

神経芽腫に対してマイクロアレイを用いて予後に関連した遺伝子の解析を行った報告は、これまでも複数ある。2002年には、shohetらがMYCN増幅例と非増幅例の遺伝子発現の比較を行い、MYCN増幅群で優位であったMCM7に着目している⁹⁾。また、複数検体を用いたclustering analysisも行われている^{10,11)}。今回われわれは、既存の予後因子により予後良好群と予後不良群を設定し、遺伝子発現の比較を行った。その結果、予後不良群に優位でもっとも差が大きかった遺伝子はやはり、MYCN遺伝子であり、予後良好群の約18倍の発現があった。この結果から、今回のマイクロアレイによる実験系の有用性が示唆されると考えられる。そのほか、細胞周期関連の遺伝子や、IGF-2、Heat shock protein等、予想されていた遺伝子群の発現が認められた。予後良好群に優位であった遺伝子数は、予後不良群に優位であったものに比較し、約10分の1であり、発現差も最高で4倍程度であった。今回用いたAgilent社のHuman 1というキットには、既知の予後良好因子であるtrk A、およびそのfamilyであるtrk B、trk Cは掲載されていなかった。

予後良好群に優位であった遺伝子の中から、今回我々は、神経芽腫における新規予後関連遺伝子の候補として、神経系の発生に関与していることが示唆されているNeuronatin遺伝子に着目して解析を進めた。Neuronatin遺伝子は、1994年にJoseph Rらにより、同定されており、マウスでの実験で、胎生期の脳神経系に発現が認められることが知られている^{12,13)}。マウスの胎生8.5日ごろに後脳から発現が認められ、中枢神経系、末梢神経系へと発現の部位がり、出生時をピークとして成長とともに発現が消失していくとされる。交感神経系、副腎には胎生15日ごろに発現が認められる¹⁴⁾。この蛋白の機能の詳細は解明されていないが、構造上の解析から、膜蛋白ではないかと推測されている¹⁵⁾。人の遺伝子は3,973bpの鎖長であり、20番染色体長腕に位

置する¹⁵⁾。神経芽腫におけるNeuronatin発現の報告はこれまで認められていないが、2004年のHiyamaらのマイクロアレイのデータにおいても、この遺伝子は、予後良好群に優位な遺伝子として掲載されている¹⁰⁾。

今回使用したマイクロアレイは、Neuronatinの、2つのアイソフォーム α と β の両方を捕らえるものであったため、半定量的PCRにて各々の発現を確認したところ、 β は予後不良群に比較し予後良好群に発現が高い傾向であったが、検体によっても差があり、 α は全体的に発現が低かった。そのため、70の臨床検体でのNeuronatinのmRNA発現を測定し、既存の予後因子との関連を解析した結果、予後不良因子を有する群において、予後良好因子を有する群に比較し、低発現であった。これまでのNeuronatinに関する報告からも、この遺伝子の高発現が神経芽腫において、細胞の分化、成熟に関与しているのではないかと推測される。神経芽腫と同じ副腎髄質由来の細胞であるPC12細胞を、NGFを用いて分化誘導させた実験では、分化した細胞において逆にNeuronatinの発現が低くなったという報告がある¹⁶⁾。今回の解析において我々は、神経節腫症例も数例解析したが神経節腫においては比較的低発現であり、この結果は彼らの報告に矛盾するものではないと考えられるが、神経芽腫の分化とNeuronatinの関連についての詳細の解明には、さらなる解析が必要である。また、Neuronatinの2つのアイソフォームについての比較において β フォームに関して、より顕著にUnfavorable群において低発現であったが、この2種類のアイソフォームの発現の差がどのように神経芽腫の発生、分化に関わっているかも今後の課題と言える。現在、我々はNeuronatinが低発現である神経芽腫細胞株にNeuronatin α 、 β の各々を遺伝子導入し、解析を行っている。

E. 結論

今回、マイクロアレイを用いた予後関連遺伝子の検索を行った結果から、予後良好群に高発現であった *Neuronatin* に着目し、解析を行った。その結果、神経芽腫における *Neuronatin* の新規予後関連遺伝子としての可能性が示唆された。今後、*Neuronatin* 蛋白発現の解析および、神経芽腫における機能の解析を行い、予後因子としての確立及び分子標的治療のターゲットとしての可能性を検討していきたい。

F. 発表論文

- 1) Tanaka S, Tajiri T et al., Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. J Pediatr Surg. 39: 63-8, 2004
- 2) Tajiri T, Tanaka S, Higashi M, et al.,

Biological diagnosis for neuroblastoma using the combination of highly sensitive analysis of prognostic factors. J Pediatr Surg. 40: 2005 (in press)

- 3) 田尻達郎、水田祥代、他 神経芽腫における外科治療の役割 小児がん 2005 (印刷中)

G. 研究発表

第 20 回日本小児がん学会 2004/11/21

神経芽腫におけるマイクロアレイシステムを用いた新規予後関連因子の検討

東 真弓、田尻達郎、水田祥代、他

表1-A マイクロアレイ解析結果: Unfavorable 群発位遺伝子		
遺伝子	Ratio	
Neural cell growth	Calcitonin binding protein	6.36
	Insulin like growth factor 2 (somatomedin A)	4.73
	VEF nerve growth factor inducible	3.15
Cell cycle	Centrin, at hand protein, 2	6.35
	Activator of S phase kinase	4.11
	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	3.99
	CDK2B protein kinase 2	4.11
	Homo sapiens n-myc	18.43
Oncogene	RAN, member RAS oncogene family	6.60
	RAN binding protein 3	4.82
	ATP synthase, H+ transporting	3.36
Signaling molecules		
Protein synthesis	Ribosomal protein	
Metabolic enzymes, homeostasis	Lactate dehydrogenase	7.34
	Serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit	5.17
	NADH dehydrogenase	3.13
Heat shock protein	70kd, 40kd, 60kd, 90kd	

表1-B マイクロアレイ解析結果: Favorable 群発位遺伝子		
遺伝子	Ratio	
Neural cell growth	Neuronatin	2.97
	Growth associated protein 43	2.34
Cell cycle	Cyclin D1	2.61
Cytoskeleton, adhesion molecules	Tubulin, alpha, brain-specific	2.37
	Neural cell adhesion molecule 1	2.05
Transcription regulators	Transcription factor AP-2 beta	2.37
Oncogene	Rai guanine nucleotide dissociation stimulator	3.75
Signaling molecules	ATPase H+transporting, lysosomal	2.85
	Secretory granule, neuroendocrine protein 1	2.35

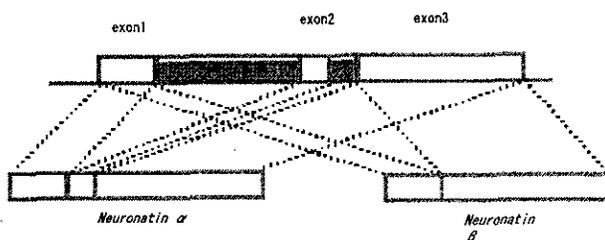


図1 Neuronatin 遺伝子構造

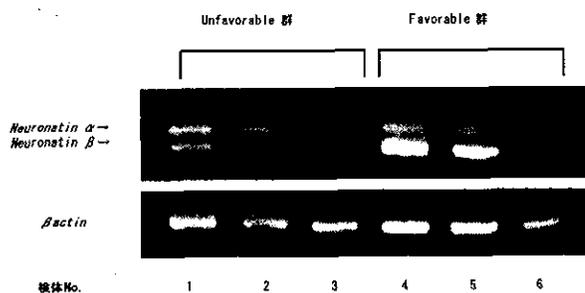


図2 半定量的RT-PCRによるNeuronatin発現解析

表2-A 定量的PCR結果 : *Neuronatin α*

分類		症例数	<i>Neuronatinα/18s rRNA</i> (%TILE50%)	P 値 (Mann-Whitney test)
年齢	1歳未満	36	0.15	P=0.21
	1歳以上	29	0.14	
病期	stage1, 2, 4s	36	0.17	P=0.18
	stage3, 4	27	0.14	
DNA ploidy	aneuploid	29	0.24	P=0.35
	diploid	19	0.14	
Shimada分類	favorable	38	0.20	P<0.05
	unfavorable	19	0.14	
MYCN増幅	なし	49	0.20	P<0.05
	あり	14	0.11	
転帰	生存	50	0.20	P<0.05
	死亡	14	0.07	

表2-B 定量的PCR結果 : *Neuronatin β*

分類		症例数	<i>Neuronatinβ/18s rRNA</i> (%TILE50%)	P 値 (Mann-Whitney test)
年齢	1歳未満	35	1.72	P<0.01
	1歳以上	34	0.36	
病期	stage1, 2, 4s	38	1.11	P<0.01
	stage3, 4	32	0.36	
DNA ploidy	aneuploid	30	0.96	P<0.05
	diploid	21	0.33	
Shimada分類	favorable	38	1.79	P<0.01
	unfavorable	23	0.14	
MYCN増幅	なし	52	1.01	P<0.05
	あり	16	0.06	
転帰	生存	47	1.01	P<0.01
	死亡	23	0.37	

研究要旨

治癒率の向上した小児がんの中で現在もなお予後が不良な神経芽腫の治療成績を向上させることを目的とし、DNA マイクロアレイを用いた新しいリスク分類の作製を試みた。神経芽腫組織から抽出した 5,300 cDNA を搭載した in-house cDNA マイクロアレイを作製し、136 例の神経芽腫を対象とした網羅的発現解析を行った結果、従来の予後因子にマイクロアレイの結果を加えることにより、神経芽腫の新たなリスク分類が可能であることが明らかとなった。また、進行神経芽腫に対する新しい治療プロトコルに連結した前向き臨床試験研究を行うために、小児がんに特化した 11,000 cDNA を搭載した新規 in-house cDNA マイクロアレイを作製した。

研究目的

近年の治療法の進歩により小児悪性腫瘍の治療率は著しく改善したが、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発見時にすでに進行したものが多く、その治癒率は今なお約 30% に止まっている。しかし、一方において、神経芽腫には自然治癒するものや、長期にわたって再発を繰り返す予後の予測が困難なサブセットも存在する。そこで、我々は、個々の神経芽腫に適した個別化医療を確立するために、神経芽腫に特化した cDNA マイクロアレイを作製し、神経芽腫の新しいリスク分類を行うことを目的とした。また、新たな前向き治療試験研究に組み込むための新しい cDNA マイクロアレイの作製も行う。

研究方法

1) cDNA マイクロアレイの作製：異なるサブセットの神経芽腫組織より oligo-capping cDNA ライブラリーを作製し、10,000 個のクローンを無作為に抽出し両端の DNA シークエ

ンスを行った後、5,300 個の独立した遺伝子を獲得した。これらを搭載した神経芽腫特異的 cDNA マイクロアレイを作製した。さらに、肝芽腫、腎芽腫からも同様に cDNA を抽出し、計 11,000 cDNA を搭載した cDNA マイクロアレイも作製した。

2) ハイブリダイゼーション：神経芽腫組織より抽出した RNA および複数の細胞株より抽出したコントロール RNA を Cy3, Cy5 蛍光ラベルし、DNA チップ上の cDNA にハイブリダイズした。

A. <倫理面への配慮> 神経芽腫サンプルは、各施設においてインフォームドコンセントが得られ、匿名化されたものを用いた。また、本研究に関しては、千葉県がんセンター倫理審査委員会の承認を得て行った。

研究結果

1) 神経芽腫特異的「cDNA マイクロアレイ 5,300」による予後予測率の検討：136 例の神経芽腫サンプルを用いた supervised classification に基づく解析結果から、マイク

ロアレイによる予後予測の accuracy は 89% (sensitivity: 87%, specificity: 89%)であった。一方、他の予後因子のそれらは、年齢: 81% (83%, 80%)、病期: 83% (97%, 77%)、Shimada 分類: 87% (78%, 89%)、DNA ploidy: 72% (67%, 73%)、MYCN 増幅: 89% (67%, 99%)であった。そこで、マイクロアレイ、年齢、病期、MYCN 増幅の4因子を合わせると 96% (93%, 97%)となり、非常に高い予後予測率が得られた。また、従来の因子では予後の予測が困難な中間型のみを対象とすると、それらの accuracy は、マイクロアレイ: 86%、年齢: 64%、病期: 64%、MYCN 増幅: 36%であり、とくに中間型の予後予測にマイクロアレイの結果が極めて有用であることが明らかになった。

2) 前向き試験用 「cDNA マイクロアレイ 11,000」の作製: 平成17年度から始まる全国統一神経芽腫グループスタディのために、さらに充実した 11,000 個の cDNA を搭載した新しい DNA チップを作製した。

考察

神経芽腫において発現している遺伝子 5,300 個を搭載した in-house cDNA マイクロアレイを作製し、136 例の神経芽腫における遺伝子発現を網羅的に解析した結果、マイクロアレイによる予後予測能は従来のいずれの予後因子にも卓るものであった。とくに、予後予測の困難な中間型に関してとくに高い予後予測率を示したことは、今後のリスク分類作成に明るい材料となった。予後の予測率はその時代の治療プロトコールにより変化するので、「cDNA マイクロアレイ 11,000」を用いた今後の新しい取り組みが期待される。

E. 結語

神経芽腫に特化した cDNA マイクロアレイ

を作製し、予後予測因子としての評価を行ったところ、従来の因子よりも有用であることが明らかになり、神経芽腫の新しいリスク分類に不可欠のものであることが裏付けられた。

F. 参考文献

1. 論文発表

1. 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 (PKA-C) as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* (in press)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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
7. 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
 8. Nakagawara A. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. S. Cohn & N-K. Cheung, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg. (in press)
 9. 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.
 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. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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 κ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.* 25:161-165, 2004.
 15. 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.
 16. 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
 17. 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.
18. 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.
19. 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

分担研究報告書

進行神経芽腫に対する標準的治療法の確立および新規治療法開発のための研究
分担研究 「中央病理診断と検体二次利用システムの確立」

分担研究者 秦 順一 国立成育医療研究センター研究所 所長

研究要旨 神経芽腫の治療改善のための大規模臨床研究を試行するための基盤整備のうち、症例登録、中央病理診断、遺伝子解析など治療選択に必須な基盤システムの構築について検討を行った。神経芽腫の中央病理診断に関しては診断精度、再現性を高めるために必要な要件を備えた分類を用いることが重要であるという前提の下に種々の病理組織分類を検討した結果、最近確立され、国際的にも広く用いられている INPC 分類を取り入れることとした。この分類によって本腫瘍の亜分類を行うことによって国際比較が可能となると考えられる。

A. 研究目的

小児がんの中でも極めて難治性である進行神経芽腫の治療成績向上には大規模な多施設臨床研究(日本神経芽腫多施設臨床研究グループ、以下 JNBSG)の推進が必須である。このような臨床研究の施行にはその基盤として、腫瘍の病理診断の標準化が必須である。同時にこれら診断を新たな治療開発のためのトランスレーショナルリサーチに再利用する仕組みを確立する必要がある。本研究では神経芽腫の中央病理診断体制の確立のため、病態を含めた予後予測が可能な神経芽腫の病理組織分類を定め、且つこれら診断の標準化のためのシステム構築を目的とする。同時に、これら検体を二次利用するための体制を確立する。

B. 研究方法

本年度は進行神経芽腫の臨床研究に資するための中央病理診断の体制に関して以下の検討を行った。

1) 客観的で再現性の高い病理診断と同時に病態を反映する遺伝子解析の結果を臨床試験の実施機関と関連部門（リスク分類委員会、データセンターなど）伝達する方法を確立するために必要な症例登録の仕組みおよびこれらの事業を行うタスクフォースなど。

2) 診断の再現性が高く、腫瘍の生物学的特性を正確に示す病理組織分類法の確定。

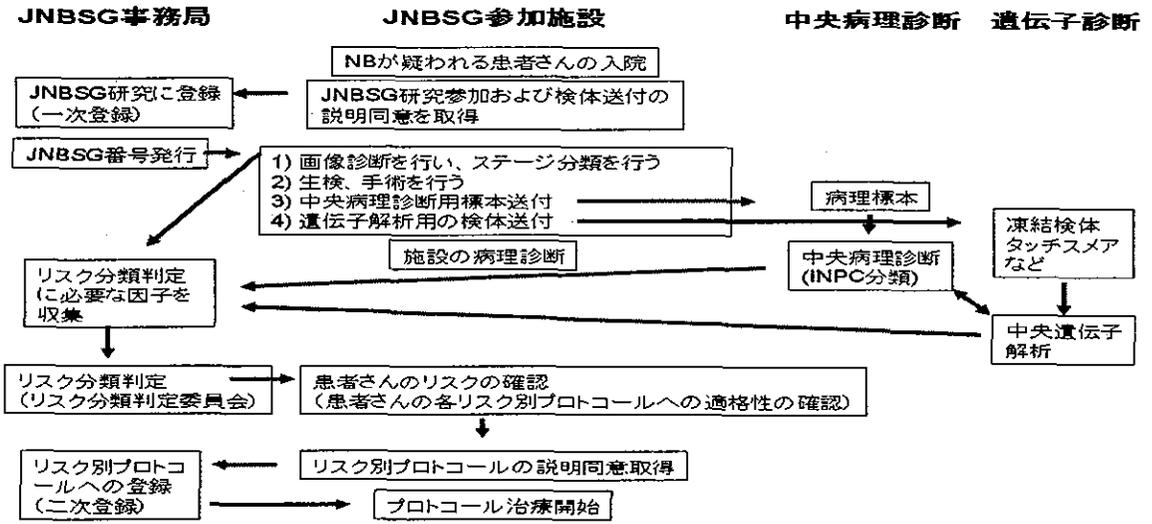
C. 研究結果 および D. 考察

①JNBSG の症例登録から病理診断結果および遺伝子解析の結果を関連各所に伝達する概要は図に示した。

このシステムの特徴は個人情報 JNBSG 番号に置き換えることによって、治療選択に必須のリスク分類を中央病理診断および遺伝子解析を総合的に判断して行うことができることにある。このシステムによるリスク分類は国際的にも比肩できるものである。

図

JNBSG参加施設の患者登録手順と検体送付手順略図



②中央病理診断に用いられる病理組織分類について

i) 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) 診断の再現性の高いこと (Reproducible)、iv) 分類が病態 (予後) および腫瘍の生物学的特性と関連していること、の要件を満たした分類を用いる必要であるという認識の下に、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 が策定した神経芽腫新国際分類 I NPC が適当であるという結論に達した。

③神経芽腫新国際分類 INPC の概要について

A) INPC 組織学的分類の方針と病理組織分類

神経芽腫の腫瘍組織は、腫瘍細胞である神経芽細胞と間質であるシュワン様細胞によって構成される。INPC 分類は、1) 腫瘍性神経芽細胞と間質であるシュワン様細胞との量、2) 増殖している神経芽細胞の分化・成熟程度、3) 腫瘍細胞の増殖性の目安となる Mitosis-Karyorrhexis-Index (MKI) を取り入れる、4) 神経芽腫の腫瘍細胞の分化・成熟度は年齢と極めて高い相関があるので、発生年齢と組織像によって腫瘍の予後を推定する。

神経芽腫群腫瘍の亜群は以下のように定める。

- 1) Neuroblastoma/subgroup
 - a) undifferentiated
 - b) poorly differentiated
 - c) differentiating
- 2) Ganglioneuroblastoma, intermixed
- 3) Ganglioneuroma/mature, maturing
- 4) Ganglioneuroblastoma, nodular

B) INPC の説明

1) Neuroblastoma

神経芽細胞の増殖が主体でシュワン細胞は認められないか、わずかに血管結合組織周囲にみられる。以下の亜型が存在する。

a) Undifferentiated type

極めて未熟な神経芽細胞からなり、腫瘍細胞間に明らかな神経細線維は認められない。この亜型に診断されると年齢に関連なく予後不良群分類される

b) Poorly differentiated type

神経細線維が腫瘍細胞間に明らかに介在する腫瘍をいう。腫瘍細胞は小型、裸核状である。時には交感神経節細胞への分化を窺わせる細胞が混じるが、これらの細胞は腫瘍組織全体として5%以下に止まる。

c) Differentiating neuroblastoma type

腫瘍細胞の多くは、なお未熟な神経芽細胞であるが交感神経節細胞へ分化傾向を示す細胞が5%を超える腫瘍をいう。なお、交感神経節細胞への分化傾向を示す細胞の形態学的基準として、①細胞の腫大 (核面積の2倍以上)、②胞体の好酸性の増加、③核が腫大すると同時に核小体が明瞭化する、と定められている。

d) Mitosis Karyorrhexis-Index (MKI)

腫瘍細胞の増殖性の指標となり、予後とも密接に関連する所見として MKI の程度を必ず付記する。MKI はその出現頻度に従って高度 (high、>4%: >200 個/5000 細胞)、中等度 (intermediate、2-4% :100-200 個/5000 細胞)、軽度 (low、<2%: 100 個/5000 細胞) に分類される。

2) Ganglioneuroblastoma (GNB), intermixed

成熟したシュワン様細胞が腫瘍組織の 50% 以上を占め、その中に神経節細胞様の大型な腫瘍細胞や小型で未熟な神経芽細胞

の増殖巣がする。

3)Ganglioneuroma (GN)

シュワン様細胞からなる間質が腫瘍の大部分を占めるもので、その中に僅かに分化したまたは分化途上にある交感神経節様細胞が含まれる。

4)Ganglioneuroblastoma, nodular type (GNB, nodular)

肉眼的に神経節腫様組織から成る腫瘍で、その中に出血を伴う未熟神経芽細胞の増殖巣が結節状にみとめられる腫瘍をいう。すなわち、後者は前者とは明らかに異なるクローンから成る。すなわち、前者は clonal evolution の結果として結節が形成される。なお、予後の判定は未熟神経芽細胞から成る胞巣の所見は neuroblastoma のそれに準じて評価する。

C) 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 歳以上の神経芽腫、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。

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

E. 結論

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、今回の多施設臨床研究が成り立っている。その中で、神経芽腫の治療選択・決定に必須の基盤的な要素である中央病理診断のシステムを確立する検討を行った。本システムならびに分子遺伝学的レベルの解析によって治療選択のリスク分類が可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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.

3, 秦 順一: ウイルムス腫瘍総論、細胞 36:262-264, 2004

4, 秦 順一: ウイルムス腫瘍と WT1 遺伝子、細胞 36:269-272, 2004

5, 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

6, 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. 知的財産件の出願・登録

なし。

分担研究報告書

進行神経芽腫に対する標準治療確立および新規治療開発のための研究
分担研究「神経芽腫の臨床試験デザインおよびデータマネジメント」

主任研究者 牧本 敦 国立がんセンター中央病院 第二領域外来部・小児科 医員

研究要旨 当該研究班の第一号試験である「進行神経芽腫に対する術前化学療法としての大量化学療法併用自家造血幹細胞移植および遅延局所療法（delayed local therapy）の早期第II相臨床試験」について、参加施設医師および生物統計家と共に会議を開き、臨床試験の仮説およびそのエンドポイントと統計学的手法を検討した。次いで、プロトコールコンセプトを作成すると共に、参加施設を巻き込んだプロトコール作成会議を開催し、適格規準の決定、登録手順、プロトコール治療の定義、減量・延期規準の決定、安全性モニタリングの方法などについて議論を行い、フルプロトコールを作成した。

A. 研究目的

ヘルシンキ宣言と臨床研究倫理指針を遵守した臨床試験を実施するためには、倫理性の確保と同様に、科学的に証明可能な仮説に基づく臨床試験計画が必須である。データセンターと生物統計家を巻き込んで仮説証明のためのデザインを行うと同時にデータ管理を最適化し、当該臨床試験における倫理性と科学性を最大限に保証することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

今年度は、以下の1~3の活動を行った。参加施設医師および生物統計家と共に会議を

開き、臨床試験の仮説およびその証明方法を検討する。本年度においては、当該研究班の第一号試験である「進行神経芽腫に対する術前化学療法としての大量化学療法併用自家造血幹細胞移植および遅延局所療法（delayed local therapy）の早期第II相臨床試験」について、そのエンドポイントと統計学的手法を検討した。

上記1.に基づいてプロトコールコンセプトを作成すると共に、参加施設を巻き込んだプロトコール作成会議を開催し、適格規準の決定、登録手順、プロトコール治療の定義、減量・延期規準の決定、安全性モニタリングの方法などについて議論を行い、フ

ルプロトコールを作成した。

第二号臨床試験である「進行神経芽腫に対する多剤併用化学療法、局所療法および自家造血幹細胞救済療法を併用した大量化学療法を含む集学的治療の後期第 II 相試験」プロトコールの作成を開始した。

C. 研究結果

当該研究班の第一号試験である「進行神経芽腫に対する術前化学療法としての大量化学療法併用自家造血幹細胞移植および遅延局所療法 (delayed local therapy) の早期第 II 相臨床試験」については、以下のようなデザインとした。

(1) 主たる解析と判断規準

本試験の主たる目的は、標準治療に比べて外科手術と放射線治療の施行時期を遅らせ、寛解導入療法と自家造血幹細胞救済療法を併用した大量化学療法を共に完了した後に行う「遅延局所療法」の実行可能性を評価することである。「遅延局所療法」が実行可能である、と結論するためには、化学療法 3 コース終了後の治療第 12 週に外科手術を行う標準治療に対して、外科手術を遅らせてもそれによる再燃・増悪が明らかに増えない事を確認する必要がある。この目的のために、標準治療を歴史対象として、本来外科手術が行われる治療第 12 週の時点から 1 年の間に増悪しない生存割合を算出し、歴史対象のデータと比較することによって、局所治療の遅れが早期の再発再燃につながるか否かを推測することができる。

よって、治療第 12 週を起点とした 1

年無増悪生存割合を本試験のプライマリエンドポイントとする。歴史対象に用いるべきデータとして、転移性神経芽腫に対する世界各国における臨床試験成績はほぼ類似しており、それぞれの報告の生存曲線から読み取ると約 80% である。この事から閾値成功率を 70%、期待成功率を 90% とし、 $\alpha=0.1$ (両側)、 $\beta=0.2$ にて算出すると、必要被験者数は 14 例となる。10% の脱落を見込んで全 16 例を登録する。

(2) 予定登録数・登録期間・追跡期間

厚生労働省がん研究助成金・金子班による進行神経芽腫研究の登録実績から推測すると、ステージ IV の神経芽腫は年間 25~30 例の登録が見込める。一方日本大学では最近 5 年間の治療実績では平均年間 3~5 例の患者がみられ、その他の施設では平均 1~3 例と推測される。このため日本大学と他の 6 施設の協力により、2 年間で 16 例の登録は可能であると考えられる。以上より、本試験の予定登録数は 16 例、登録期間 2 年、観察期間は 15 ヶ月、と設定する。

プロトコール作成時に問題となった議論を以下に記載する。

- (1) 適格規準は、新規診断されたステージ IV の神経芽腫患者で年齢 1 歳以上 18 歳未満とした。この根拠は、初診時の画像診断を含む臨床像のみで適格性の確認が可能な事、生物学的な因子にかかわらず絶対的に予後不良な集団である事である。また、年齢

に関して、乳児発症の神経芽腫は極めて予後良好であることから 1 歳以上を設定し、小児慢性特定疾患指定の医療費補助が受けられるという社会的要因を重視して 18 歳未満と設定した。

- (2) 登録手順は、厚生労働科学研究（小児疾患臨床研究分野）牧本班で設立された「小児がんデータセンター」の標準的手順である FAX 登録を使用する。
 - (3) プロトコル治療の定義、減量・延期規準に関しては、過去の症例の後方視的な検討から毒性と効果のバランスを判断し、基本レジメンにおいてシスプラチンを減量する事、また、毒性に応じた減量や延期の規準を参加医師の間で十分に議論した。
 - (4) 安全性モニタリングに関して、寛解導入化学療法および大量化学療法と自家造血幹細胞救済におけるそれぞれの重篤な有害事象の早期発生をモニタリングし、発生割合が 30% を越えるサイズの事後確率が 97.5% 以上の場合に効果安全性評価委員会に諮り、研究の継続を審議する。ただし、対象症例数が 4 例以下の時点で重篤な有害事象が 2 例以上発症した場合にはその時点で効果安全性評価委員会に諮り、研究の継続を審議する事とした。
- ① 寛解導入化学療法に関しては、年 2 回の定期モニタリング時と、強化化学療法 4 コース目の開始時点(寛解導入化学療法開始後約 90 日)までに重篤な有害事象が発生するかどうか

かについて検討する。

- ② 大量化学療法と自家造血幹細胞救済に関しては、年 2 回の定期モニタリング時と、自家造血幹細胞移植併用大量化学療法終了後 30 日までに重篤な有害事象が発生した時に重篤な有害事象が発生するかどうかについて検討する。

【参考】対象症例数を N 人、発症例数を n 人とし、事後分布は $Beta(0.5+n, 0.5+N-n)$ を用いる。対象症例数別に発症例数が何人以上の場合に試験が中止となるかを以下に示す。

対象症例数	重篤な有害事象発症例数
5 人	4 人以上
6, 7 人	5 人以上
8~10 人	6 人以上
11, 12 人	7 人以上
13, 14 人	8 人以上
15, 16 人	9 人以上

第二号臨床試験である「進行神経芽腫に対する多剤併用化学療法、局所療法および自家造血幹細胞救済療法を併用した大量化学療法を含む集学的治療法の後期第 II 相試験」に関しては、全国多施設の参加を前提とし、かつ、初診時の臨床像では適格規準をうまく判断できない可能性があるため、神経芽腫患者発生時の第一登録と、病理・生物学的検査結果判明後の二次登録を含む二段階登録システムを採用する事とした。そのための症例登録センター（中央病理診断を含む）を国立成育医療センターに置き、現在、内部の手順を作成中である。

(倫理面への配慮)

本研究では、臨床試験を受ける患者権利に関する啓蒙活動を推進し、治療施設における倫理面への配慮を徹底させると同時に、各方面からの委員を糾合して適正な指針の確立を目指す。具体的には、ヘルシンキ宣言や米国ベルモントレポート等の国際的倫理原則に従って以下を遵守すると同時に、我が国の実情にあった指針を策定する。

試験プロトコールについては、倫理審査委員会の承認が得られた施設からしか患者登録を行わない。すべての患者について登録前に十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人または代諾者より文書で得る。データの取り扱い上、患者氏名等直接個人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保し、個人情報（プライバシー）保護を厳守する。

研究の第三者的監視：本研究班により、もしくは賛同の得られた他の主任研究者と協力して、効果安全性評価委員会等を組織し、研究開始前および研究実施中の第三者的監視を行う。

D. 考察

これまでの小児がん領域の臨床研究体制を振り返ってみると、疾患特異的な自主研究グループが多数存在し、それぞれに携わる医師は重複しているにも関わらず、研究計画作成の手順も、データ収集や解析の手順もグループによって異なるばかりか、前向きに計画されないものがほとんどであった。また、それらのデータ管理は病棟業務を行う医師が兼任していたため、正確性と科学性の保証は困難であり、さらに、プロトコールの作成やその評価においても、第三者的な評価システムが確立しておらず、

倫理性の確保ができなかった。

この現状を打破するために、他の厚生労働科学研究費補助金の枠組みで設立された小児がんデータセンターを利用して、明確な仮説を証明するためのエンドポイントを設定し、生物統計専門家による統計計画をベースとした科学的な臨床試験プロトコールを作成し、専任データマネージャーによる正確なデータ管理を行うこととした。これによって、臨床試験から信頼性の高いエビデンスを創生し、複数の臨床試験を連続的に、相互の結果を受け継ぎながら行うことが可能となる。

本研究では、新規発症の症例を対象として、現在日本で広く行われている治療法の有効性と安全性を確認試験で再検討すると同時に、問題点を解決できる新規治療法の妥当性試験を行い、その二つの臨床試験結果を持って、将来の無作為比較試験を計画・実行し、無増悪生存率を10%以上向上させることのできる標準治療を開発することを一大目標とする。これらの臨床試験活動によって、各施設、各専門医師間の相互評価が促進し、集学的治療体制の確立に貢献すると考えられ、短期間で小児がんの治療水準を向上させ、その成果を患者へ還元することが期待できる。

本年度に作成した「進行神経芽腫に対する術前化学療法としての大量化学療法併用自家造血幹細胞移植および遅延局所療法（delayed local therapy）の早期第II相臨床試験」プロトコールに基づいて来年度早期に臨床試験を開始すると同時に、第二号臨床試験である「進行神経芽腫に対する多剤併用化学療法、局所療法および自家造血幹細胞救済療法を併用した大量化学療法を

含む集学的治療法の後期第 II 相試験」プロトコールの作成を継続する。

E. 結論

当該研究班の第一号試験である「進行神経芽腫に対する術前化学療法としての大量化学療法併用自家造血幹細胞移植および遅延局所療法 (delayed local therapy) の早期第 II 相臨床試験」について、そのエンドポイントと統計学的手法を検討し、フルプロトコールを作成した。

また、第二号臨床試験である「進行神経芽腫に対する多剤併用化学療法、局所療法および自家造血幹細胞救済療法を併用した大量化学療法を含む集学的治療法の後期第 II 相試験」プロトコールの作成を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

1. Kami M, Makimoto A, et al.
Reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation (RIST) for solid malignancies. *Jpn J Clin Oncol.* 2004;34:707-16. (Review)
2. 牧本 敦.
臨床試験におけるデータマネージメントと品質管理・品質保証
小児外科 36 巻 7 号 : p846-853, 2004.
3. 牧本 敦. 我が国における小児固形腫瘍の本格的臨床研究確立のための基盤整備について *小児科診療* 67 巻 4 号 : p577-582, 2004.
4. 崎山美知代, 牧本 敦.
移植治療における関連毒性の評価基準.
細胞医療, 高上洋一編 : 医薬ジャーナル

社. 東京 2004.

(学会発表)

1. Reduced-Intensity Stem Cell Transplant (RIST) -promise and problems-. Makimoto A. Turkish Pediatric Oncology Group Annual Meeting, 2004 (Special lecture) May 18-22. Kapadokya, Turkey.
2. 小児がん研究の新展開 臨床研究から基盤研究へ 小児医療の特殊性を考慮した小児がんの臨床研究～現状と将来展望～. 牧本 敦.
第 63 回日本癌学会学術総会.
平成 16 年 9 月 29 日～10 月 1 日. 福岡
3. 小児がんデータセンターにおけるデータマネージメントの実際. 牧本 敦.
第 31 回日本小児臨床薬理学会年会
平成 16 年 9 月 17-18 日. 静岡
4. 小児固形腫瘍領域における臨床試験推進と基盤整備. 牧本 敦. 第 20 回日本小児がん学会
平成 16 年 11 月 21-22 日. 京都
5. 小児がん領域における医師主導治験実現のための活動について. 牧本 敦, 他.
第 107 回日本小児科学会学術集会 平成 16 年 4 月 9-11 日. 岡山
6. 質の高い臨床試験を支える小児がんデータセンターの活動について. 牧本 敦, 他.
第 107 回日本小児科学会学術集会 平成 16 年 4 月 9-11 日. 岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 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

書籍

(* : 別刷未添付)

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
Nakagawara A *	Molecular and developmental biology of neuroblastoma.	S. Cohn, N-K Cheung	Neuroblastoma	Springer-Verlag, Heidelberg	Heidelberg	2005	in press
Nakagawara A *	Molecular and developmental biology of neuroblastoma.	Luigi Aloe, Laura Calza	Progress in Brain Research 146	Elsevier Science Publisher	The Netherland	2004	233-242
崎山美知代 牧本 敦	移植治療における関連毒性の評価基準	高上 洋一	細胞医療	医薬ジャーナル社	東京	2004	

雑誌

(* : 別刷未添付)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiyama E Kaneko M Nakagawara A et al.	High expression of telomerase is an independent prognostic indicator or poor outcome in hepatoblastoma.	Br J Cancer	91	972-979	2004
Isobe K Kaneko M et al.	Expression of the human telomerase reverse transcriptase in pheochromocytoma and neuroblastoma tissue.	Endocrine Journal	51	47-52	2004
Isobe K Kaneko M et al.	Expression of mRNAs for PACAP and its receptor in human neuroblastoma and their relationship to catecholamine synthesis.	Regulatory Peptides	123	29-32	2004
金子道夫 平井みさ子	神経芽腫の治療	小児科診療	67	583-589	2004
金子道夫 平井みさ子	日本における進行神経芽腫の治療成績	小児外科	36	11-15	2004
田中丈夫 金子道夫他	神経芽腫進展リスク評価の特異性と感度-臨床診断神経芽腫での検討	小児がん	41	71-75	2004
堀 哲夫 金子道夫	胆道閉鎖症に肝細胞癌を合併し生体肝移植後5年後に後腹膜リンパ節に再発を認めた1例	小児がん	41	854-858	2004
Osone S Iehara T Sugimoto T et al.	Fenretinide induces sustained- activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells.	Int J Cancer	112	219-224	2004
Tanaka S Tajiri T et al.	Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma.	J Pediatr Surg	39	63-68	2004
Tajiri T Tanaka S et al. *	Biological diagnosis for neuroblastoma using the combination of highly sensitive analysis of prognostic factors.	J Pediatr Surg	40	In press	2005
田尻達郎 水田祥代他	神経芽腫における外科治療の役割	小児がん		印刷中	2005

Hanamoto T Ozaki T Nakagawara A et al. *	Identification of protein kinase A catalytic subunit β (PKA-C β) as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function.	J Biol Chem		In press	2005
Ohira M Oba S Nakagawara A et al. *	Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas.	Cancer Cell		In press	2005
Ozaki T Hosoda M Nakagawara A et al. *	Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death.	Cancer Lett		In press	2005
Lin L Nakagawara A Koseki H et al. *	Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage.	Oncogene	Epub	Feb 28	2005
Abe M Nakagawara A Ushijima T et al.	CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas.	Cancer Res	65	938-944	2005
Kramer S Ozaki T Nakagawara A et al.	Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells.	Oncogene	24	938-944	2005
Kato C Miyazaki K Nakagawa A Ohira M Nakagawara A et al.	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
Takahashi M Ozaki T Nakagawara A et al.	Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene INGI is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas.	Oncol Rep	12	811-816	2004
Yamada S Ohira M Horie H Ando K Nakagawara A et al.	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
Ohtori S Nakagawara A Sakiyama S et al.	Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene abrrative in neuroblastoma.	Mol Cell Neurosci	25	504-514	2004
Hamano S Ohira M Isogai E Nakagawara A et al.	Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of Nbla 10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas.	Int J Oncol	24	1457-1466	2004

Miyazaki K Nakagawara A et al.	NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1.	J Biol Chem	279	11327-11335	2004
Nakagawara A Ohira M et al.	Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue.	Cancer Lett	204	223-224	2004
Shibata R Hata J et al.	Extraovarian primary peritoneal carcinoma in a child.	Peditr Blood Cancer	42	292-293	2004
Du W Hattori Y Hata J et al.	Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment.	Pathol Int	54	285-294	2004
秦 順一	ウイルス腫瘍総論	細胞	36	262-264	2004
秦 順一	ウイルス腫瘍とWT1遺伝子	細胞	36	269-272	2004
大喜多 肇 秦 順一	小児腫瘍	病理と臨床	22	123-129	2004
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
Kami M Makimoto A et al.	Reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation (RIST) for solid malignancies (Review).	Jpn J Clin Oncol	34	707-716	2004
牧本 敦	臨床試験におけるデータマネジメントと品質管理・品質保証.	小児外科	36	846-853	2004
牧本 敦	我が国における小児固形腫瘍の本格的臨床研究確立のための基盤整備について	小児科診療	67	577-582	2004