

厚生労働科学研究費補助金  
子ども家庭総合戦略研究事業

難治性神経芽腫の克服に向けた  
トランスレーショナルリサーチの基礎づくりと  
臨床研究ネットワークの構築

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中川原 章

千葉県がんセンター研究所

平成17(2005)年 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 難治性神経芽腫の克服に向けたトランスレーショナルリサーチの基礎づくりと  
臨床研究ネットワークの構築 ..... 1  
中川原 章

### II. 分担研究報告

1. 神経芽腫研究基盤の確立・組織バンクの充実・DNAチップの検索に関する研究  
..... 5  
中川原 章
2. 分子病理組織診断・データベースの構築に関する研究  
..... 9  
秦 順一

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 13

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 17

# 總 括 研 究 報 告

平成16年度厚生労働科学研究費補助金事業  
総括研究報告書

難治性神経芽腫の克服に向けたトランスレーショナルリサーチの基盤作りと  
臨床研究ネットワークの構築

総括研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所長

研究要旨

難治性神経芽腫の克服へ向けて、医療の均点化と質の高い臨床研究を推進するために、トランスレーショナルリサーチの基盤作りと臨床研究ネットワークの構築を目指した。本年度は、前年度に引き続き、神経芽腫組織バンクの強化を行い、総計1900例を越す検体リソースを整備できた。また、神経芽腫の病理国際分類を普及し、中央病理診断体制の基盤整備を進めた。一方、新しいトランスレーショナルリサーチの展開として、独自に開発した神経芽腫予後予測用実用化DNAチップの臨床試験研究を28例に試行し、海外に先んじた遺伝子診断法を確立した。さらに、我々が創設した「神経芽腫研究会」の第5回、第6回を開催し、臨床研究ネットワークの構築を推進した。これらの活動により、我が国の統一神経芽腫グループスタディの重要な基盤となるバイオロジー部門の確立に貢献することができた。

分担研究者

中川原 章：千葉県がんセンター研究所長

「難治性神経芽腫克服へ向けたトランスレーショナルリサーチ確立のための基盤研究」

秦 順一：国立成育医療センター所長

「難治性神経芽腫に対する多施設臨床研究の基盤に関する研究—特に中央病理診断システムの構築について—」

A. 研究目的

近年、小児がんの治療成績は著しく向上したにもかかわらず、小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度の高い神経芽腫は、その約60%以上が進行例であり、高頻度に遺伝子異常が認められ、現在もなお治療に抵抗して患児を死に至らしめている。なかでも症例の大半を占める進行神経芽腫の長期生存率は小児がんの中でも最も低く、未だ30%に満たないの

が実状である。1984年より我が国においては世界に先駆けて生後6ヶ月の乳児を対象にマススクリーニングが開始されたが、進行神経芽腫の発生頻度は減少せず、平成15年度をもって休止されるに至った。したがって、今改めて、進行した難治性神経芽腫に対する抜本的な対策が緊急に必要とされている。そこで、これらを解決するために、1) 正確な診断と新たな予後予測法を開発するための中央病理診断および中央組織バンクの確立、2) 基礎と臨床を結ぶ全国横断的トランスレーショナルリサーチの推進、3) 基礎研究者間の連携強化と臨床グループスタディとの緊密な連携の構築、を目的として、本研究事業を計画した。

B. 研究方法

1) 千葉県がんセンター研究所における神経芽腫検体センターの設置

全国の小児医療施設から送られてくるインフォームドコンセントが得られ、匿名化された臨床検体を集め、MYCNがん遺伝子の増幅、TrkA 遺伝子発現、DNA 核型、血漿 Midkine 値の定量を行った。また、残存資料の保存を行った。

## 2) 国立成育医療センター研究所における神経芽腫中央病理診断システムの設置

検体センター同様、神経芽腫の中央病理診断システムを確立し、正確な診断に基づく治療法選択の体制を整備した。

## 3) 神経芽腫実用化 in-house DNA チップの臨床試験研究

神経芽腫関連遺伝子 5,300 cDNA を搭載した cDNA マイクロアレイによる解析から開発した実用化予後予測用 DNA チップを用いた臨床試験研究を行った。

(倫理面への配慮)

各施設から送られてくる検体に関しては、匿名化されインフォームドコンセントが取得されたものを用いた。この運用についても千葉県がんセンター倫理審査委員会の承認を得て行われた。

## C. 研究結果

### 1) 神経芽腫組織バンクの確立

主任研究者の中川原 章は、本研究計画の中で、我が国の神経芽腫組織バンクの確立と分子生物学的方法による新しい診断法の開発を担当した。その結果、千葉県がんセンター研究所の「神経芽腫組織バンク」に保存された検体数は1900例に達し、倫理的な問題もクリアした世界最大級の組織バンクの完成させた。

### 2) 神経芽腫中央病理診断システムの確立

分担研究者の秦 順一は、神経芽腫の組織分類を国際的に統一するため1994年に組織された International Neuroblastoma Pathology Committee (INPC)の一員として、神経芽腫国際分類の作成に携わった。本研究計画の中では、この分類法を臨床スタディに連結させるために、国立成育医療センター研究所内にセントラルレビューシステムを確立した。これは、近く設立される全国統一神経

芽腫グループスタディの要のひとつとなる予定である。

### 3) 「神経芽腫予後予測用実用化ミニDNAチップ」の臨床試験研究

独自のcDNAマイクロアレイシステムを確立し、それを用いた開発研究から、200個の選ばれた遺伝子のみを搭載した「神経芽腫予後予測用実用化ミニDNAチップ」の開発に成功し、すでに前向きに試験的研究を展開し、28例の新規症例に対して応用した。

### 4) 神経芽腫(基礎)研究会の設立と運営

主任および分担研究者は、我が国に初めて「神経芽腫(基礎)研究会」を設立し、平成14年8月の第1回研究会以来6回にわたって会を成長させ(年間2回開催)、我が国の神経芽腫トランスレーショナルリサーチの基盤形成に貢献するとともに、全国統一神経芽腫グループスタディの設立および基盤固めに重要な役割を果たした。

## D. 考察

我が国におけるがん医療の均点化が図られるなか、小児がん医療の均点化も緊急かつ重要な課題となってきた。なかでも、発症数が多く、かつ、現在でも難治性である進行神経芽腫の統一グループスタディの確立とその基盤整備は最重要課題でもある。我々の班は、この整備を加速し、国際的にも高い水準の神経芽腫医療を我が国に確立するために、組織バンクの充実、病理組織国際分類の確立と普及、中央病理診断システムの整備と確立、中央遺伝子診断システムの再編成、神経芽腫研究会によるトランスレーショナルリサーチのレベル向上、を目指してきた。平成16年度は、これらの課題を順調に展開でき、さらに、全国統一神経芽腫グループスタディのバイオリジー部門の基盤整備をより充実させることができた。一方、独自に開発した神経芽腫予後予測用実用化ミニDNAチップがスタディとして組み込まれる可能性も現実的となった。今後は、我が国のオリジナリティを出しつつ、

後予測用実用化ミニ DNA チップがスタディとして組み込まれる可能性も現実的となった。今後は、我が国のオリジナリティを出しつつ、欧米各国との連携を進め、スタディ基盤をさらに強化する必要がある。

#### E. 結論

我々が当初設定した予定項目に関しては、ほぼ計画どおりに目標を達成できている。なかでも、「神経芽腫予測用実用化ミニ DNA チップ」の開発研究は実用化の段階まで来ることができ、現在結成が予定されている全国統一神経芽腫グループスタディの展開の中で重要な位置を占める予定である。また、本研究の成果は、我が国における神経芽腫臨床研究を国際的なレベルあるいはそれ以上のものにするために必須のものであり、その社会的意義は極めて大きい。本研究は、その立ち上げ作業が進められている全国統一神経芽腫グループスタディの実質的な基盤となるものである。本研究の成果により、我が国における神経芽腫トランスレショナルリサーチの基盤が確立され、難治性神経芽腫の克服へ向け、世界をリードできる体制を確実にできるものと期待される。

#### F. 健康危険情報

本研究により人の健康に危険となるようなことは考えられない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. In *NGF and Related Molecules in Health and Disease*, Ed. By Luigi Aloe and Laura Calza, Progress in Brain Research Vol. 146, 2004, Elsevier Science Publisher, pp233-242.
2. Nakagawara A., Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In

Special Issue: Neural development and cancer. *Cancer Lett.* 204:23-224, 2004.

3. Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 11327-11335, 2004.
4. Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of *Nbla10449/hNLRR-1* and *Nbla10677/hNLRR-3* with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int. J. Oncol.* 24:1457-1466, 2004
5. Ohtori S, Isogai E, Hasue F, Ozaki T, Nakamura Y, Nakagawara A., Koseki H, Yuasa S, Hanaoka E, Shinbo J, Yamamoto T, Chiba H, Yamazaki M, Moriya H, Sakiyama S. Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene *abbrative* in neuroblastoma. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:504-514, 2004.
6. Wang YQ, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Takenaga K, Shishikura T, Nakagawara A., Sakiyama S, Tagawa M and O-Wang J. Elevated expression of DNA polymerase  $\kappa$  in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.* 25:161-165, 2004.
7. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:25549-25561, 2004.
8. Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A., Ohnuma N, Yokoyama T. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 91:972-979, 2004.
9. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma

- N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the *Pik1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 23:5901-5911, 2004.
10. Takahashi M, Ozaki T, Todo S, Nakagawara A. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene ING1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncol Rep.* 12:811-816, 2004.
  11. Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int. J. Cancer* 112:365-375, 2004.
  12. Nakagawara A. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. S. Cohn & N-K. Cheung, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg, pp41-53.
  13. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
  14. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A., Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
  15. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* (in press)
  16. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A., Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* 24:3385-3396, 2005
  17. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* (in press)
  18. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* 7:337-350, 2005
  19. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit b (PKA-Cb) as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* 280:16665-16675, 2005
  20. Shibata, R, Matsufuji, H, Morimoto, T, Araki, A, Hata, J.: Extraovarian primary peritoneal carcinoma in a child. *Pediatr Blood Cancer* 42:292-293, 2004
  21. Du, W, Hattori, Y, Hashiguchi, A, Kondoh, K, Hozumi, N, Ikeda, Y, Sakamoto, M, Hata, J., Yamada, T: Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment. *Pathol Int* 54:285-294, 2004.
  22. Miyauchi J, Kiyotani C, Shioda Y, Kumagai M, Honna T, Matsuoka K, Masaki H, Aiba M, Hata, J., Tsunematsu Y: Unusual chromaffin cell differentiation of a neuroblastoma after chemotherapy and radiotherapy: Report of an autopsy case with immunohistochemical evaluations. *Am J Surg. Pathol* 28:548-553, 2004
  23. Hino, S, Yamaoka, T, Yamashita, Y, Yamada, T, Hata, J., Itakura, M: In vivo proliferation pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependentkinase 4. *Diabetologia* 47: 1819-1830, 2004.
  24. 大喜多 肇、秦 順一：4. 小児腫瘍、病理と臨床臨時増刊号 22:123-129, 2004
  25. 秦 順一：神経芽腫新国際分類 INPC について、小児がん 41:11-14,2004
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

# 分 担 研 究 報 告

平成16年度厚生労働科学研究費補助金事業  
「難治性神経芽腫の克服に向けたトランスレーショナルリサーチの基盤作りと  
臨床研究ネットワークの構築」  
分担研究報告書

難治性神経芽腫克服へ向けたトランスレーショナルリサーチ確立のための  
基盤研究

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所長

研究要旨

(1) 我が国における神経芽腫組織バンクの確立を目的とし、現在組織編成が行われている日本神経芽腫スタディグループと密接に連携した体制の構築を試みた。また、登録された105例の検体に関し、従来の分子生物学的検査を継続的に行った。(2) 独自に開発した神経芽腫予後予測用実用化 DNA チップの臨床試験研究を25例に対して行った。従来の予後因子以上に有効であること、しかも、これまで予後の予測が困難であったいわゆる中間型神経芽腫の予後予測に有用であることが示された。(3) 我々が創設した「神経芽腫研究会」の第5回、第6回を開催し、我が国における分野を超えた神経芽腫の臨床研究ネットワークの構築がより展開された。

A. 研究目的

神経芽腫は小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度が高いにもかかわらず、進行した難治性神経芽腫の長期生存率は未だ30%にとどまっており、わが国でも緊急な対策を必要としている。一方、わが国の国家プロジェクトとして行われてきた乳児マススクリーニングは、大部分は自然退縮する神経芽腫を発見したに留まり、平成15年秋に休止された。そこで、我々は、我が国における新たなトランスレーショナルリサーチの基盤を確立することを目的とし、平成16年度は、神経芽腫組織バンクおよび分子生物学的診断法の確立を目指し、さらに、「神経芽腫研究会」による臨床研究ネットワークの構築を進めた。

B. 研究方法

1. 神経芽腫組織バンクの確立と充実：千葉県がんセンター研究局に送られてきた検体に

対しては、DNA, RNA を抽出し、MYCN 増幅を Southern blot 法、TrkA 発現を Northern blot 法、DNA ploidy を FACScan にて測定した。また、神経芽腫の新たな腫瘍マーカーである血中 Midkine レベルおよび HGF レベルの測定を行った

2. 実用化神経芽腫用 DNA ミニチップ：千葉県がんセンター研究局において神経芽腫各サブセットから抽出した約 5,300 遺伝子を cDNA マイクロアレイ化したものを用いて開発した予後予測用実用化ミニチップを、臨床試験研究として展開した。

(倫理面への配慮)

各施設から送られてくる検体に関しては、匿名化されインフォームドコンセントが取得されたものを用いた。この運用についても千葉県がんセンター倫理審査委員会の承認を得て行われた。

### C. 研究結果

(1) 神経芽腫組織バンクの拡大・充実：この1年間で105例の検体登録がなされた。マススクリーニング症例の検体がほぼ皆無となり、進行神経芽腫が大部分を占めた。検体受領後の通常検査としては、MYCN がん遺伝子のコピー数、DNA ploidy、TrkA 発現、血中 Midkine レベル、血中 HGF (hepatocyte growth factor) レベルの測定を行った。

(2) 全国規模の難治性神経芽腫研究のための遺伝子研究支援体制の確立：神経芽腫組織バンクに保存された組織または遺伝子資源に関し、倫理審査委員会の承認を経た後に、国内において神経芽腫研究を展開している施設または研究室（国立がんセンター研究所など）へ提供することを積極的に行った。

(3) 難治性神経芽腫克服のための新しい予後予測用 DNA ミニチップの開発とその臨床応用：In-house cDNA microarray を用いて我々が開発した神経芽腫予後予測用 DNA ミニチップ（選ばれた200遺伝子を搭載）を臨床試験研究として展開した。これまでに25例のテストを行い、満足のいく結果が得られた。

(4) 「神経芽腫研究会」の拡大と充実：平成16年度は、第5回および第6回の神経芽腫研究会を東京において開催した。セミクロードの会であるが、分野を超えて神経芽腫に関連した基礎研究をしている研究者が多数参加し、臨床研究ネットワークの構築に重要な役割を果たした。

### D. 考察

過去約25年間行われてきた乳児神経芽腫マススクリーニングが休止され、我が国における神経芽腫の臨床および基礎的研究の流れが大きく変化してきた。平成16年度に送ら

れてきた腫瘍検体もほとんどが散発性のものであり、進行症例が大多数を占めた。我が国にとって最大の課題は神経芽腫グループスタディが統一できず、その基盤研究支援体制が脆弱であることにある。その中で、我々が開発した神経芽腫予後予測用 DNA ミニチップは世界に先駆けて成功したものであり、その有用性が今回の臨床試験により裏付けられたことは大きな収穫であった。今後、さらに「神経芽腫基礎研究会」の内容充実を計り、国内で開発された DNA チップによる予後診断体制等を強化して、国際的な競争に勝てる枠組みを作り、難治性である進行神経芽腫の克服へ向けて全国的な取り組みを今後益々進める必要がある。

### E. 結論

乳児神経芽腫マススクリーニングが休止され、我が国における神経芽腫はいわゆるグローバルスタンダードに戻った状態となった。治癒率の向上した小児がんの中において未だに難治性である神経芽腫をいかにして克服するか、国際的な連携の中で早急に我が国独自の体制を確立する必要がある。その意味において、我々の取り組みが、我が国における神経芽腫のトランスレーショナルリサーチの基盤作りと臨床研究ネットワークの構築に貢献できることを期待したい。

### F. 健康危険情報

本研究により人の健康に危険となるようなことは考えられない。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. In *NGF and Related Molecules in Health and Disease*, Ed. By Luigi Aloe and Laura Calza, Progress in Brain Research Vol. 146, 2004, Elsevier Science Publisher, pp233-242.

2. Nakagawara A, Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue: Neural development and cancer. *Cancer Lett.* 204:23-224, 2004.
  3. Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDLI, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 11327-11335, 2004.
  4. Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLR) family genes and inverse association of expression of *Nbla10449/hNLR-1* and *Nbla10677/hNLR-3* with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int. J. Oncol.* 24:1457-1466, 2004
  5. Ohtori S, Isogai E, Hasue F, Ozaki T, Nakamura Y, Nakagawara A, Koseki H, Yuasa S, Hanaoka E, Shinbo J, Yamamoto T, Chiba H, Yamazaki M, Moriya H, Sakiyama S. Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene abrrative in neuroblastoma. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:504-514, 2004.
  6. Wang YQ, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Takenaga K, Shishikura T, Nakagawara A, Sakiyama S, Tagawa M and O-Wang J. Elevated expression of DNA polymerase k in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.* 25:161-165, 2004.
  7. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:25549-25561. 2004.
  8. Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A, Ohnuma N, Yokoyama T. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 91:972-979, 2004.
  9. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the *Plk1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 23:5901-5911, 2004.
  10. Takahashi M, Ozaki T, Todo S, Nakagawara A. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene ING1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncol Rep.* 12:811-816, 2004.
  11. Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int. J. Cancer* 112:365-375, 2004.
  12. Nakagawara A. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. S. Cohn & N-K. Cheung, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg. (in press)
  13. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
  14. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
  15. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* (in press)
  16. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A, Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* (in press)
  17. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* (in press)
  18. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* (in press)
  19. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit b (PKA-Cb) as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* (in press)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。



平成16年度厚生労働科学研究（難治性疾患克服研究事業）  
「難治性神経芽腫の克服に向けたトランスレーショナルリサーチの基盤作りと  
臨床研究ネットワークの構築」  
分担研究報告書

難治性神経芽腫に対する多施設臨床研究の基盤に関する研究  
—特に中央病理診断システムの構築について—

分担研究者：秦 順一、 国立成育医療センター研究所長

研究要旨

難治性神経芽腫の多施設臨床研究の基盤となる中央病理診断システムの現状と問題点を分析し、そのあり方について検討した。さらに、神経芽腫の臨床研究に用いる新国際分類 INPC について概説した。

1, 研究目的および背景

難治性神経芽腫のような予後の悪い難治性小児がんの治療成績向上には、十分に計画された治療プロトコルを多施設共同で施行し、その治療成績の向上を図ることが求められる。このような臨床研究を広範に行うためには、いくつかの基盤整備が必須であり急務を要する。その一つに正確な腫瘍の病理診断がある。一般に腫瘍は病理学的診断に従って治療の方法が決定される。小児がんのような比較的稀な腫瘍では一般病理医が診断する機会が少ないため、診断の誤りが生じやすい。そこで、臨床研究の中で最も重要な基盤の一つとして病理診断の標準化のための中央病理診断システムの構築について検討した。

2, 方法

- ① 神経芽腫の中央病理診断システムの構築
- ② 神経芽腫病理診断と病態の指標となる

分子病態との関連

- ③ 新たな診断・治療法の開発のための検体リソースセンターの確立

3, 結果および考察

- ① 神経芽腫の中央病理診断システムの構築

神経芽腫の分類は多くのものが提唱されている。どのその中央病理診断に用いられる病理組織分類を決定する場合以下の点を考慮する必要がある。i) 国際的な共同研究への参加をも視野に入れ、WHO 分類またはそれに準じた国際的に通用する分類を用いること。ii) 用いやすい組織分類であること (User friendly)、iii) 診断の再現性のあること (Reproducible)、iv) 分類が病態 (予後) および腫瘍の生物学的特性と相関していること、の要件を満たした分類を用いる必要であるという認識に達した。

以上の結果を踏まえて、神経芽腫の中央病理診断に用いる組織分類法を検討した結果、

International Neuroblastoma Pathology Committee が策定した新国際分類 INPC が適当であるという結論に達した。なお、本分類は組織学的分類と本腫瘍の予後が発生年齢と密接に関連するという事実を総合して予後を推定することを最終目的としている。

i) INPC 組織分類は以下の如くである。

1) Neuroblastoma(NB)/subgroup

- a) undifferentiated
- b) poorly differentiated
- c) differentiating

2) Ganglioneuroblastoma(GNB), intermixed

3) Ganglioneuroma(GN)/subgroup

- a) maturing
- b) mature

4) Ganglioneuroblastoma(GNB), nodular

ii) 発生年齢と組織分類から判断 (推定) される神経芽腫の予後 (Prognostic risk grouping)

1) Neuroblastoma について

i) high MKI を示す腫瘍は、腫瘍細胞の分化度、年齢に拘わらず常に予後不良グループである。

ii) Undifferentiated NB は年齢に関連なく予後不良グループである

iii) 1.5 歳以上の NB、poorly differentiated は予後不良グループである。

iv) 1.5 歳以上で発生した中等度 MKI を示す神経芽腫は予後不良グループである

v) 上記以外の腫瘍は予後良好群である

2) GNB・nodular について

発生年齢と結節を形成する神経芽腫成分の分化度および MKI の程度によって予後が決定される。すなわち神経芽腫成分が上記 (1) から (4) までに相当する際は予後不良であるが、それ以外は予後良好群である。

3) GNB・intermixed type, GN は年齢にかかわらず予後良好である。

② 神経芽腫病理診断と病態の指標となる分子病態との関連

神経芽腫では病理組織像とともに病態の指標となる分子レベルの解析結果を総合して治療方針を決定すべきものである。病理組織診断と分子病態診断を相互に関連させるシステムを、トランスレーショナルリサーチ (TR) のための検体バンクの設立とともに主任研究者である中川原 章と検討を継続しており、17年度に具体的に実践する。

③ 日本神経芽腫多施設臨床研究 (JNBSG) の立ち上げ

わが国の神経芽腫の治療および研究の個々の水準は決して低いものではないが、システム化の遅れによって国際的に必ずしも公認され、尊重されるものでなかったことの反省の上に立って、本年度より日本全国を対象として多施設臨床研究実施の準備が進みつつある。②で述べた中央病理診断、分子病態診断および検体バンクの設立は JNBSG の活動の中で進めるべく各方面と調整に入った。

4、健康危険情報

本研究により人の健康に危険となるような

ことは考えられない。

#### 5、論文発表

- 1, Shibata, R, Matsufuji, H, Morimoto, T, Araki, A, Hata, J.: Extraovarian primary peritoneal carcinoma in a child. *Pediatr Blood Cancer* 42:292-293, 2004
- 2, Du, W, Hattori, Y, Hashiguchi, A, Kondoh, K, Hozumi, N, Ikeda, Y, Sakamoto, M, Hata, J. Yamada, T: Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment. *Pathol Int* 54:285-294, 2004.
- 4, Miyauchi, J., Kiyotani C, Shioda Y, Kumagai M, Honna T, Matsuoka K, Masaki H, Aiba M, Hata, J. Tsunematsu Y: Unusual chromaffin cell differentiation of a neuroblastoma after chemotherapy and radiotherapy: Report of an autopsy case with immunohistochemical evaluations. *Am J Surg. Pathol* 28:548-553, 2004
- 5, Hino, S, Yamaoka, T, Yamashita, Y, Yamada, T, Hata, J. Itakura, M: In vivo proliferation pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependentkinase 4. *Diabetologia* 47: 1819-1830, 2004.
- 6, 大喜多 肇、秦 順一：4. 小児腫瘍、病理と臨床臨時増刊号 22:123-129, 2004
- 7, 秦 順一：神経芽腫新国際分類 INPC について、小児がん 41:11-14,2004

6. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。



## 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomioka N, Kobayashi H, Kageyama H, Ohira M, Nakamura Y, Sasaki F, Todo S, Nakagawara A, Kaneko Y.	Chromosomes that show partial loss or gain in near-diploid tumors coincide with chromosomes that show whole loss or gain in near-triploid tumors: Evidence suggesting the involvement of the same genes in the tumorigenesis of high- and low-risk neuroblastomas.	Genes Chromosomes Cancer	36	139-150	2003
Tomizawa M, Watanabe K, Saisho H, Nakagawara A, Tagawa M.	Down-regulated expression of the CCAAT/enhancer binding protein a and b genes in human hepatocellular carcinoma: a possible prognostic marker.	Anticancer Res.	23	351-354	2003
Kawamoto T, Ohira M, Hamano S, Hori T, Nakagawara A.	High expression of the novel endothelin-converting enzyme genes, <i>Nbla03145/ECEL1<math>\alpha</math></i> and $\beta$ , is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas.	Int. J. Oncol.	22	815-822	2003
Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, Nakagawara A, Sugimoto T, Inazawa J.	PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma.	Cancer Res.	63	1876-1883	2003
Sakiyama S, Yu L, Tomizawa M, Shimada H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Ikematsu S, Nakagawara A, Tagawa M.	Utilization of the promoter region of the midkine gene as a tool to drive therapeutic genes in a tumor specific manner.	Advan. Enzyme Regul.	43	57-66	2003
Caminci P, Waki K, Shiraki T, Konno H, Shibata K, Itoh M, Aizawa K, Arakawa T, Ishii Y, Sasaki D, Bono H, Kondo S, Sugahara Y, Saito R, Osato N, Fukuda S, Sato K, Watahiki A, Hirozane-Kishikawa T, Nakamura M, Shibata Y, Yasunishi A, Kikuchi N, Yoshiki A, Kusakabe M, Gustincich S, Beisel K, Pavan W, Aidinis V, Nakagawara A, Held W. A., Iwata H, Kono T, Nakauchi H, Lyons P, Wells C, Hume D. A., Fagiolini M, Hensch T. K., Brinkmeier M, Camper S, Muramatsu M, Okazaki Y, Kawai J, Hayashizaki Y.	Targeting a complex transcriptome: The construction of the mouse full-length cDNA encyclopedia.	Genome Res.	13	1273-1289	2003

Ozaki T, Watanabe K, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, <u>Nakagawara A.</u>	Function of p73, not of p53, is inhibited by the physical interaction with RACK1 and its inhibitory effect is counteracted by pRB.	Oncogene	22	3231-3242	2003
Okamoto Y, Ozaki T, Miyazaki K, Aoyama M, Miyazaki M, <u>Nakagawara A.</u>	UbchH10 is the cancer-related E2 ubiquitin conjugating enzyme.	Cancer Lett	197	63-68	2003
Ikematsu S, <u>Nakagawara A.</u> , Nakamura Y, Sakuma S, Wakai K, Muramatsu T, Kadomatsu K.	Correlation of elevated level of serum midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas.	Br. J. Cancer	88	1522-1526	2003
Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe K, Hayashi S, Hosoda M, Todo S, <u>Nakagawara A.</u>	Negative autoregulation of p73 and p53 by $\Delta$ Np73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells.	Cancer Lett.	197	105-109	2003
Ohira M, Morohashi A, Nakamura Y, Isogai E, Furuya K, Hamano S, Machida T, Aoyama M, Fukumura M, Miyazaki K, Suzuki Y, Sugano S, Hirato J, <u>Nakagawara A.</u>	Neuroblastoma Oligo-capping cDNA Project : Toward the Understanding of the Genesis and Biology of Neuroblastoma.	Cancer Lett.	197	63-68	2003
Ohira M, Morohashi A, Inuzuka H, Shishikura T, Kawamoto T, Kageyama H, Nakamura Y, Isogai E, Takayasu H, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Goto T, Sato S, <u>Nakagawara A.</u>	Expression profiling and characterization of 4,200 genes cloned from primary neuroblastomas: Identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets.	Oncogene	22	5525-5536	2003
Miyazaki K, Ozaki T, Kato C, Hanamoto T, Fujita T, Irino S, Watanabe K, Nakagawa T, <u>Nakagawara A.</u>	A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	308	106-113	2003
Nakamura Y, Ozaki T, Koseki H, <u>Nakagawara A.</u> , Sakiyama S.	Accumulation of p27 <sup>KIP1</sup> is associated with BMP2-mediated growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	307	206-213	2003
<u>Nakagawara A.</u>	Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. In NGF and Related Molecules in Health and Disease, Ed. By Luigi Aloe and Laura Calza,	Progress in Brain Research	146	233-242	2004
Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, <u>Nakagawara A.</u>	NEDL1, a Novel Ubiquitin-protein Isopeptide Ligase for Dishevelled-1, Targets Mutant Superoxide Dismutase-1.	J. Biol. Chem.	279	11327-11335	2004
<u>Nakagawara A.</u> , Ohira M.	Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue: Neural development and cancer.	Cancer Lett.		in press	2004

Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, <u>Nakagawara A.</u>	Identification of Novel Human Neuronal Leucine-Rich Repeat (hNLRR) Family Genes and Inverse Association of Expression of <i>Nbla10449/hNLRR-1</i> and <i>Nbla10677/hNLRR-3</i> with the Prognosis of Primary Neuroblastomas.	Int. J. Oncol.		in press	2004
Wang YQ, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Takenaga K, Shishikura T, <u>Nakagawara A</u> , Sakiyama S, Tagawa M and O-Wang J.	Elevated expression of DNA polymerase $\kappa$ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53	Int. J. Oncol.		in press	2004
Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, <u>Nakagawara A.</u>	Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the <i>Plk1</i> oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas.	Oncogene		in press	2004
Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, <u>Nakagawara A.</u>	Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation.	J. Biol. Chem.		in press	2004
Fukuma M, <u>Hata J.</u> and Umezawa A.	Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in ewing sarcoma.	Oncogene	22	1-9	2003
Fukuma M, Abe H, Okita H, Yamada T, <u>Hata J.</u>	Monoclonal antibody, 4C4-mAb, specifically recognizes keratan sulfate proteoglycan on human embryonal carcinoma cells.	J Pathol	201	90-98	2003
Fukuzawa R, Eccles MR, Ikeda M, <u>Hata J.</u>	Embryonal hyperplasia of Bowman's capsular epithelium in patients with <i>WT1</i> mutations.	Pediatr Nephrol	18	9-13	2003
Shibata R, Umezawa A, Takehara K, Aoki D, Nozawa S, <u>Hata J.</u>	Primary carcinosarcoma of the vagina.	Pathol Int	53	106-110	2003
Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, <u>Hata J.</u>	Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and Wilms' tumor suppressor gene mutation in bilateral Wilms' tumor.	Pathol Int	53	214-220	2003
Shibata R, Okita H, Shimoda M, Asakura H, Murai M, Sakamoto M, <u>Hata J.</u>	Primary carcinoid tumor in a polycystic kidney.	Pathol Int	53	317-322	2003
Fukuzawa R, <u>Hata J</u> , Hayashi Y, Ikeda H, Reeve AE	Beckwith-Wiedemann syndrome-associated hepatoblastoma: wnt signal activation occurs later in tumorigenesis in patients with 11p15.5 uniparental disomy.	Pediatr Develop Pathol	6	299-306	2003
Peuchmaur M, d'Amore ESG, Joshi VV, <u>Hata J</u> , Roald B, Dehner LP, Gerbing RB, Stram RB, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H.	Revision of the international neuroblastoma pathology classification based on confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets of ganglioneuroblastoma, nodular by applying the age-linked morphologic criteria to its neuroblastic components.	Cancer	98	2274-2281	2003