH を施行し、染色体異常 (L : loss、G : gain) を図にした。30 例すべてで 17q の染色体異常を認めた（部分増加：26 例、全体の増加：4 例）。11q の部分欠失が 29 例、7q の増加が 24 例と 11q の部分増加が 13 例に認めた。ゲノム異常を基とした分類では 27 例が予後不良である P3s と P4s に分類された。

#### 図 7：ALT 陽性の神経芽腫および神経節芽腫における 7q の共通微小増加領域

ALT 陽性の神経芽腫(n=18)および神経節芽腫(n=6)の CGH の 7 番染色体の結果を模式図にして示した。16.5 Mb 領域の共通微小増加領域を認めた（点線部）。

## 【引用文献】

1. Joshi VV, Silverman JF. Pathology of neuroblastic tumors. *Seminars in diagnostic pathology*. 1994; 11:107-17.
2. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*. 1999; 86:349-63.
3. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors : a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2001; 92:2451-61.
4. Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, et al. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification. *Cancer*. 2003; 98:2274-81.
5. Campbell K, Gastier-Foster JM, Mann M, et al, Association of MYCN copy number with clinical features, tumor biology, and outcomes in neuroblastoma. *Cancer*. 2017; 123: 4224-4235,
6. Garrett M. Brodeur and Rochelle Bagatell. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014; 11: 704–713.
7. Moschovi M, Arvanitis D, Hadjigeorgi C, et al. Late malignant transformation of dormant ganglioneuroma? *Med Pediatr Oncol*. 1997; 28:377–81.
8. Cohn SL, Pearson AD, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. *J Clin Oncol*. 2009; 27:289–297.
9. Cheung NK, Zhang J, Lu C, et al. Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations in Patients with Neuroblastoma. *JAMA*. 2012; 307:1062–1071.
10. Valentijn LJ, Koster J, Zwijnenburg DA, et al. TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nat. Genet*. 2015; 47:1411–1414.

11. Peifer M, Hertwig F, Roels F, et al. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature* 2015; 526: 700–704
12. Akter J, Kamijo T. How Do Telomere Abnormalities Regulate the Biology of Neuroblastoma? *Biomolecules*. 2021; 11, 1112
13. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, et al. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat. Med.* 1995; 1:249–255
14. Patrick J. Killela, Zachary J. Reitman, Yuchen Jiao, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:6021-6.
15. Ackermann S, Cartolano M, Hero B, et al. A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science*. 2018; 362:1165–1170.
16. Roderwieser A, Sand F, Walter E, et al. Telomerase is a prognostic marker of poor outcome and a therapeutic target in neuroblastoma. *JCO Precision Oncology*. 2019; 3. DOI: 10.1200/PO.19.00072.
17. Koneru B, Lopez G, Farooqi A, et al. Telomere Maintenance Mechanisms Define Clinical Outcome in High-Risk Neuroblastoma. *Cancer Res.* 2020; 80:2663-2675
18. Maitra A, Yashima K, Rathi A, et al. The RNA component of telomerase as a marker of biologic potential and clinical outcome in childhood neuroblastic tumors. *Cancer*. 1999; 85:741-9.
19. Isobe K, Yashiro T, Omura S, et al. Expression of the human telomerase reverse transcriptase in pheochromocytoma and neuroblastoma tissues. *Endocr J.* 2004 ; 51:47-52.
20. Heaphy CM, Subhawong AP, Hong SM, et al. Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *Am J Pathol.* 2014; 179:1608-15.

21. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* 1993; 11:1466-77.
22. Lau LM, Dagg RA, Henson JD, et al. Detection of alternative lengthening of telomeres by telomere quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: e34
23. Farooqi AS, Dagg RA, Choi LM, et al. Alternative lengthening of telomeres in neuroblastoma cell lines is associated with a lack of MYCN genomic amplification and with p53 pathway aberrations. *J Neurooncol.* 2014; 119: 17-26.
24. Tomioka N, Oba S, Ohira M, et al. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene.* 2008; 27: 441-9.
25. Ohira M, Nakagawara A. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. *Cancer Sci.* 2010; 101: 2295-301.
26. Heidenreich B, Nagore E, Rachakonda PS, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. *Nature Communications.* 2014; 5: 34012301.
27. F Yamazaki, A Nakazawa, T Osumi, et al. Two cases of neuroblastoma comprising two distinct clones. *Pediatr Blood Cancer.* 2014; 61: 760-2.
28. George, S.L., Parmar, V., Lorenzi, F. et al. Novel therapeutic strategies targeting telomere maintenance mechanisms in high-risk neuroblastoma. *Cancer Res.* 2020; 39: 78.
29. Sugarman ET, Zhang G, Shay JW. In perspective: An update on telomere targeting in cancer. *Mol Carcinog.* 2019; 58: 1581–8.
30. Koneru BLG, Farooqi A, Nguyen L, et al. Alternate Telomere Lengthening (ALT) neuroblastoma is a highly aggressive subgroup for which ATM kinase provides a novel therapeutic target. *Sci Transl Med.* 2021; 13: eabd5750.

31. Ramlee MK, Wang J, Toh WX, Li S. Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Genes (Basel)*. 2016; 7: 50
32. Napier CE, Huschtscha LI, Harvey A. ATRX represses alternative lengthening of telomeres. *Oncotarget*. 2015; 6: 16543–58.
33. Liu XY, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol*. 2012; 124: 615–625.

## 研究業績

菅原大樹

### I 発表

- ① 一般発表 23
- ② 特別発表 0

### II 論文

- ① 原著論文 0
- ② 症例報告 1
- ③ 総説 0

### III 著書 なし

以上

## I 発表

### ①一般発表

1. 大橋研介, 越永従道, 上原秀一郎, 古屋武史, 金田英秀, 川島弘之, 後藤俊平, 吉澤信輔, 星 玲奈, 石塚悦昭, 菅原大樹, 山岡 敏 : Sutureless enterostomy は本当に有効か?, 第 115 回東京小児外科研究会, 2017 年 6 月, 東京
2. 山岡 敏, 後藤俊平, 菅原大樹, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 腹痛を契機に発見された小児副脾捻転の 1 例, 第 52 回日本小児外科学会関東甲信越地方会, 2017 年 10 月, 茨城
3. 菅原大樹, 山岡 敏, 石塚悦昭, 星 玲奈, 後藤俊平, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 外科的切除を施行した乳児片側性女性化乳房の 1 例, 第 52 回日本小児外科学会関東甲信越地方会, 2017 年 10 月, 茨城
4. 大橋研介, 菅原大樹, 山岡 敏, 石塚悦昭, 星 玲奈, 後藤俊平, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 金田英秀, 上原秀一郎, 越永従道 : 当科における短腸症候群の中期的問題点, 第 33 回日本小児外科学会秋季シンポジウム, 2017 年 10 月, 神奈川
5. 石塚悦昭, 大橋研介, 菅原大樹, 山岡 敏, 星 玲奈, 後藤俊平, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 金田英秀, 上原秀一郎, 越永従道 : 保険外・未承認治療を要する超短腸症候群の 1 例, 第 33 回日本小児外科学会秋季シンポジウム, 2017 年 10 月, 神奈川
6. 星 玲奈, 大橋研介, 菅原大樹, 山岡 敏, 石塚悦昭, 橋本 真, 吉澤信輔, 後藤俊平, 金田英秀, 古屋武史, 上原秀一郎, 越永従道 : 直腸尿道瘻・直腸会陰皮膚瘻を合併した分類不能型直腸肛門奇形の 1 例, 第 74 回直腸肛門奇形研究会, 2017 年 10 月, 神奈川
7. 金田英秀, 山岡 敏, 菅原大樹, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊平, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永従道 : 合併症ゼロを目指した手術(小児) 小児におけるリアルタイム超音波ガイド下中心静脈カテーテル留置法の検討, 第 79 回日本臨床外科学会総会, 2017



年 11 月, 東京

8. 古屋武史, 山岡 敏, 菅原大樹, 石塚悦昭, 星 玲奈, 後藤俊平, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 小児 Common disease の最適治療 当科における膿瘍形成性小児急性虫垂炎の治療戦略, 第 79 回日本臨床外科学会総会, 2017 年 11 月, 東京
9. 川島弘之, 古屋武史, 菅原大樹, 山岡 敏, 星 玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊平, 浅井 陽, 金田英秀, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 単孔式リンパ管温存腹腔鏡下内精索動静脈結紮術を施行した小児精索静脈瘤の 3 例, 第 79 回日本臨床外科学会総会, 2017 年 11 月, 東京
10. 石塚悦昭, 金田英秀, 上原秀一郎, 菅原大樹, 山岡 敏, 星 玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊平, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 越永從道 : WAGR 症候群の経過観察中に発生した片側性 Wilms 腫瘍に対する腎温存手術を施行した 1 例, 第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017 年 11 月, 愛媛
11. 山岡 敏, 金田英秀, 菅原大樹, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 小児副脾捻転の 1 例, 第 548 回日本大学医学会例会, 2018 年 1 月, 東京
11. 吉澤信輔, 金田英秀, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 腎悪性腫瘍との鑑別に難渋した後腹膜奇形腫の 1 例, 第 548 回日本大学医学会例会, 2018 年 1 月, 東京
12. 川島弘之, 古屋武史, 菅原大樹, 山岡 敏, 星 玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊平, 浅井 陽, 金田英秀, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 小児精索静脈瘤に対する単孔式リンパ管温存腹腔鏡下内精索動静脈結紮術の有用性, 第 548 回日本大学医学会例会, 2018 年 1 月, 東京
13. 古屋武史, 山岡 敏, 菅原大樹, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 小児虫垂炎における SSI への対策, 第 548 回日本大学医学会例会, 2018 年 1 月, 東京

14. 山岡 敏, 金田英秀, 菅原大樹, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 術前診断に難渋した小児副脾捻転の 1 例, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟
15. 菅原大樹, 上原秀一郎, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 越永從道 : 合併奇形をともしなわなない十二指腸閉鎖症に胆道閉鎖症を合併した 1 例, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟
16. 川島弘之, 上原秀一郎, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星玲奈, 吉澤信輔, 後藤俊平, 金田英秀, 古屋武史, 大橋研介, 今津博雄, 越永從道 : 胆管炎を繰り返す胆道閉鎖症I-cyst 型長期生存例に内視鏡治療が有用であった 1 例, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟
17. 金田英秀, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 小児卵巣腫瘍 60 例の検討, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟
18. 大橋研介, 越永從道, 上原秀一郎, 古屋武史, 金田英秀, 川島弘之, 吉澤信輔, 石塚悦昭, 星 玲奈, 松川加奈子, 菅原大樹, 山岡 敏 : 超低出生体重児の腹部単純 X 線 gasless 像は腸管の未熟性を示す, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟
19. 吉澤信輔, 大橋研介, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星玲奈, 川島弘之, 金田英秀, 古屋武史, 上原秀一郎, 越永從道 : 腸管逆回転症に脾臓低形成を伴った 1 例, 第 55 回日本小児外科学会学術集会, 2018 年 5 月, 新潟
20. 古屋武史, 金田英秀, 菅原大樹, 山岡 敏, 門脇加奈子, 石塚悦昭, 星玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 大橋研介, 上原秀一郎, 越永從道 : 当科で経験した小児精巣腫瘍 10 例の臨床的検討, 第 27 回日本小児泌尿器科学会学術集会, 2018 年 6 月, 石川

21. 大橋研介, 越永従道, 上原秀一郎, 古屋武史, 金田英秀, 川島弘之, 吉澤信輔, 星 玲奈, 石塚悦昭, 松川加奈子, 菅原大樹, 山岡 敏 : 超低出生体重児の腹部単純 X 線 gasless 像は腸管の未熟性を示す, 第 54 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 2018 年 7 月, 東京
22. 石塚悦昭, 大橋研介, 山岡 敏, 菅原大樹, 門脇加奈子, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 金田英秀, 上原秀一郎, 越永従道 : 中腸軸捻転を伴わない新生児腸回転異常症の検討, 第 54 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 2018 年 7 月, 東京
23. Motoki Sugawara, Masayuki Haruta, Atsuko Nakazawa, Hajime Okita, Tetsuya Takimoto, Tatsuro Tajiri, Shuichiro Uehara, Tsugumichi Koshinaga, Miki Ohira, Takehiko Kamijo : Q-PCR C-circle assay may be useful to identify NB patients with poorer prognosis in each high and low/intermediate risk. 第 62 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2020 年 11 月, オンライン開催

②特別発表

なし

II 論文

① 原著論文

なし

② 症例報告

菅原大樹, 上原秀一郎, 山岡 敏, 星 玲奈, 吉澤信輔, 川島弘之, 金田英秀, 大橋研介, 越永従道, 先天性十二指腸閉鎖症術後に胆道閉鎖症を発症した一例. 日本小児外科学会雑誌; 57-1: 1-5: 2021.

③ 総説

なし

III 著書 なし