

**Table 3.** Expression of hTERT and N-Myc mRNA in 16 neuroblastomas

No.	Age/sex	type	stage	status	Shimada class	hTERT (nested)	hTERT (real-time)	N-Myc
1	8 m/M	NB	II		favorable	+	146	4.61
2	2 y/F	GNB	III		favorable	+	76	0.37
3	11 m/M	GNB	II		favorable	+	0	0.56
4	7 m/F	NB	II		favorable	-	0	3.77
5	8 m/M	NB	I		favorable	-	28	5.8
6	10 m/F	NB	II		favorable	+	957	1.45
7	1 y/M	GNB	II		unfavorable	+	223	2.56
8	8 m/M	NB	III	progressive	favorable	+	55	3.59
9	1 y/F	NB	IVa	progressive	unfavorable	+	768	66.51
10	1 y/F	NB	IVa	progressive	unfavorable	+	241	36.57
11	1 y/M	NB	IVa	death	unfavorable	+	1305	26.77
12	3 y/F	NB	IVa	death	unfavorable	+	99	3.88
13	4 y/F	NB	IVa	death	unfavorable	+	714	49.33
14	2 y/F	NB	IVb	progressive	unfavorable	+	164	0.29
15	1 y/M	NB	IVa	progressive	unfavorable	+	539	5.51
16	3 y/F	NB	IVa	progressive	unfavorable	+	589	44.95

GNB = ganglioneuroblastoma; NB = neuroblastoma

The three suspected malignant cases, 6, 7, and 8, have as yet no malignant clinical manifestation. The hTERT mRNA positive cases in the benign samples may develop metastasis in the future.

Kinosita *et al.* and Kubota *et al.* [9,10] reported that telomerase activity was a potential marker for malignancy, but Bamberger *et al.* [11] noted that telomerase activity was not a suitable marker for malignancy in the adrenal gland. A potential reason for the different results may be that telomerase activity easily decreases in storage and may vary in different regions of a sample. hTERT mRNA seems to be more stable than the telomerase activity, but also varies in different regions of the sample. We could not rule out the possibility of false positive samples, since lymphocytes always contain hTERT mRNA [15] and may contaminate the samples.

A number of markers have been examined as possible predictors of malignancy, for example, MIB-1, a monoclonal antibody against the Ki-67 protein. It was recently reported that the MIB-1 proliferative index score may be a useful indicator for diagnosing malignant pheochromocytoma [16], and according to Prof. H Sasano (Tohoku Univ, Japan, personal communication), the score correlates with telomerase activity. In this study, the MIB-1 index was a useful indicator for discriminating the malignancy and correlated with hTERT mRNA in the 4 malignant samples. Elder *et al.* [17] also reported that in all three patients with

malignant tumors, the tumors were positive for either hTERT expression or Ki-67/MIB-1 immunoreactivity, and concluded that combined use of Ki-67 and hTERT was a very useful tool to identify malignant pheochromocytomas.

In neuroblastomas, the expression of hTERT mRNA correlated with the N-myc mRNA expression, a prognostic marker. Hiyama *et al.* [12] reported that in neuroblastomas high telomerase activity correlated with poor outcome, while the tumors with low activity of this enzyme showed favorable outcome. Krams *et al.* [17] reported that the presence of full-length hTERT transcripts detected by RT-PCR analysis of neuroblastic tumor samples might help in appraising the malignant potential in individual cases.

However, we could not discriminate progressive neuroblastomas from benign ones by the real-time PCR for the full-length type. The basal expression of hTERT mRNA seems to be higher in neuroblastomas than in pheochromocytomas, and that causes the low sensitivity in discriminating progressive neuroblastomas. We previously examined hTERT mRNA expression in other tumors: All of 12 mammary gland tumors, including 2 malignant ones, were positive for hTERT mRNA, whereas all of 8 parathyroid gland tumors, including 7 cancers, were negative (data not shown). Thus basal expression of hTERT mRNA may vary in these tumors due to their tissue origin, and this variation may reduce its utility as a prognostic marker.

### Acknowledgements

This study was supported in part by a grant from the Tsukuba University Research Project and Charitable

Trust Clinical Pathology Research Foundation of Japan. We thank Miss Sumiko Nissato for technical assistance.

### References

- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu QY, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA (1997) HEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90: 785–795.
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277: 955–959.
- Kim NW (1997) Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 33: 781–786.
- Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33: 787–791.
- Falchetti ML, Pallini R, Larocca LM, Verna R, D'Ambrosio E (1999) Telomerase expression in intracranial tumors: prognostic potential for malignant gliomas and meningiomas. *J Clin Pathol* 52: 234–236.
- Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC, Wright WE, Shay JW (1997) Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Hum Pathol* 28: 416–420.
- Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J, Nabholz M (2002) Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* 21: 541–552.
- Gupta D, Shidham V, Holden J, Layfield L (2000) Prognostic value of immunohistochemical expression of topoisomerase alpha II, MIB-1, p53, E-cadherin, retinoblastoma gene protein product, and HER-2/neu in adrenal and extra-adrenal pheochromocytomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 8: 267–274.
- Kinoshita H, Ogawa O, Mishina M, Oka H, Okumura K, Yamabe H, Terachi T, Yoshida O (1998) Telomerase activity in adrenal cortical tumors and pheochromocytomas with reference to clinicopathologic features. *Urol Res* 26: 29–32.
- Kubota Y, Nakada T, Sasagawa I, Yanai H, Itoh K (1998) Elevated levels of telomerase activity in malignant pheochromocytoma. *Cancer* 82: 176–179.
- Bamberger CM, Else T, Bamberger AM, Frilling A, Beil FU, Allolio B, Schulte HM (1999) Telomerase activity in benign and malignant adrenal tumors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107: 272–275.
- Hiyama E, Hiyama K (2002) Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 21: 6643–649.
- Linnolia RI, Keiser HR, Steinberg SM, Lack EE (1990) Histopathology of benign versus malignant sympathoadrenal paragangliomas: clinicopathologic study of 120 cases including unusual histopathologic features. *Hum Pathol* 21: 1168–1180.
- Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Ichikawa T, Shay JW, Yokoyama T (1997) Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 33: 1932–1936.
- Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M (1995) Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 155: 3711–3715.
- Ohji H, Sasagawa I, Ichianagi O, Suzuki Y, Nakada T (2001) Tumor angiogenesis and Ki-67 expression in pheochromocytoma. *BJU Int* 87: 381–385.
- Elder EE, Xu D, Hoog A, Enberg U, Pisa P, Gruber A, Larsson C, Backdahl M (2003) Ki-67 and hTERT expression can aid in the distinction between malignant and benign pheochromocytoma and paraganglioma. *Mod Pathol* 16: 246–255.
- Krams M, Claviez A, Heidorn K, Krupp G, Parwaresch R, Harmsd D, Rudolph P (2001) Regulation of telomerase activity by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase mRNA in a subset of neuroblastomas. *Am J Pathol* 159: 1925–1932.



## Expression of mRNAs for PACAP and its receptor in human neuroblastomas and their relationship to catecholamine synthesis

Kazumasa Isobe<sup>a,\*</sup>, Michio Kaneko<sup>b</sup>, Setsuko Kaneko<sup>b</sup>, Sumiko Nissato<sup>a</sup>, Toru Nanmoku<sup>a</sup>, Kazuhiro Takekoshi<sup>a</sup>, Yukichi Okuda<sup>c</sup>, Yasushi Kawakami<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Clinical Pathology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

<sup>b</sup>Department of Pediatric Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

<sup>c</sup>Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

Available online 10 July 2004

### Abstract

**Purpose:** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a member of the secretin/glucagon/vasoactive intestinal peptide family, induces the expression of catecholamine-synthesizing enzymes in adrenal medullary cells. In addition, PACAP and its receptor have been detected in human neuroblastoma tissues and cell lines, though it is not yet known whether PACAP enhances the expression of genes encoding catecholamine-synthesizing enzymes. To address this question, we analyzed PACAP, PACAP receptor and tyrosine hydroxylase (TH) mRNAs in neuroblastomas. **Methods:** The levels of mRNA for PACAP and vasoactive intestinal peptide (VIP), as well as their receptors and the mRNA for TH were measured by RT-PCR or real-time PCR analysis. **Results:** VPAC1R mRNA was detected in all of 16 tissues and 3 cell lines that were examined, while VPAC2R mRNA was detected in 5 of 16 (31%) tissue and 2 of 3 cell lines. PAC1R mRNA was detected in 6 out of 16 (38%) tissues and none of 3 cell lines. mRNA expression of PACAP and TH were detected in many tissues (10/16 and 16/16, respectively). However, neither in tissues nor cell lines did PACAP mRNA expression correlate with TH mRNA expression. **Conclusion:** Our findings suggest that PACAP is not involved in the regulation of expression of TH in neuroblastomas.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP); Tyrosine hydroxylase (TH); Neuroblastoma

### 1. Introduction

The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a member of the secretin/glucagon/vasoactive intestinal peptide (VIP) family of peptides isolated from ovine hypothalamus [1]. PACAP has been localized by immunohistochemistry to the central nervous system, digestive tract, and adrenal gland, and was shown to exhibit a variety of biological activities.

We previously reported that PACAP stimulated catecholamine secretion and synthesis in cultured porcine adrenal medullary cells [2,3]. We also reported that PACAP mRNA expression correlated with TH and PNMT mRNA expression, as well as epinephrine levels in 16 intra-adrenal pheochromocytomas [4].

Neuroblastoma is an embryonal tumor of neuroectodermal cells derived from the neural crest and destined for the adrenal medulla and sympathetic nervous system. Neuroblastoma is thought to arise from the neuroblast, but pheochromocytoma is derived from chromaffin cells during embryonic development. Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor in children. Its biological behavior is notoriously unpredictable and comprises a spectrum ranging from spontaneous regression to rapid metastatic spread. Neuroblastomas and pheochromocytomas can produce catecholamines. Dopamine is usually the major active catecholamine produced, and its production leads to elevated concentrations of homovanilic acid in urine of neuroblastoma patients. Norepinephrine and epinephrine are the major catecholamines produced in pheochromocytomas.

It was reported that PACAP and its receptors were expressed in neuroblastomas and cell lines [5,6], and it was also reported that PACAP can regulate the prolifera-

\* Corresponding author. Tel./fax: +81-298-53-3054.

E-mail address: [k-isobe@md.tsukuba.ac.jp](mailto:k-isobe@md.tsukuba.ac.jp) (K. Isobe).

tion and differentiation of neuroblastoma cells in vitro [7–10]. However, little is known about the relationship between PACAP and catecholamine synthesis in neuroblastomas. Thus PACAP might play a role in the regulation of catecholamine synthesis. To explore this possibility, we analyzed the relationship between PACAP, PACAP receptors, and tyrosine hydroxylase (TH) mRNA levels in neuroblastomas.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Tissue samples

Sixteen tissue samples of surgically removed neuroblastomas were analyzed. Informed consent for the experimental use of the samples was obtained from all donors. Each of these specimens was frozen immediately after surgical resection and was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

Patient characteristics and tumor stage [11] are detailed in Table 1. There were 3 cases of ganglioneuroblastoma and 13 cases of neuroblastomas. Ganglioneuroblastoma is a malignant tumor composed of immature neuroblasts and mature ganglion cells. Neuroblastoma is a highly malignant tumor arising from more primitive sympathoblastic cells.

Total RNA from the adrenal gland was purchased from Clontech (Palo Alto, CA). This study was approved by the ethics committee of the Medical Faculty of Tsukuba University, Tsukuba, Japan.

### 2.2. Cell cultures

The neuroblastoma-derived cell lines, NH12, TGW, GOTO were obtained from Human Science Research Re-

source Bank (Osaka, Japan). All cell lines are derived from the adrenal gland.

GOTO cells were cultured in RPMI1640 and Eagle's MEM (1:1) with 10% fetal bovine serum. TGW cells were cultured in Eagle's MEM with 10% fetal bovine serum. NH12 cells were cultured in alpha-MEM with 10% fetal bovine serum. All cell lines were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  in the presence of 5%  $\text{CO}_2$ . Cells were collected at confluence by trypsinization, rinsed with PBS and pelleted by a low speed centrifugation. The pellet was homogenized in guanidine isothiocyanate for RNA preparation.

### 2.3. RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

The expression of VIP, PACAP, VPAC1R, VPAC2R, PAC1R and GAPDH was determined by RT-PCR as described below [12].

The sequences of synthetic oligonucleotide primers for VIP, PACAP, and their receptors were as follows:

VIPS, 5'-TCACTGACAACACTATAACCCGCC-3';  
 VIPA, 5'-ACAGCATATGAAATTGCAGGC-3';  
 VIPA, 5'-ACAGCATATGAAATTGCAGGC-3';  
 PACAPS, 5'-GATCTTCACGGACAGCTACAG-3';  
 VPAC1RS, 5'-CCCCCTGCTGGGTCTTCTGC-3';  
 VPAC1RA, 5'-ATTGCTGGTGGCTGCCTTCTCAT-3';  
 VPAC2RS, 5'-CTGCACGGTGCCCTGCCCAAAAGT-3';  
 VPAC2RA, 5'-GCCCCCTCCACCAGCAGCCA-GAAGA-3';  
 PAC1RS, 5'-TTAACTTTGTGCTTTTTATTGGC-3';

Table 1  
Expression of VIP, PACAP, VPAC1R, VPAC2R and PAC1R mRNA in 16 neuroblastomas and cell lines

No.	Age at diagnosis	Sex	Type	Stage	Status	VIP	PACAP	VPAC1R	VPAC2R	PAC1R
1	8m	M	NB	II		-	+++	++	+	-
2	2y	F	GNB	III		+++	+++	++	-	-
3	11m	M	GNB	II		-	++	++	-	-
4	7m	F	NB	II		+	++	++	-	-
5	8m	M	NB	I		-	++	++	-	+
6	10m	F	NB	II		-	++	++	-	++
7	1y	M	GNB	II		-	++	++	-	-
8	8m	M	NB	III	progressive	-	++	++	+	-
9	1y	F	NB	IVa	progressive	-	+	++	-	-
10	1y	F	NB	IVa	progressive	-	++	++	-	-
11	1y	M	NB	IVa	death	-	++	++	-	-
12	3y	F	NB	IVa	death	-	+	++	++	+
13	4y	F	NB	IVa	death	-	+++	++	+	+
14	2y	F	NB	IVb	progressive	-	++	++	+	+
15	1y	M	NB	IVa	progressive	-	+	++	-	-
16	3y	F	NB	IVa	progressive	-	+	++	-	-
NH12						++	-	++	-	-
GOTO						-	+++	++	++	-
TGW						-	++	++	++	-

GNB: ganglioneuroblastoma, NB: neuroblastoma.

Values are arbitrary units expressed as the ratio to the GAPDH mRNA expression in each sample.

PAC1RA, 5'-TCCCTTTGCTGACATTC-3';  
 GAPDHS, 5'-CGATGCTGGCGCTGAGTAC-3';  
 GAPDHA, 5'-CGTTCAGCTCAGGGATGACC-3'

For the above primers, PCR amplification was performed in a 25  $\mu$ l reaction tube. The following program was used for 30 cycles of amplification in a Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Cetus): 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C, and 1 min 72 °C. The amplified DNA fragments were electrophoresed in a 4% Nusieve GTG agarose gel (FMC Bioproducts), and were then stained with ethidium bromide.

The identity of the cDNA of PACAP and PACAP receptors was confirmed by direct sequencing after using a TA cloning.

#### 2.4. Real-time PCR

The PCR reaction mixture was prepared using a Taqman PCR master reagent kit (PE Applied Biosystems, California) according to the manufacturer's instructions. The thermal cycling protocol was 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, which was followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Thermal cycling, fluorescence detection, and data analysis were performed on the ABI PRISM 7700 Sequence Detector using the software provided with the instrument.

The sequences of synthetic oligonucleotide primers and probes were as follows:

PACAP: forward primer, CTCCGAGCCACC-GAAGTCT; reverse primer, GCCCTGCTGGTC-TATGGGATA

Double dye-labeled probe: 5'-FAM-dCGTACG-CCTCTTCTCTGGCCTGAT-3'-TMR

TH: forward primer, ATGACGTCTCCCCTTCCT; reverse primer, GGACGCGTGGCGGATATAC

Double dye-labeled probe: 5'-FAM-TCCGCGTGTC-CAGTGCAACCC-3'-TMR

For GAPDH detection, we used TaqMan GAPDH Detection Reagents (PE Applied Biosystems).

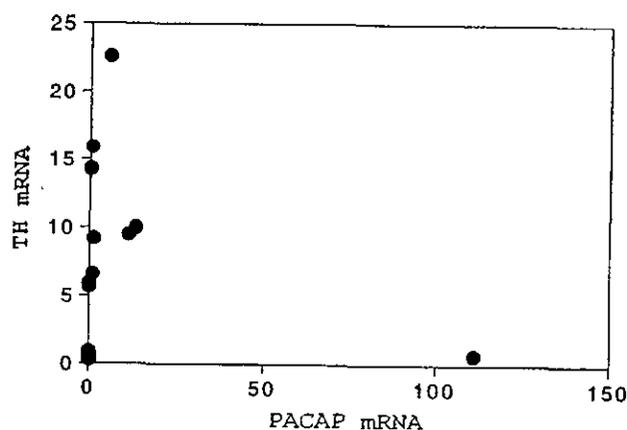


Fig. 2. The relationship between PACAP and TH mRNA expression by real-time PCR analysis. Correlation between PACAP mRNA expression and TH mRNA expression in 16 neuroblastoma tissues is shown.

#### 2.5. Statistical analysis

Correlations between the different mRNAs were determined by the Spearman's test. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

### 3. Results and discussion

The results of the RT-PCR experiments in which we examined the expression of mRNA for VIP, PACAP and their receptors in 16 neuroblastomas and 3 cell lines are shown in Fig. 1. PACAP mRNA expression was detected in all of 16 neuroblastoma tissues. VIP mRNA expression was detected in only 2 cases of 16 neuroblastoma tissues. The no. 2 case showed high expression of VIP mRNA and PACAP mRNA. The finding of Georg and Fahrenkrug [13] that PACAP stimulated VIP gene transcription in neuroblastoma cells supports the notion that PACAP may similarly induce VIP gene expression in neuroblastoma tissues. However, in 3 neuroblastoma cell lines, VIP mRNA was only detected in NH12, whereas PACAP mRNA was only

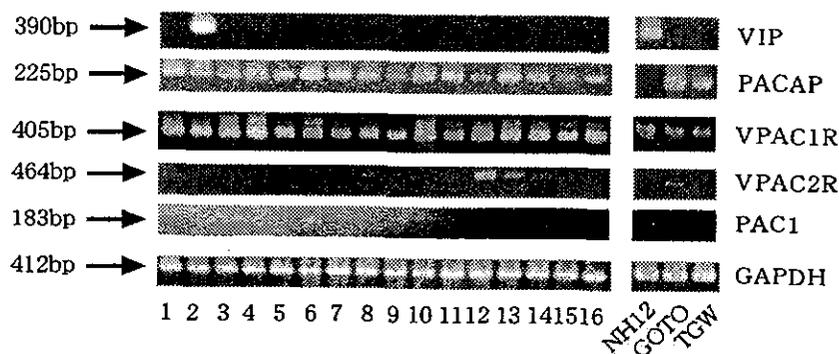


Fig. 1. RT-PCR analyses of VIP/PACAP and its receptors in neuroblastoma tissues and cell lines. VIP, PACAP, VPAC1R, VPAC2R, PAC1R and GAPDH mRNA expression was determined in neuroblastomas. Nos. 1–16 were neuroblastoma tissues corresponding to the samples in Table 1. Nos. 17–19 were neuroblastoma cell lines corresponding to NH12, GOTO and TGW, respectively.

detected in GOTO and TGW. Vetrogen et al. [5] reported that the neuroblastoma cell lines, SK-N-SH and SY-5Y only produce VIP mRNA but not PACAP mRNA. These findings suggest that PACAP may not always induce VIP gene expression in the cell lines.

There are two types of VIP receptors, i.e., VPAC1R and VPAC2R, both of which exhibit high affinity binding to VIP and PACAP. VPAC1R mRNA was detected in all of 16 tissues and 3 cell lines that were examined, while VPAC2R mRNA was detected in 5 of 16 (31%) tissue samples and 2 of 3 cell lines. At least one PACAP receptor, i.e., PAC1R, is characterized by high affinity binding to PACAP but low affinity binding to VIP. PAC1R mRNA was detected in 6 out of 16 tissues. PACAP1R mRNA expression was not detected in 3 cell lines.

In contrast, Vetrogen et al. [5] reported that 95% (21/22) of neuroblastoma tissues examined and 100% (5/5) of neuroblastoma cell lines expressed PAC1R mRNA as determined by RT-PCR using the same primers as we did. It is not immediately clear what may have accounted for these differing results.

We next examined the relationship between PACAP and TH mRNA expression by real-time PCR analysis in 16 neuroblastomas. As shown in Fig. 2, PACAP mRNA expression did not correlate with TH mRNA expression in 16 neuroblastomas. The GOTO and TGW cell lines expressed PACAP mRNA, but TH mRNA was not expressed. The NH12 cell line expressed TH mRNA but not PACAP mRNA. Waschek et al. [10] reported that PACAP may execute growth-related functions in a neuroblastoma cell line. Thus, PACAP may not be associated with expression of TH mRNA but may be involved in cell proliferation, as reported [7–10].

#### Acknowledgements

This study was supported in part by a grant from the University Research Project and Charitable Trust Clinical Pathology Research Foundation of Japan.

#### References

- [1] Miyata A, Arimura A, Dahl RR. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide, which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:567–74.

- [2] Isobe K, Nakai T, Takawa Y. Ca<sup>2+</sup>-dependent stimulatory effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on catecholamine secretion from cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology* 1993;132:1757–65.
- [3] Isobe K, Yukimasa N, Nakai T, Takawa Y. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces gene expression of the catecholamine synthesizing enzymes, tyrosine hydroxylase and dopamine beta hydroxylase, through 3,5-cyclic adenosine monophosphate- and protein kinase C-dependent mechanisms in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Neuropeptides* 1996;30:167–75.
- [4] Isobe K, Tatsuno I, Yashiro T, Nanmoku T, Takekoshi K, Kawakami Y, et al. Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and relationship to catecholamine synthesis. *Regl Peptides* 2003;110:213–7.
- [5] Vertongen P, Devalck C, Sariban E, De Laet MH, Martelli H, Paraf F, et al. Pituitary adenylate cyclase activating peptide and its receptors are expressed in human neuroblastomas. *J Cell Physiol* 1996;167:36–46.
- [6] Vertongen P, De Clerck P, Fournet JC, Martelli H, Helardot P, Devalck C, et al. Comparison between vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating peptide levels in neuroblastoma tumor tissues. *Neuropeptides* 1997;31:409–13.
- [7] Deutsch PJ, Schadlow VC, Barzilai N. 38-Aminoacid form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces process outgrowth in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 1993;35:312–20.
- [8] Hoshino M, Li M, Zheng LQ, Suzuki M, Mochizuki T, Yanaiharu N. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide: differentiation effects on human neuroblastoma NB-OK-1 cells. *Neurosci Lett* 1993;159:35–8.
- [9] Chik CL, Inukai T, Ogiwara T, Boyd H, Li B, Karpinski E, et al. Characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide38(PACAP38)-, PACAP27-, and vasoactive intestinal peptide-stimulated responses in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neurochem* 1996;67:1005–13.
- [10] Waschek JA, Diccico-Bloom EM, Lelievre V, Zhou X, Hu Z. PACAP action in nervous system development, regeneration, and neuroblastoma cell proliferation. *Ann NY Acad Sci* 2000;921:129–36.
- [11] Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castellberry RP, et al. Revision of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466–77.
- [12] Granoth R, Fridkin M, Gozes I. VIP and the potent analog, stearyl-Nle17-VIP, induce proliferation of keratinocytes. *FEBS Lett* 2000;475:78–83.
- [13] Georg B, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is an activator of vasoactive intestinal polypeptide gene transcription in human neuroblastoma cells. *Mol Brain Res* 2000;79:67–76.

# 神経芽腫の治療

かねこ みちお ひらい みさ子 筑波大学臨床医学系小児外科  
金子 道夫 平井みさ子

## 要旨

乳児期神経芽腫は良好な治療成績であることが、乳児神経芽腫全国統一プロトコールによる前方視的スタディで明らかにされ、治療による死亡や後障害をきたさないよう治療の軽減がなされた。一方、進行神経芽腫では、まず85プロトコールで進行例に有効性の高いレジメンが開発された。91プロトコールでは、N-myc増幅例で増量した初期治療で治療成績の向上が得られた。98レジメンでは、プロトコールどおりに完遂することが困難なことが少なからずあり、現在データセンターを基盤にしたきちんとした第二相臨床試験としてプロトコールが検討されている。

### Key Words

advanced neuroblastoma  
infantile neuroblastoma  
group study  
N-myc amplification  
hematopoietic stem cell transplantation

## はじめに

神経芽腫は小児固形腫瘍としてもっとも頻度が高く、予後がきわめて不良な疾患とされてきたが、1歳未満での生存例が知られ、自然退縮も観察されていた。そこで、わが国では1985年から生後6カ月でマス・スクリーニング（以下、マスと略す）が施行された。その結果、患者総数は2倍以上となったが、その中にながりの自然退縮例が観察されたこと、欧米での試験的導入の結果、マスは神経芽腫の死亡率を下げないと報告されたことから、わが国の神経芽腫マスは2004年3月で休止することになった。マス導入後の進行神経芽腫総数は当初期待されたほどには減少せず、進行例に対してはグループスタディが行われ成果をあげた。

本稿では、進行神経芽腫を中心にこれまでの成果と今後の展望を述べる。具体的な治療レジメンはすでに報告したので、それを参照されたい。

## 乳児神経芽腫および限局性神経芽腫

### 1. マス発見症例

小児がん学会神経芽腫委員会の平成15年11月の報告<sup>1)</sup>では、1976～2001年にマスで発見された神経芽腫は2,393例で、最近では毎年160

～180名が発見され、5,000～6,000人に1名の発見率であった。病期は予後良好とされるⅠ、Ⅱ、ⅣSが全体の76%を占めた。マス発見例では病期Ⅲの治療成績もよいことから良好群はほぼ95%を占める。N-myc検索を行った1,875例のうち3倍以上増幅は35例(1.9%)であった。

治療は後述するグループスタディ「1歳未満で発見された神経芽腫治療プロトコル」の結果などから、軽減化の方向に進んでいる。予後報告のあった2,113例のうち生存は2,080例(97.6%)ときわめて良好であった。しかし、死亡33例の内訳をみると腫瘍死はわずか6例で、16例が治療関連死、3例が二次がんが原因の死亡であった。また、腎機能低下や腎消失など後障害の報告もみられた。

## 2. 乳児神経芽腫の治療

当初は病期Ⅰでも化学療法が施行され、手術でリンパ節郭清が多く行われていたが、治療拒否から自然退縮が観察された症例の報告など、これまでの神経芽腫とは異なる生物学的特性が広く認識された。そこで、1994年に適正な治療を明らかにすることを目的に乳児神経芽腫全国統一プロトコルが前方視的手法で開始された。N-myc増幅のない病期Ⅰは手術のみ、Ⅱは化学療法なしと術後James (regimen A)のrandomize, 病期Ⅲの手術可能例では術後regimen AとBのrandomizeという、わが国としては画期的なrandomized clinical trial (以下、RCTと略す)を行った。スタディが終了した1998年5月までに238例の有効登録症例があり、死亡例は8例、再発した症例は9例であった。このtrialから病期Ⅰのみでなく病期Ⅱでも術後化学療法は不要との結論が得られた<sup>2)</sup>。

そこで、1998年5月からさらに治療を軽減したプロトコルにてRCTが行われている。おもなターゲットは病期Ⅲに術後化学療法が必要か否かの検討、および骨転移のない病期Ⅳの治療軽減が可能か否かの検討である。2001年6月の

集計では有効登録数195例、うちマス症例が165例であった。2例に腎消失、3例に腎萎縮がみられた。病期Ⅰ、2A、2Bの112例は全例生存中で、術後化学療法は必要ないことが再確認された。一方、病期Ⅲは21例と少数であったこと、RCTであったにもかかわらず術後化学療法ありが13例、なしが8例と症例数が異なることなど問題点が指摘された。結論は得られていないが、病期ⅢでもN-myc増幅がなければ、後療法は必要ない可能性が十分ある。

筑波大学はマスが開始された1985年以来、乳児例には腫瘍摘出とリンパ節生検のみの手術に止め、手術した37例のうち仙骨部亜鈴型の1例に骨髄再発がみられたが、現在まで全例腫瘍なく生存、腎はすべて温存され、治療合併症は、まったくみられない。

乳児期でも4A症例およびN-myc増幅症例は、後述する進行神経芽腫プロトコルで治療が行われ、月齢に応じて化学療法剤が減量される。1985年プロトコル(JANB85)、1991年プロトコル(JANB91)での治療成績を図1に示した。N-myc増幅のない病期ⅣAの5年、10年生存率が80%を超えているのは驚異的で、この群は新たな予後因子を明らかにできれば、さらに減量が可能であろう。乳児期は化学療法・手

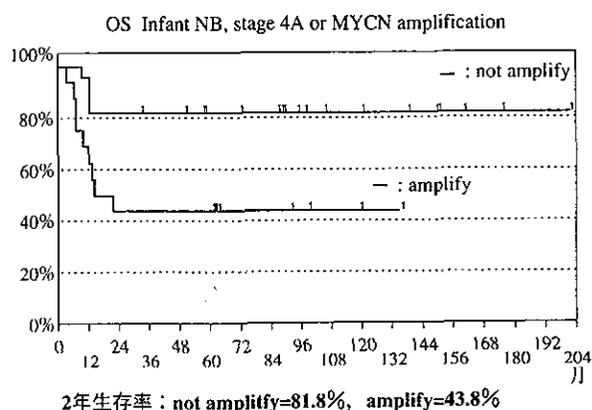


図1 N-myc増幅の有無による乳児期進行神経芽腫の治療成績

病期ⅣAにもかかわらずN-myc非増幅の神経芽腫の治療成績はきわめてよい

術とも合併症や後障害をきたしやすい患者群であり、かつ症例数が少ないので全国的な治療研究が必要である。

### 3. 限局性神経芽腫

わが国では、乳児神経芽腫と進行神経芽腫に対してグループスタディが行われているが、1歳以上の病期Ⅰ、Ⅱでは全国規模の治療研究は行われていない。小児外科学会悪性腫瘍委員会による1991～1995年治療開始症例の集計では1歳以上の病期Ⅰ、Ⅱ症例は81例、そのうち5年以上生存例は55例で治療成績は満足できない。欧米の報告の多くは、このような限局性神経芽腫は手術による摘出のみでよいという考えであるが、わが国では治療内容や治療成績はほとんど判明していない。この患者群はエアポケットに落ちたような感があり、神経芽腫全体を考えた包括的な治療研究グループの構築が必要である。

## 進行神経芽腫

進行神経芽腫に対して厚生省班研究の一環として、わが国独自の治療レジメンにより1985年から全国規模のグループスタディが施行され、その治療成績は国際的にも高く評価されている。

### 1. 85 プロトコール (JANB85) JANB: Japan Advanced Neuroblastoma Study

それまでの局所療法重視から、強い初期治療で転移巣をコントロールし、原発巣の縮小をはかるという基本方針の大きな転換を行った。初期治療は大量 cyclophosphamide と新しい薬剤である CDDP, THP-ADR を組み合わせた。この初期治療の効果はめざましく、進行神経芽腫にとどまらず、難治性の小児固形腫瘍に広く用いられた。85 プロトコールによる治療成績は、2003年 Kaneko によりほぼ final の報告として出された<sup>6)</sup>。治療成績は、1歳以上の病期Ⅲの5年 progression free 生存率がほぼ75%、病期Ⅳが同5

JANB 85 Progression-free-survival by stage

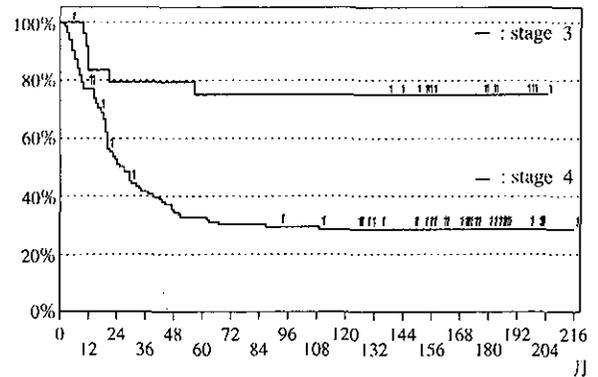


図2 85年プロトコールによる進行神経芽腫の治療成績  
病期ⅣでPFSが約30%にみられるのは画期的であった

年生存率32%、10年生存率29%であった。これは85プロトコールによる治療の開始前の治療成績に比べて飛躍的に向上した(図2)。また、当時絶対的予後不良因子とされたN-myc増幅症例にも多くの治療例がみられた<sup>4)6)</sup>。

### 2. 91 プロトコール (JANB91)

91プロトコールでは、進行症例の30%以上を占めるN-myc増幅例の治療成績改善をめざした。全例に治療開始前生検を義務づけ、第一クールは全例に91A1レジメンいわゆるnew A1を施行した。N-myc判明後、増幅症例では第二クール目からcyclophosphamideを倍量にした91A3レジメンで、その後の初期治療を行うこととした。また、N-myc増幅例に幹細胞移植を施行するコースを推奨した。N-myc非増幅例には85A1のvincristineをetoposideに変更した91A1を初期治療とすることにした。その結果、1歳以上、病期Ⅳのrelapse free survival (RFS)は85プロトコールでは治療開始後1年で56%であったのに対し、91プロトコールでは82%、3年のRFSが前者では33%に対し、後者では41%と有意に向上した(図3)。すなわち、初期治療の強化によるN-myc増幅症例の治療成績の向上がこのスタディで示された。N-myc非増幅例に対する初期治療は僅かの改変に止まったが、幹細胞移植による大量化学療法を施行される症

JANB 85 vs 91, Stage 4 N-myc amplified, RFS

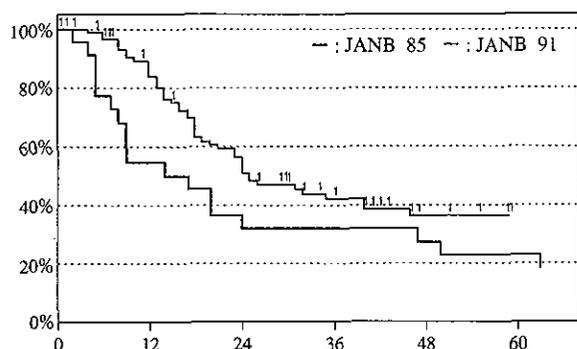


図3 初期治療強化によりN-myc増幅症例の治療成績が有意に向上した

例が増加した。しかし、治療成績は85プロトコールと91プロトコールでほとんど差がなく、初期治療の有用性が改めて示された。また、91プロトコールでN-myc増幅例と非増幅例の治療成績を比較すると、増幅例のほうがわずかに治療成績が低いものの、両者間に有意な治療成績の差はなく、少なくとも進行例でのN-myc増幅の予後因子としての有用性は小さくなった。

主として技術的側面からN-myc増幅腫瘍は「Southern法で10倍以上の増幅がみられたもの」とされた。一方、FISH法により、これまでN-mycが2～9倍とされた「非増幅例」の中に、かなり増幅例が含まれていることも判明した。そこで、85プロトコールと91プロトコールで治療された1歳以上の病期Ⅲ、Ⅳの進行例で、N-myc増幅のコピー数と治療成績を比較するとN-mycコピー数2～9倍の患児の治療成績は増幅例とほぼ同じであった。N-myc 2～9倍と報告された中間群では、FISH法や定量的PCRなどでより正確なN-mycコピー数を再確認する必要があるといえる<sup>9-7)</sup>。

91プロトコール以降幹細胞移植症例が急増したが、移植症例では移植の完遂のため、初期治療のコース数を少なくしたり、幹細胞が採取できるようにCDDPの減量やICEをはじめとするほかのregimenの挿入など、初期治療のviolationが多くなった。また、幹細胞移植に伴う合

1歳以上 stage 3,4 overall survival by MYCN 85 and 91 protocol

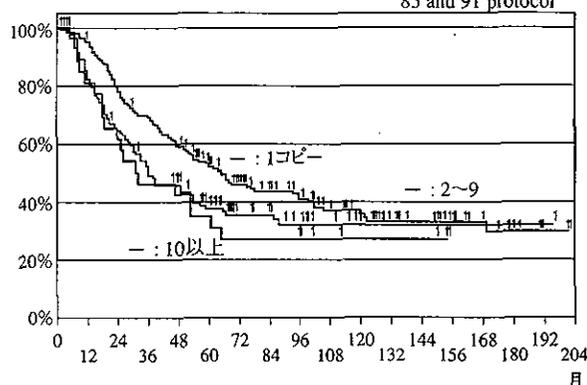


図4 これまでN-myc増幅は10コピー以上とされたがそれ以下でも治療成績は不良である

併症や、幹細胞が十分採取できず合併症の多い同種移植が施行されたる症例もみられた。そのようなことが影響して、91プロトコールではCCG3891<sup>3)</sup>のような幹細胞移植による治療成績向上を明らかにできなかった<sup>4)-10)</sup>。

### 3. 98プロトコール

91プロトコールによるグループスタディの結果をふまえて、

①N-myc増幅の有無にかかわらず、初期治療は91A3を基本にした98A3を当初から6コース施行する。

②ifosphamideの神経芽腫の初期治療における有効性と安全性を評価するためN-myc増幅例では初期治療の4コース目にifosphamideを含んだregimenを用意する。

③初期治療4コース開始時点で治療効果を判定し、それにより以後の治療を変える。

④N-myc非増幅の病期Ⅲには幹細胞移植を含んだ治療は行わない。

などを骨子とした98プロトコールが作成され、現在スタディが行われている。まだ、スタディ途中であるので、詳細な解析結果を発表できる段階にない。しかし、98プロトコールから得られた教訓を基にきちんとしたデータセンターを置いた施設限定型の第二相臨床試験を走らせるためのプロトコールを作成中である。こ

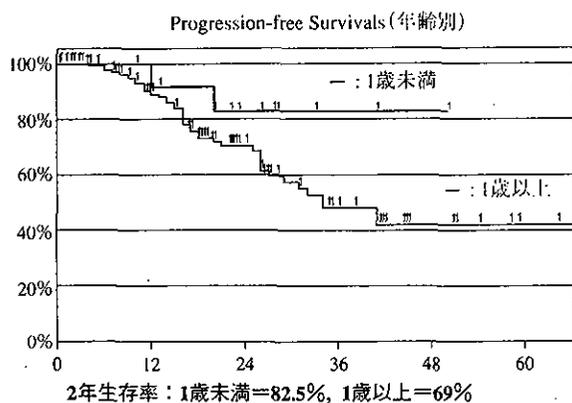


図5 98 プロトコルの2003年9月現在の治療成績  
(詳細は未発表)

ここでは、その中で基礎データとなった解析結果の一部を報告し、98 プロトコルによる進行神経芽腫治療の成果と問題点を明らかにする。

98 プロトコルで2003年9月までに登録されたのは、163例でこのうち適格例は147例であった。年齢別の progression free survival を図5に示した。病期3は17例、4が127例で、病期3の症例数が少なく、治療成績もこの時点では不良である。しかし、病期4は2年生存率70%、3年生存率は51%と満足すべき結果が得られている。再発・再燃は6カ月頃かみられ2年半の間、ほぼ一定の比率でみられた。初期治療に対する反応では(以下、2002年3月集計)記載のあった96例中、36例がCR、10例がVGPR (very good partial response)、42例がPRで著効率37.5%、奏効率は92.7%で、初期治療に対する効果としては優れたものと考えられた。ただ、第一クールで5例の非腫瘍死がみられたのがこの奏効率を悪化させた大きな原因と考えられた。5例中2例がRS肺炎、1例がアスペルギルス肺炎、ほかの2例が敗血症であった。

現在、改訂プロトコルで、1コース目の治療レジメンを検討中である。98A3は骨髄抑制、腎毒性のため4～5コース目頃からは規定の4週ごとの施行が困難になる。そのため、規定の6コースが施行されない症例があり、6コース施行が33例に対し、5コースが25例、4コースが

24例であった。副作用のためCDDPを減量したり、CBDCAに変更された症例も少なからずあり、また、副作用防止のため当初から減量変更する施設もみられた。クレアチニクリアランスでみた腎毒性は、投与回数が増えるにつれ増加した。初期治療での腎障害はそれに続く幹細胞移植による合併症にも影響を与え、total body irradiation (以下、TBIと略す)を含む前処置ではとくに注意が必要と考えられるので、現在、第一クールのレジメン、98A3の投与クール数、CDDPの投与量、期間延長の許容範囲を中心に初期治療の検討が行われている。これまで進行神経芽腫の治療はdose escalationにより治療効果をあげてきた。98A3はdose intensityが非常に高いので、治療効果も強いが副作用により多くの症例でプロトコルどおりの遂行が困難であった。できるだけ効果を犠牲にしないで、多くの症例、ほとんどの施設で遂行可能な、すなわちprotocol violationの出にくい有効なプロトコルにすべく改訂中である。91プロトコル以来、幹細胞移植に伴う合併症や移植関連死に悩まされてきた。98プロトコルでは2003年9月までに14例の移植関連死が報告されたが、そのうち3例はpreconditioning中に死亡した。移植後に死亡した11例のうち同種移植が8例を占めた。同種移植になる理由は骨髄転移などの遠隔転移の残存か、幹細胞が十分採取できないためと考えられる。これも初期治療改訂と密接な関連があり、その視点でも初期治療を再検討中である。

移植まで到達した患者の予後を見ると、病期4の症例で治療開始後2年の生存率が65%、3年以降が60%と良好である。この成績を見ると、いかに腫瘍をコントロールして幹細胞移植までもってくるか、そして幹細胞移植をいかに安全に施行するか治療成績向上に重要であるかが理解できよう。また、TBIを併用するかは意見の分れるところである。TBI以外の治療要素

が異なるので単純な比較はできないが98プロトコル患者の治療成績をTBIのあるなしで分け、現時点ではTBIの施行症例の治療成績がやや勝るものの、 $p = 0.89$ でまったく有意差はない<sup>10)</sup>。

#### 4. CPT-11の第一相臨床試験<sup>12)13)</sup>

神経芽腫をはじめとする小児の難治性固形腫瘍の治療成績向上は、これまで主として化学療法法のintensificationが行われ、成果をあげてきた。進行神経芽腫では、85プロトコルにcyclophosphamideの大量療法が取り入れられた。同時に新規の抗腫瘍薬、とくに抗腫瘍メカニズムの異なる抗腫瘍薬の開発とその臨床応用はきわめて重要である。85プロトコルではCDDPがこれにあたる。しかし、その後は従来の薬剤のderivativeは開発されたものの新規なものの開発はきわめて少ない。その中で注目されたのがCPT-11とタキソールである。筆者は神経芽腫のみならず、横紋筋肉腫やPNETなど、ほかの難治性腫瘍にもCPT-11にはきわめて有用であることをヌードマウスを用いた*in vivo*の実験で明らかにした。その臨床導入を98プロトコルの目標にしたが、新規薬剤の導入はそのころからきわめて厳格になり、小児に対して第一相試験から行うことが要求され、現時点でも第二相試験止まりで、まだ本格的な臨床応用は図られていない。第一相試験は $50 \text{ mg/m}^2$ から3日間投与4週おきの2クールで開始された。最終的には $200 \text{ mg/m}^2$ まで投与が行われ、 $180 \text{ mg/m}^2$  3日間がMTDと決定された。dose limiting toxicityは下痢と骨髄抑制であった。

一方、フランスのVassalらは3週ごとの2時間静注法で、小児でのMTDは $600 \text{ mg/m}^2$ とした。さらに、米国のFurmanらは5日間連続投与を2週施行し、1週休むというスケジュールで第一相試験を行い、MTDを $20 \text{ mg/m}^2$ とした。われわれはCPT-11を初期治療に組むべく、4週ごとの投与方法とした。薬剤の特徴から3~7日

以上の連続投与が望ましいと思われ、経口投与や持続注入したほう効果が高いとされる。現在横紋筋肉腫を対象に土田らが、小児の肉腫を対象に牧本らが、それぞれ医師主導型第二相臨床試験を開始しようとしている。

## おわりに

進行神経芽腫のスタディグループのレジメンは、わが国独自のものであり、その成績は決して欧米の結果にひけを取らない。しかし、これを胸を張って国際的に報告できるかと自問すると、データの質、プロトコル違反など現時点の国際レベルからみて、たくさんの問題が含まれている。優れた治療法による優れた治療成績として国際的な標準治療たるべく目標を掲げるならば、国際基準に基づくグループスタディが必須である。現在98プロトコルを基礎とした新たな第二相臨床試験を開始すべく金子班、牧本班が連携して作業を進めている。protocol violationなしにきちんとした臨床試験ができれば、わが国の治療成績は、新たな治療薬の導入がなくとも十分向上すると確信しており、全国の小児腫瘍医の協力に期待している。

## ●文 献

- 1) 小児がん学会神経芽腫委員会報告：平成13年度神経芽細胞腫マスの報告。2003年11月
- 2) 家原知子, 杉本 徹, 水田祥代・他：乳児神経芽腫における治療の軽減。小児外科 33 (11) : 1221-1227, 2001
- 3) Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC et al.: Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med 14:341 (16) : 1165-1173, 1999
- 4) Sawaguchi S, Kaneko M, Uchino J et al.: Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy: A report from the

- Study Group of Japan. *Cancer* 66:1879-1887, 1990
- 5) Iwafuchi M, Utsumi J, Tsuchida Y et al.: Evaluation of patients with advanced neuroblastoma more than 5 years after initiation of intensive Japanese protocol: A report of the Study Group of Japan for Advanced Neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 27 (6) : 515-520, 1996
  - 6) Kaneko M, Tsuchida Y, Uchino J et al.: Treatment results of advanced neuroblastoma with the First Japanese Study Group Protocol. *J Pediatr Hematol/Oncol* 21 (3) : 190-197, 1999
  - 7) Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H et al.: Intensified chemotherapy increases the survival rates in stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol/Oncol* 24 (11) : 613-621, 2002
  - 8) Suita S, Zaizen Y, Kaneko M et al.: What is the benefit of aggressive chemotherapy for advanced neuroblastoma with N-myc amplification?: A report from the Japanese Study Group for the treatment of advanced neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 29 (6) : 746-750, 1994
  - 9) Kawa K, Ohnuma N, Kaneko M et al.: Long-term survivors of advanced neuroblastoma with MYCN amplification: A report of 19 patients surviving disease-free for more than 66 months. *J Clin Oncol* 17 (10) : 3216-3220, 1999
  - 10) Ohnuma N, Takahashi H, Kaneko M et al.: Treatment combined with bone marrow transplantation for advanced neuroblastoma: An analysis of patients who were pretreated intensively with the protocol of the Study Group of Japan. *Med Pediatr Oncol* 24 (3) : 181-187, 1995
  - 11) 平井みさ子, 金子道夫: 98 プロトコールによる進行神経芽腫の治療成績の解析 2003. 年度第 2 回金子班班会議報告, 2003
  - 12) Mugishima H, Matsunaga T, Yagi K et al.: Phase I study of irinotecan in pediatric patients with malignant solid tumors. *J Pediatr Hematol/Oncol* 24 (2) : 94-100, 2002
  - 13) 金子道夫, 麦島秀雄, 松永正訓・他: 小児に対する CPT-11 (irinotecan) の第 1 相臨床試験. *小児外科* 33 (11) : 1166-1173, 2001

著者連絡先

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1  
筑波大学臨床医学系小児外科  
金子道夫

■ 特集 小児悪性腫瘍の治療成績はどこまで改善したか

## 日本における進行神経芽腫の治療成績

金子 道夫\* 平井 みさ子

### はじめに

小児の悪性腫瘍の治療法の多くは外国でのグループスタディの結果が優れていることから、ほぼそれを踏襲する形をとっている。それに対し進行神経芽腫は、1985年に厚生省班プロトコルとして独自の治療レジメンに基づいたグループスタディが行われ、その成績が優れていたことから、その後91プロトコルに改訂され、さらに98プロトコルとして現在に至っている。一方、米国ではChildren's Cancer Group (CCG) が85プロトコルのA1 regimenに類似した初期治療後に自家骨髄移植群と化学療法群にrandomizeし、さらに治療後に13 cis-RAの投与の有無で2度目のrandomizeを行うCCG 3891スタディを行い、自家骨髄移植+TBIと13 cis-RAの有用性を明らかにした。わが国でもこのようなきちんとしたrandomized clinical trialが遂行できるようその基盤作りを目指して、新たなプロトコル作成を施行中である。

### I. 治療成績と問題点

#### 1. 85プロトコル (JANB 85)

85プロトコルによる治療成績はこれまでにすでに数回発表し、ほぼfinalの報告が2003年Kanekoにより出された。85プロトコル治療患者の定期追跡調査は2003年10月をもって終了した。治療成績は、1歳以上の病期3の5年 progression free 生存率はほぼ75%、病期4の同5年生存率が32%、10年生存率が29%であった。これは85

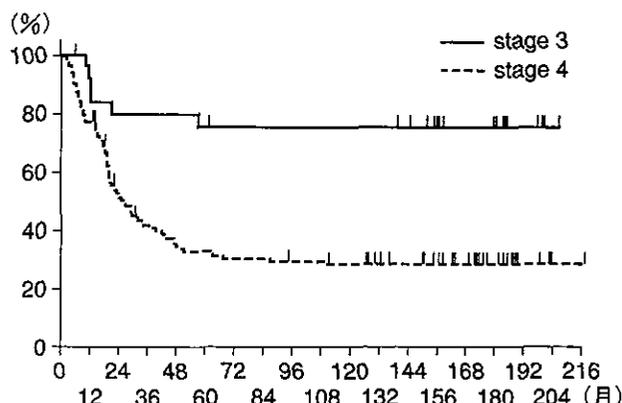


図1 85プロトコルによる病期3と病期4の治療成績

病期4は1歳未満の病期IVAと1歳以上の病期IVAおよびIVB。

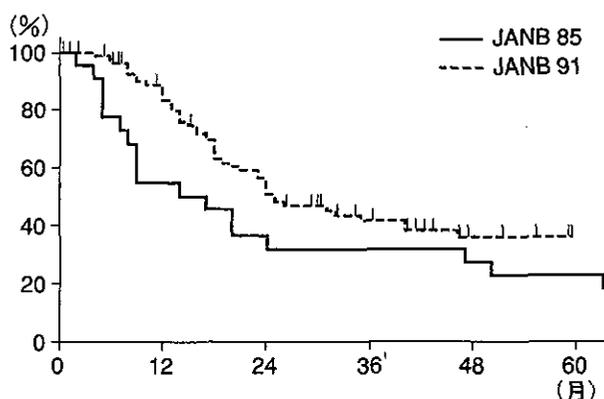


図2 85プロトコルとエンドキサンを増量した91プロトコルによるN-myc増幅のある病期4の治療成績の比較

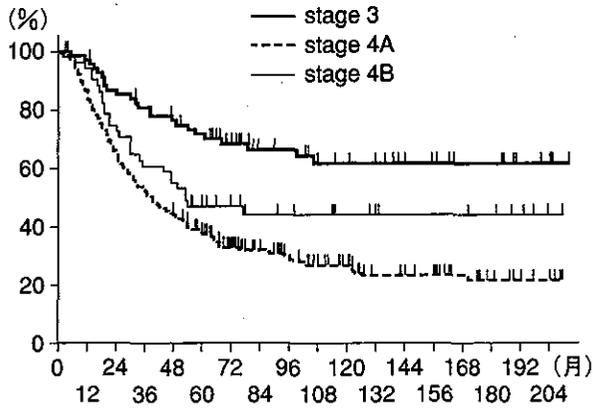
有意に91プロトコルの治療成績が良好である。

プロトコルによる治療の開始前の治療成績に比べて飛躍的によくなった(図1)。

#### 2. 91プロトコル (JANB 91) (図2)

1985年プロトコルの開始前にN-myc増幅

\* 日本進行神経芽腫スタディグループ  
筑波大学臨床医学系小児外科  
〒305-8575 つくば市天王台1-1-1)



2年生存率: stage 3=85.3%, stage 4A=65.5%  
stage 4B=72.5%

図3 91プロトコルによる1歳以上の病期別治療成績比較

日本分類の病期IVBが有意に病期IVAより治療成績がよいことは注目すべきと考えられる。

が神経芽腫の予後に密接に関連し、10倍以上のN-myc増幅症例では2年以内に全員死亡するとされた。91プロトコルでは進行症例の30%以上を占めるN-myc増幅例の治療成績改善を目指した。すなわち、進行例全例に治療開始前生検を義務づけ、N-myc増幅症例では2クール目からcyclophosphamideを倍量にした91A3レジメンを初期治療に取り入れることにした。また、この頃より多くの施設で幹細胞移植が可能となったので、N-myc増幅例では自家幹細胞移植を施行するコースが推奨された。N-myc非増幅例には85A1のvincristineをetoposideに変更した91A1、いわゆるnew A1を初期治療とすることにした。その結果、病期4のrelapse free survivalは85プロトコルでは治療開始後1年が56%であったのに対し、91プロトコルでは82%、3年のそれが85プロトコルでは33%に対し、91プロトコルでは41%と有意に向上した(図3)。すなわち、N-myc増幅が致死的であるとされたのが、85プロトコルでも長期生存例が得られたこと、それが初期治療の強化によりさらに向上したことがこのスタディで示された。一方、N-myc非増幅例では初期治療はわずかの改変に止まったが、幹細胞移植による大量化学療法を施行される症例が増加した。しかし、治療成績は85プロト

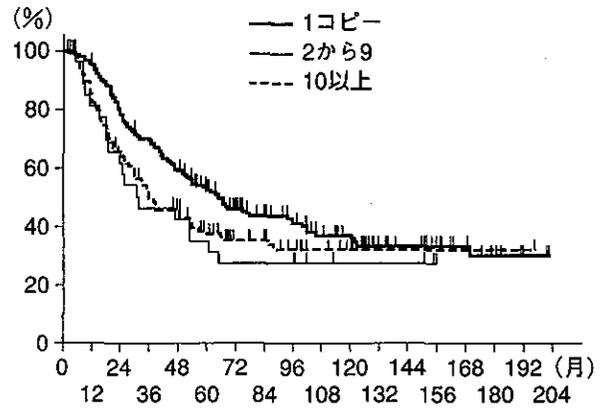


図4 N-mycコピー数による病期3, 4の治療成績比較

増幅は10倍以上とされてきたが、2~9コピーも治療成績は良くない。

コルと91プロトコルでほとんど差がなく、治療成績向上はなされなかった。さらに91プロトコルでN-myc増幅例と非増幅例の治療成績を比較すると、増幅例のほうがわずかに治療成績が低いものの、両者間に有意な治療成績の差はなくなった。

これまで、N-myc増幅腫瘍は「Southern法で10倍以上の増幅がみられたもの」というのが一般に受け入れられていた。N-myc遺伝子の発現のほうがもっと良く予後を予測できるのではないかと研究が行われたが、発現より増幅の有無が重要であることが判明した。一方、FISH法の登場により、これまでN-myc増幅2~9倍とされた「非増幅例」の中はかなり増幅例が含まれていることも判明した。最近、85プロトコルと91プロトコルで治療された1歳以上の病期3, 4の進行例でN-myc増幅のコピー数と治療成績を比較するとN-mycコピー数2~9倍と報告のあった患児の治療成績は増幅例と全く同じであった(図4)。N-myc 2~9倍と報告された中間群ではFISH法や定量的PCR等でN-mycコピー数を再確認すべきである。この群は増幅が強く疑われると言ってよい。

91プロトコル以降幹細胞移植症例が急増したが、移植症例では幹細胞採取のため、初期治療のコース数を少なくしたり、幹細胞が採取できるようにCDDPの減量や他のregimenの挿入など

初期治療の violation が多くなった。また、幹細胞移植に伴う合併症や採取できずに合併症の多い同種移植が施行されたため、91 プロトコルでは CCG 3891 のような幹細胞移植による治療成績向上を明らかにすることはできなかった。

3. 98 プロトコル

91 プロトコルによるグループスタディの結果、

1) N-myc 増幅症例に対して初期治療を dose escalation することにより、治療成績の向上が得られたこと。

2) N-myc 非増幅例では、初期治療を 91 A 1 にしても治療成績の向上が得られなかったこと。

3) 幹細胞移植による治療の導入で初期治療が軽減される傾向にあったこと。

を踏まえて、98 プロトコルでは、

① N-myc 増幅の有無にかかわらず、初期治療は 91 A 3 を基本にした 98 A 3 を当初から 6 コース施行する。

② ifosphamide の有効性と安全性を評価するため N-myc 増幅例では初期治療の 4 コース目に ifosphamide を含んだ regimen を用意する。

③ 初期治療 4 コース開始時点で治療効果を判定し、それにより以後の治療を変える。

④ N-myc 非増幅の病期 3 には幹細胞移植を含んだ治療は行わない。

などを骨子とした 98 プロトコルが作成され、現在スタディが行われている。まだ、スタディ途中であるので、詳細な解析結果を発表できる段階ではない。しかし、98 プロトコルから得られた

教訓を基に現在きちんとしたデータセンターを置いた施設限定型の第 2 相臨床試験を走らせることができるようにプロトコルを作成中である。ここでは、プロトコル改訂作業の基礎データとなった解析結果の一部を報告し、98 プロトコルによる進行神経芽腫治療の成果と問題点を明らかにする。

98 プロトコルの適格症例として 2003 年 3 月までに登録されたのは 136 例であった。病期別の progression free survival を図 5 に示した。病期 3 は 16 例、4 が 116 例で、病期 3 の症例数が少なく、その治療成績もこの時点では不良である。しかし、病期 4 は 2 年生存率 65%、3 年生存率は 51% と満足すべき結果が得られている。再発・再燃は 6 カ月頃かみられ 2 年半の間、ほぼ一定の比率でみられた。初期治療に対する反応では (2002

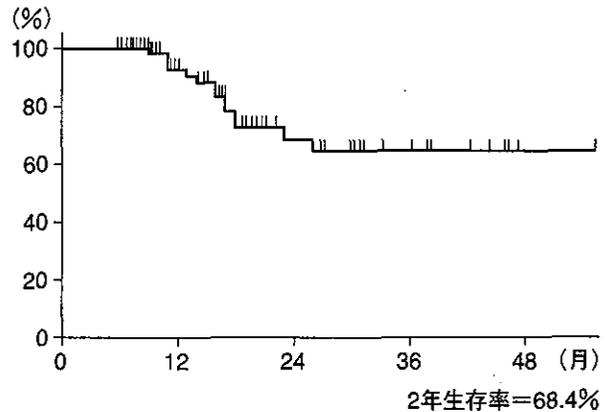


図 5 幹細胞移植を施行した病期 4 患者の治療成績  
3 年生存率で 60% を超えていることは注目に値する。

表 初期治療 (化学療法) 成績, 2002 年 3 月

	計	生存例 (適格)	腫瘍死 (脱落)	腫瘍死 (初回)	治療死	移植関連死
・CR	36	27	3	1		5
・VGPR	10	6	1	2		1
・PR	42	28	7	1	2	4
・NC	6	3			3	
・PD	1		1			
・CR → PD	0					
・PR → PD	1	1				
・記載なし	16	16				
合計	112	81	12	4	5	10

年3月集計)記載のあった96例中、36例が完全寛解、10例がVGPR(very good partial response)、42例がPRで著効率37.5%、奏効率は92.7%で、初期治療に対する効果としては優れたものと考えられた。ただ、第1クールで5例の非腫瘍死がみられたのがこの奏効率を悪化させた大きな原因と考えられた(表)。4例中2例がRS肺炎、1例がアスペルギルス肺炎、他の1例が敗血症であった。1例は生後7カ月でA1を施行、他は2歳以上で98A3が投与された。現在1コース目の治療レジメンを検討中である。

98A3は骨髄抑制、腎毒性のため5コース目からは規定の4週ごとに施行することが困難になる。そのため、6コース施行されない症例がある。6コース施行したのが33例に対し、5コースにしたものが25例、4コースが24例であった。副作用のためCDDPを減量したり、CBDCAに変更された症例も少なからずあり、また、副作用防止のため予め変更する施設もみられた。クレアチニンクリアランスでみた腎毒性は、投与回数が増えるにつれ増加した。初期治療の腎障害はそれに続く幹細胞移植による合併症にも大きな影響を与え、TBIを含む前処置ではとくに注意が必要と考えられるので、現在98A3の投与クール数、CDDPの投与量、期間延長の許容範囲を中心に初期治療の検討が行われている。これまで進行神経芽腫の治療はdose escalationにより治療効果を挙げてきたが、98A3は、dose intensityが非常に高いので、治療効果も強いが副作用により多くの症例でプロトコルどおりの遂行が困難であるのが明らかになった。そのため効果をできるだけ犠牲にしないで多くの症例に、ほとんどの施設で遂行可能な、すなわちprotocol violationを最小限にした有効なプロトコルにすべく改訂中である。

幹細胞移植に伴う合併症や移植関連死に91プロトコル以来悩まされてきた。98プロトコルではこれまで13例の移植関連死が報告されたが、そのうち3例はpreconditioning中に死亡した。移植後に死亡した10例のうち同種移植が7例を占めた。同種移植になる理由は骨髄転移などの遠隔転移の残存か、あるいは幹細胞が十分採取できないためと考えられる。これも初期治療をどうす

るかと密接な関連があり、その視点でも初期治療を再検討中である。

移植にまで到達した患者についてその予後を見ると、病期4の症例で治療開始後2年の生存率が65%、3年以降が60%と良好である。この成績をみると、いかに腫瘍をコントロールして幹細胞移植までもってくるか、そして幹細胞移植をいかに安全に施行するかが治療成績向上に重要であるかが理解できよう。98プロトコルの症例解析では幹細胞移植前の腫瘍の状態がVGPR、PRでも治療成績は良好で、むしろCRの症例よりよい程である。この点をもっと科学的に解析するには治療効果の評価をどうするかが重要であり、また何をもって腫瘍残存と判定したかの解析が重要で今後の課題である。

N-myc増幅と予後に関しては現時点でコピー数別の3群間で治療成績に全く違いは認められない。これが、N-myc増幅群に対するifosphamideを含んだDレジメンによるかどうかは今後の検討課題である。

#### おわりに

これまでの日本進行神経芽腫グループスタディの結果を報告した。その治療法は我が国独自のものであり、その成績は決して欧米の結果にひけを取らない。しかし、これを胸を張って国際的に報告できるかと自問すると、データの質、プロトコル違反など現時点の国際レベルからみて沢山の問題が含まれている。優れた治療法による優れた治療成績として国際的な標準治療たるべく目標を掲げるならば、国際基準に基づくグループスタディが必須である。現在はその好機と考えているので、データセンターの基盤のもとにきちんとした臨床試験を行わなくてはならないし、そうしなくては社会も患者様も許してはくれない時代である。

#### 文 献

- 1) Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al : Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med

- 341 (16) : 1165-1173, 1999
- 2) Sawaguchi S, Kaneko M, Uchino J, et al : Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy : A report from the Study Group of Japan. *Cancer* **66** : 1879-1887, 1990
  - 3) Iwafuchi M, Utsumi J, Tsuchida Y, et al : Evaluation of patients with advanced neuroblastoma more than 5 years after initiation of intensive Japanese protocol : A report of the Study Group of Japan for Advanced Neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* **27** (6) : 515-520, 1996
  - 4) Kaneko M, Tsuchida Y, Uchino J, et al : Treatment results of advanced neuroblastoma with the First Japanese Study Group Protocol. *J Pediatr Hematol/Oncol* **21** (3) : 190-197, 1999
  - 5) Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H, et al : Intensified chemotherapy increases the survival rates in stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol/Oncol* **24** (11) : 613-621, 2002
  - 6) Suita S, Zaizen Y, Kaneko M, et al : What is the benefit of aggressive chemotherapy for advanced neuroblastoma with N-myc amplification? : A report from the Japanese Study Group for the treatment of advanced neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* **29** (6) : 746-750, 1994
  - 7) Kawa K, Ohnuma N, Kaneko M, et al : Long-term survivors of advanced neuroblastoma with MYCN amplification : A report of 19 patients surviving disease-free for more than 66 months. *J Clin Oncol* **17** (10) : 3216-3220, 1999
  - 8) Ohnuma N, Takahashi H, Kaneko M, et al : Treatment combined with bone marrow transplantation for advanced neuroblastoma : An analysis of patients who were pretreated intensively with the protocol of the Study Group of Japan. *Med Pediatr Oncol* **24** (3) : 181-187, 1995

---

### Results of Treatment of Advanced Neuroblastoma with Japan Advanced Neuroblastoma (JANB) Protocols

MICHIO KANEKO, MISAKO HIRAI

*Department of Pediatric Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba*

**Key words** : Advanced neuroblastoma, Chemotherapy, Group study, Clinical trial, MYCN amplification.

*Jpn. J. Pediatr. Surg.*, 36(1) : 79~83, 2004.

Treatment results of advanced neuroblastoma treated with JANB protocols are described. The first study, conducted from 1985 to 1991, marked an innovative advance in the treatment of cases of advanced neuroblastoma with extremely dismal prognosis. Progression-free survival rates of patients with stage 4 neuroblastoma at 5 and 10 years after initiation of the therapy were 32% and 29%, respectively, with the JANB 85 protocol. MYCN amplified advanced neuroblastoma, which was considered uniformly fatal, became a curable disease with the JANB 91 protocol. Now treatment with 98 A 3 regimen as an induction chemotherapy followed by high-dose chemotherapy for stage 4 neuroblastoma is under way. Progression-free survival for patients with stage 4 disease who receive megatherapy rescued by stem cell transplant is approximately 60% 3 years after initiation of chemotherapy.

## 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—

### Evaluation for progressing risk of neuroblastomas with biological markers

田中 丈夫<sup>1)</sup>, 家原 知子<sup>2)</sup>, 細井 創<sup>2)</sup>, 杉本 徹<sup>2)</sup>

水田 祥代<sup>2)</sup>, 澤田 淳<sup>2)</sup>, 金子 道夫<sup>3)</sup>, 土田 嘉昭<sup>3)</sup>

Takeo TANAKA<sup>1)</sup>, Tomoko IEHARA<sup>2)</sup>, Hajime HOSOI<sup>2)</sup>, Tohru SUGIMOTO<sup>2)</sup>  
Sachiyo SUITA<sup>2)</sup>, Tadashi SAWADA<sup>2)</sup>, Michio KANEKO<sup>3)</sup>, Yoshiaki TSUCHIDA<sup>3)</sup>

#### 要 旨

臨床診断された164例の神経芽腫で「MYCN 遺伝子増幅 (MYCN 増幅) の有無」「International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) による病理所見」「Hras/trk A 両遺伝子発現 (H/t 発現)」を指標として腫瘍進展リスクを評価した。予後不良関連指標とされる「MYCN 増幅」「INPC で unfavorable histology (UH)」「H/t 低発現」のそれぞれの全予後不良例に対する感度は40%, 51%, 55%であり満足できるものではなかった。しかし上記三指標のいずれか一つを有する腫瘍を「高リスク神経芽腫」と規定すると全予後不良例の83%が捕捉できた。一方「MYCN 非増幅」で「INPC で favorable histology (FH) および「H/t 高発現」の3指標全てを満たす腫瘍症例の91%は臨床予後良好で「低リスク神経芽腫」として規定することができた。更に「診断時の腫瘍進展病期」は「高リスク神経芽腫」および「低リスク神経芽腫」の臨床転帰に影響する因子であることも確認された。

Key words : 神経芽腫, 予後指標, 予後予測, 特異性, 感度

neuroblastoma, prognostic factor, outcome prediction, specificity, sensitivity

#### 1 はじめに

1980年代に分子生物学的解析手法が臨床へ導

入され細胞の増殖分化の観点から神経芽細胞腫の多様性と腫瘍性状に関連する指標が報告されてきた<sup>1)</sup>。「MYCN 遺伝子増幅 (MYCN 増幅)」<sup>2)</sup>は悪性性状の指標として臨床で広く用いられているが、神経芽腫死亡症例の約半数にしか検出されず、腫瘍性状決定には複数因子の関与が想定されている<sup>3)</sup>。今回は生物学的指標の特異性および感度の検討と複数の生物学的指標を用いた神経芽腫の進展リスク評価を報告する。

1) 国立病院呉医療センター 小児科 臨床研究部

2) 乳児神経芽腫治療共同研究

3) 進行神経芽腫治療共同研究

1) Department of Pediatrics and Division of Clinical Research, National Hospital Kure Medical Center, Kure Hiroshima, Japan

2) Japanese infantile neuroblastoma cooperative study group

3) Japanese advanced neuroblastoma cooperative study group

## II 対象と方法

私どもは1988年の「Ha-ras 遺伝子の発現と臨床予後の関連」の報告<sup>4)</sup>以来診断時の「腫瘍進展病期」や「年齢」などの臨床指標、「MYCN 増幅の有無」「Ha-ras/trk A 両遺伝子発現 (H/t 発現)」はそれぞれが独立した予後関連因子である事を報告してきた<sup>3) 5) 6) 7)</sup>。今回はこれらの指標に「International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)<sup>8)</sup>」による所見 [Favorable Histology(FH) / Unfavorable Histology(UH)] を加え検討した。対象は臨床診断された神経芽腫 (非マス神経芽腫) 164 例で「診断時病期 (Evans 分類)」及び初回摘出組織で検討された「MYCN 増幅」、「INPC 所見」「H/t 発現」について検討した。再発症例、乳児神経芽腫マススクリーニング発見症例は今回の検討から除外した。

164 例の臨床転帰は 2 年以上の無病生存例 97 例、再発進行例および死亡例 67 例であり予後関連指標と臨床転帰の関連を後方視的に検討した。

## III 結 果

### 1. 単独指標によるリスク評価

「MYCN 増幅」は 104 症例で検討され、増幅 (10 コピー以上) 腫瘍症例 22 例中 17 例 (77%) は再発や進行あるいは死亡の予後不良症例であった。「INPC 所見」は 164 例で検討され UH であった 55 例中 34 例 (62%) が再発進行あるいは死亡例であった。「H/t 発現」は 164 例で検討され低発現腫瘍 56 例中 37 例 (66%) が再発進行あるいは死亡例であった。これら各指標と症例の臨床転帰不良との特異性 (specificity) が示されたが、それぞれの指標が検討された群での全死亡例に対する各指標陽性の割合 (感度: sensitivity) は「MYCN 増幅」が 40% (17/43)、「INPC 所見 UH」が 51% (34/67)、「H/t 低発現」が 55% (37/67) であった。即ちそれぞれの指標単独では約半数の予後不良症例しか予測できない結果であった。

### 2. 複数指標による補完的リスク予測精度向上の可能性

#### 1) 「INPC 所見」と「H/t 発現」の組み合わせ

表 1 INPC 組織所見および Ha-ras/trk A 遺伝子発現による神経芽腫性状の層別化

INPC(The Shimaa system)			
Ha-ras/trk A expression	"Favorable histology"	"Unfavorable histology"	Total
"High"	50/57 <sup>#</sup> PFS88%	6/13 PFS47%	70cases /PFS80%
"Inter-mediate"	15/24 PFS62%	7/14 PFS50%	38cases /PFS58%
"Low"	11/28 PFS39%	8/28 PFS29%	56cases /PFS34%
Total	109cases /PFS70%	55cases/ PFS38%	

<sup>#</sup> Number of Progression free survivor/subtotal number of cases in each category  
PFS: progression free survival

表 1 に「INPC 所見」及び「H/t 発現」により 164 例を 6 群に分類し、各群の progression-free survival(PFS) を評価した結果を示す。

「INPC で FH」と「H/t 高発現」で分類される症例群の PFS は 57 例中 50 例 (88%) と極めて良好な臨床予後であった。しかし「INPC が FH」であっても「H/t 低発現」腫瘍症例の PFS は 28 例中 11 例 (39%) であった。また「H/t 高発現」腫瘍も「INPC が UH」であれば、PFS は 13 例中 6 例 (46%) であり、これら二つの指標の組み合わせにより臨床転帰の差 (腫瘍性状) をより詳細に示す事ができた。ちなみに悪性性状を示す「INPC が UH」と「H/t 低発現」である腫瘍症例の PFS は 28 例中 8 例 (29%) であった。以上より「INPC 所見」および「H/t 発現」は補完的な予後予測指標である事が確認された。

#### 2) 三指標による臨床転帰予測の感度、特異性

「MYCN 増幅」「INPC 所見」「H/t 発現」の三指標が検討された腫瘍は 104 症例であり、この中で再発進行例及び死亡例の臨床予後不良例は 42 例であった。悪性性状と関連する「MYCN 増幅」「INPC で UH」「H/t 低発現」のいずれか一つを有する「高リスク神経芽腫」は 35 例であり、全臨床転帰不良 42 例の 83% を占め三指標の組み合わせにより進展リスク予測の感度が向上した。

一方、この 104 症例で「MYCN 非増幅」で「INPC が FH」および「H/t 高発現」の三指標を全て有