

■ 表紙写真の説明 ■

(写真提供・解説：国立成育医療センター研究所 所長 秦 順一)



図1 ヒト胎児(胎生6-7週)
後腎(MT)、中腎(M)およびその先端に生殖隆起(G)をみる。

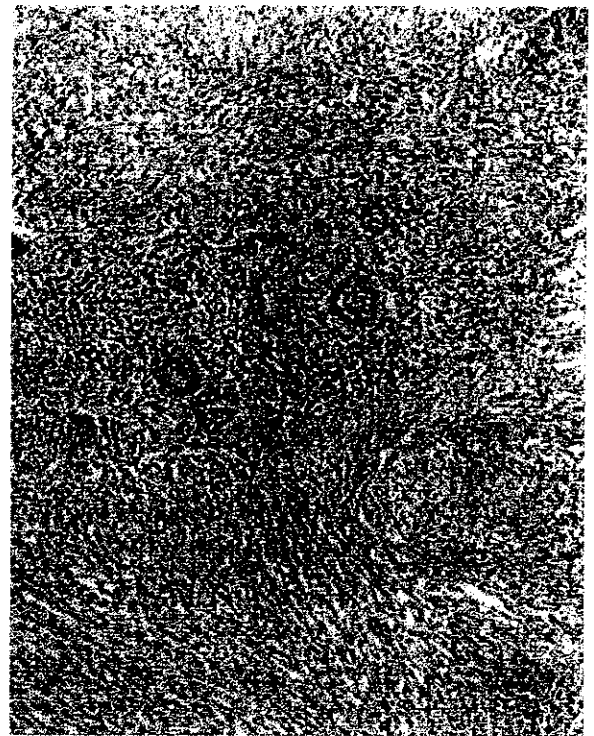


図2 WT1免疫染色
後腎組織、未熟な腎上皮細胞の核に陽性所見をみとめる。

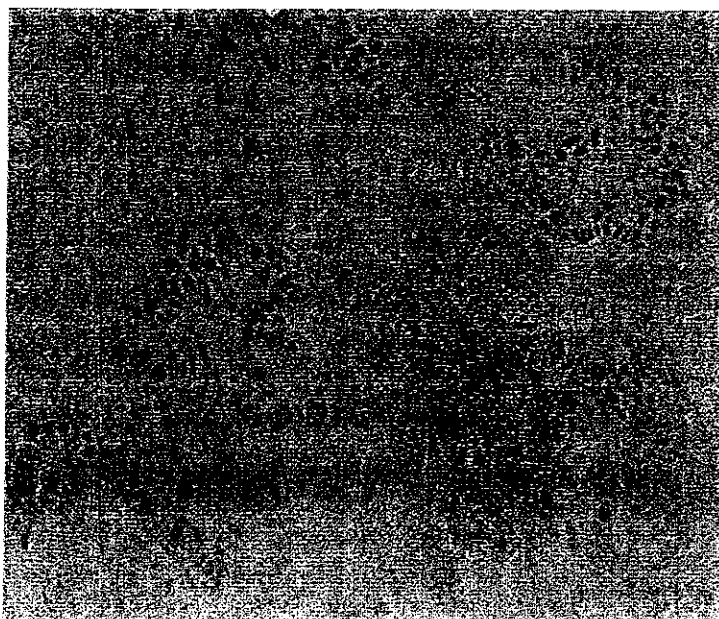


図3 ウィルムス腫瘍組織像
未熟後腎芽細胞、上皮様に分化した腫瘍細胞および間葉系成分よりなる間葉系成分は横紋筋細胞に分化を示している。

【ウイルス腫瘍と WT1 遺伝子】

Wilms' Tumor and WT1 Gene

秦 順一

Hata Jun-ichi

Key words

WT1, Denys-Drash syndrome,
Frasier Syndrome, FRN
Wilms tumor-related anomaly complex

1. WT1 遺伝子(WT1)の構造・機能および発現

先に述べたように、ウイルス腫瘍を発生する患児に形成異常(奇形)を伴うことが古くから知られていた。このような奇形は染色体異常のパターンと密接に関連している。11p13 領域の欠失を伴う奇形として無虹彩症, 尿道下裂, WAGR 症候群, Drash 症候群があり, 同領域にウイルス腫瘍の発生と器官形成に関わる遺伝子の存在が想定されてきた。1990年にはほぼ同時に2つのグループより11p13 領域からウイルス腫瘍の発生に関連する WT1 と命名された遺伝子が単離された^{1,2)}。WT1 は全長約50kb で10個のエクソンからなり, mRNA の大きさは3.5kb である。エクソン5 とエクソン9 の2カ所に alternative splice の部位があり, 4種の splicing variants が存在する。WT1 のNH側は glutamine-proline-glycine rich 構造で, COOH側の4個のエクソンはそれぞれ(Cys)₂-(His)₂ zinc finger 構造を持つ(図1)。同部はDNAの特定の配列(-GCGGGGGCG-)に結合することが証明され, 転写調節因子であることが判明した。実際に EGR-1, IGF-2, IGF-2 receptor, PDGF, Pax-2 などの発現を転写レベルで調節し, 分化を促進させる機能をもつことが明らかにされた³⁾。一方, WT1 蛋白は胎児期では腎糸球体の原基である後腎芽細胞の糸球体性上皮に分化する細胞限局に発現していることが *in situ* hybridization や抗体を用いた免疫組織学的検索で証明された。また, 精巣, 卵巣の間質細胞の原基である生殖隆起, 中皮細胞, 脾臓, 中枢神経などにも時期特異的に発現している。成人では糸球体上皮, 精巣の Sertoli 細胞お

よび卵巣の濾胞細胞に発現している⁴⁾。Keridberg らによって行われた WT1 のターゲッティングによって, 本遺伝子の個体レベルでの機能が明らかにされた⁵⁾。すなわち, 同遺伝子が欠失した胎仔は後腎芽細胞にアポトーシスが生じ, その結果腎組織は形成されなかった。また, 生殖器の分化に重要な Sertoli 細胞や卵巣の濾胞細胞の原基である生殖隆起の萎縮が生じていたという。このような実験結果から, WT1 が腎形成のほか, 生殖器の形成に重要な機能を有することが判明した。

2. WT1 異常とウイルス腫瘍発生のメカニズム

散発性ウイルス腫瘍での WT1 変異の頻度は15%程度といわれている。われわれは97例の散発性ウイルス腫瘍の解析の結果, サザン解析で5例, PCR産物の塩基配列決定で15例に異常を認めた。微小変異の範囲はエクソン1-10, 殆んど全てのエクソンにわたっているが, 多くは zinc finger domain の変異であり, エクソン8, 9のナンセンス変異を伴った点突然変異のほか数10塩基対の重複や欠失例の報告を含めて, 後述する奇形症候群を伴うものよりも多彩であった。変異を有する症例の組織像はFRNを含めたウイルス腫瘍で15例中9例に葉内腎芽腫症を伴っていた。しかしながら, 散発性ウイルス腫瘍における WT1 変異と腫瘍発生機序の詳細はいまだ明確にされていない。同遺伝子の変異がウイルス腫瘍の発生に必ずしも十分条件でない可能性も指摘されている⁶⁾。腫瘍の発生には異常のほ

国立成育医療センター研究所: National Research Institute for Child Health and Development
〒154-8567 世田谷区太子堂3-35-31 Fax: 03-3414-3100 E-mail: jhata@nch.go.jp

か、11p15に主座を有す imprinting 遺伝子 *H19*, *IGF2* などとの関連についても解析する必要がある。

3. *WT1*異常とウィルムス腫瘍の組織像

*WT1*が腎発生→成熟に重要な機能を有することが判明し、その異常がウィルムス腫瘍の発生に関連していることが明らかになったが、*WT1*の機能消失が組織型にどのように反映しているのかについては不明な点が多い。Schumacherらはウィルムス腫瘍の中で、生殖系列(germline)において*WT1*変異があるものは間葉成分優位な組織型を示す傾向があると報告している⁷⁾。また、Miyagawaらは*WT1*の機能喪失によって、ウィルムス腫瘍における異所性の筋発生が生じ、本遺伝子の正常な発現は、腎臓の後腎-間葉系幹細胞の骨格筋への分化を妨げると推測している⁸⁾。このような報告を基に、われわれはウィルムス腫瘍のうち、腫瘍組織に横紋筋細胞を多く含む胎児性横紋筋腫様腎芽腫(fetal rhabdomyomatous nephroblastoma, FRN)または腫瘍の間葉成分として横紋筋成分が腫瘍の約1/4を占める組織型を示した5症例の腫瘍組織で*WT1*変異を検索した結果、いずれもエクソン9における¹¹⁶⁸C→Tの変異となり、結果として³⁹⁰Argがstop codon(R360x)になるナンセンス

変異を認めた。しかもこれらは1例を除いて全て、両側性の腫瘍であった。また、このような両側性発生の患児ではgermlineで、腫瘍に認められた変異と同一の変異を認めた(表)。これら4症例の身体的特徴を詳細に検索すると、驚くべきことに4例中3例が男児で、停留精巣および尿道下裂を伴い、1例の女児でも卵巢低形成の生殖泌尿器系の小奇形を合併していた。*WT1*の特定部位のgermline変異(¹¹⁶⁸C→T)は同遺伝子の機能喪失を招来し、生殖泌尿器系の小奇形とともに、極めて特異的な組織像を示すウィルムス腫瘍を発生せしめる可能性が示唆される⁹⁾。このR390Xによりtruncateされた蛋白はDNA結合に必要なzing finger領域の最後の部分が失われ、その標的遺伝子に結合できなくなるということが証明されている。Huffらは*WT1*変異の結果生ずるtruncateされた蛋白は非機能性であり、正常の*WT1*蛋白の量が減少するというdose effectによって泌尿生殖器系の奇形が惹起されると推論している¹⁰⁾。

4. ウィルムス腫瘍・奇形症候群における*WT1*異常

散発性ウィルムス腫瘍は異なり、Drash症候群では*WT1*変異が責任遺伝子であることが明らかにされた。本症候群はウィルムス腫瘍の発生と乳児期に

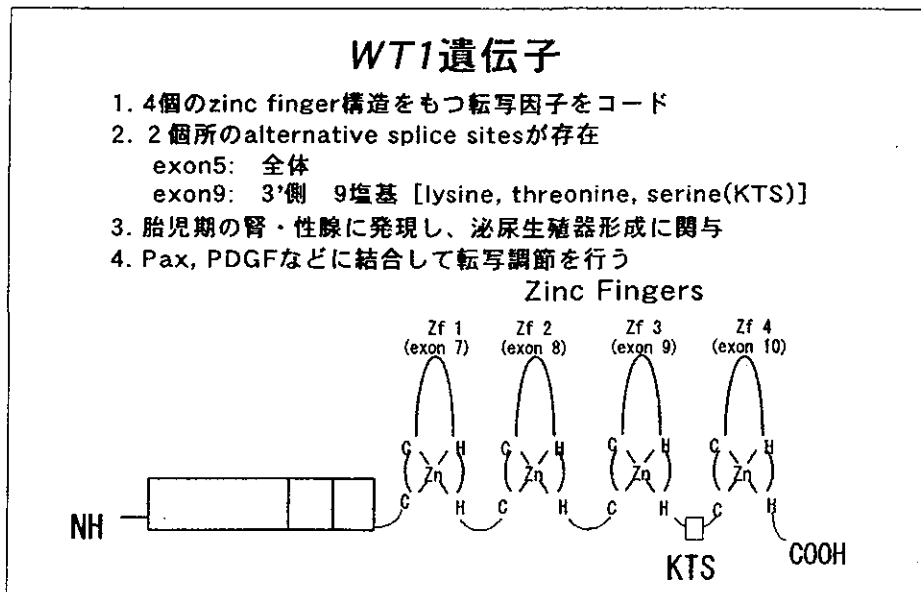


図1 *WT1*の構造
 エクソン7-10はzinc finger domainをコードしている

発症し、進行性に経過する diffuse mesangial sclerosis による腎不全および46XYの核型を示しながら女性型外性器を伴う、いわゆるXY gonadal dysgenesisから構成される¹³⁾。外性器の異常は生殖隆起の間質細胞に発現するWT1の機能不全によると考えられている。すなわち、間質細胞から分化するSertoli細胞由来のMuller管退縮因子の機能不全のため、卵巣、卵管ないし付属器様の構造が遺残するとともに女性外性器様を示し、男性化の不全（精巢性女性化症候群, testicular feminization, XY female）が生じる。Drash症候群ではWT1のzinc finger domainの点突然変異が体細胞レベルで一方の対立遺伝子に生じるとドミナントネガティブ効果で腎障害・性分化の異常を、さらに腎で両方の対立遺伝子に生じるとウィルムス腫瘍を発生し、同症候群を惹き起こすという仮説がPelletierによって提唱された¹⁴⁾。Drash症候群では報告例も含めほぼ100%、zinc finger領域の点突然変異が認められる。一方、興味深いのは同症候群に類似したFrasier症候群（晩発性の腎障害、精巢性女性化症候群、ウィルムス腫瘍発生なし）¹⁵⁾では、イントロン9のsplicing donor sitesに点突然変異を示すことが明らかにされた。エクソン9はWT1のalternative splicing siteの1カ所で、splicing isoformとして9塩基対で構成される3つのアミンの酸

lysine, threonine, serine (KTSと略)が存在するisoform(+KTS)とそれらを含まないisoform(-KTS)が構成される。Splicing donor sitesに点突然変異が生じると+KTS isoformが形成されない。その結果、正常のアリルからは+KTS/-KTSが正常に構成されるのに対して、異常を持つ対立遺伝子からは-KTSしか生じない。そのため、+KTS/-KTSの不均衡が生じることになる。すなわち、Frasier症候群がWT1 isoformの均衡の異常が原因である可能性が示唆される¹⁴⁾。Drash症候群は本来、病態の詳細な観察で規定された症候群であり、WT1が発見されたことによって、その変異による遺伝子病であることが新たに判明した疾患である。また、Drash症候群に類似した疾患として報告されてきたFrasier症候群においてもWT1 splicing isoformの不均衡が病因と深く関わっている疾患であることが明らかになった。エクソン7-10における質の異なる遺伝子異常によって異なった症候群が生じるが判明した(genotype-phenotype correlation) (図2)。このようなWT1変異の同定は難治性腎障害の予後や、Drash症候群では、6歳以上になると80%以上の確率でウィルムス腫瘍が発生するといわれているので、腫瘍発生の予測診断としても有用である。

表 横紋筋成分を多量に含むウィルムス腫瘍の遺伝子型と表現型

症例	年齢性	組織型	腫瘍	WT1遺伝子変異 生殖系列	WT1遺伝子変異 腫瘍	泌尿生殖器系の 奇形
1	7m/F	FRN	両側	¹¹⁶ C→C/T	¹¹⁶ C→T(R390X) ROH	左卵巣発育不全
2	9m/M	腎芽型 横紋筋成分有り	両側	¹¹⁶ C→C/T	¹¹⁶ C→T(R390X) ROH	停留睾丸 尿道下裂
3	11m/M	FRN	両側	¹¹⁶ C→C/T	¹¹⁶ C→T(R390X) ROH	停留睾丸
4	1y/M	腎芽型 横紋筋成分有り	両側	¹¹⁶ C→C/T	¹¹⁶ C→T(R390X) LOH	停留睾丸
5	1y/M	FRN	片側	(-)	¹¹⁶ C→T(R390X) LOH	(-)

FRN:fetal rhabdomyomatous nephroblastoma

LOH:loss of heterozygosity

ROH:retention of heterozygosity

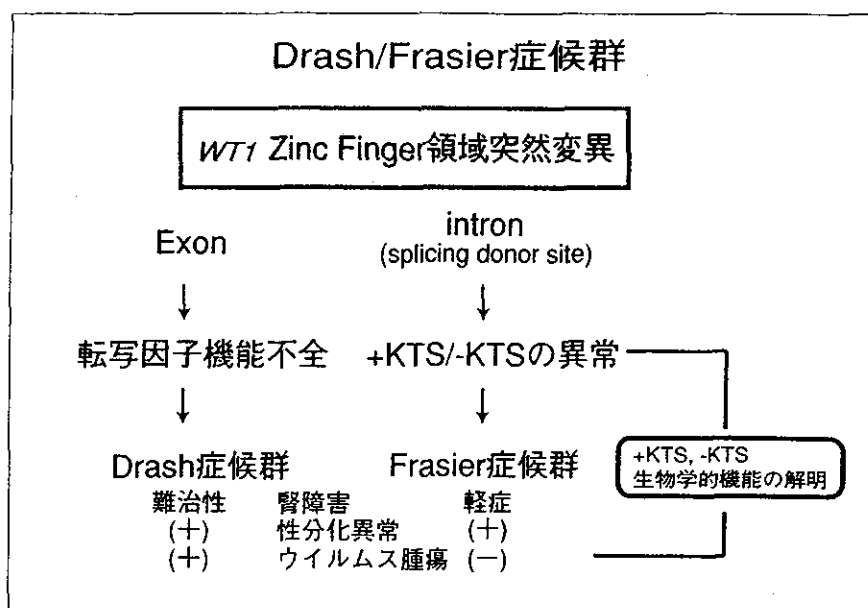


図2 Drash/Frasier症候群の遺伝子型と表現型の対比

おわりに

典型的な胎児性腫瘍であるウィルムス腫瘍とWT1について、最近の話題を含めて概説した。従来、先天性形成異常と腫瘍とは病理総論的にもかけ離れた疾患と考えられてきた、しかしながら、本項で示したように同じ遺伝子の変異が奇形と腫瘍化を惹起することが判明し、器官形成過程での異常が腫瘍化に密接に関与していることが理解できるようになった。WT1の生殖泌尿器系形成とその異常発生における機能については、個体における器官形成レベルでの研究成果がさらに蓄積されることが期待される。また、その腫瘍発生の意義については、さらに詳細に検討をすすめる必要がある。

文献

- 1) Call KM, Glaze T, Ito CY, et al.: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 60: 509, 1990.
- 2) Gessler M, Poustka A, Cavence W, et al.: Homozygous deletion of Wilms' tumors of a zinc finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*. 343: 774, 1990.
- 3) Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, et al.: Repression of the insulin-like growth factor II gene are associated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Science*. 257: 674, 1992.
- 4) Pritchard-Jones K, Flemming S, Davidson D, et al.: The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary

- development. *Nature*. 346: 194, 1990.
- 5) Keridberg JA, Sariola H, Loring JM, et al.: WT1 required for early kidney development. *Cell*. 74: 679, 1993.
- 6) Kikuchi H, Akasaka Y, Hata J, et al.: A critical mutation in both WT1 alleles is not sufficient to cause Wilms' tumor. *FEBS Lett*. 360: 16-28, 1995.
- 7) Schumacher V, et al.: Correlation of germline mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 3972-3977, 1997.
- 8) Miyagawa K, et al.: Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms' tumour. *Nat Genet*. 18: 15-17, 1998.
- 9) Shibata R, Hata J.: Correlation between a specific Wilms' tumour suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms' tumour (WT). *J Med Genet*. 39: E83-85, 2002.
- 10) Huff V: Genotype/phenotype correlations in Wilms' tumor. *Med Pediatr Oncol*. 27: 408-414, 1996.
- 11) Drash A, Sherman F, Hartman WH, Blizzard RM.: A syndrome of pseudohermaphroditism, nephritis, Wilms' tumor, hypertension and degenerative renal disease *J Pediatr*. 76: 585, 1970.
- 12) Pelletier J, Bruening W, Bardeesy N, Silberman BL, et al.: Germ line mutations in the Wilms' tumor suppressor genes are associated with abnormal urogenital development in Dynes-Drash syndrome. *Cell*. 67: 437, 1991.
- 13) Moorthy AV, Chesney RW, Lubinsky M, et al.: Chronic renal failure and XY gonadal dysgenesis: "Frasier syndrome" - a commentary on reported cases. *Am J Med Genet Suppl*. 3: 297-302, 1987.
- 14) Kikuchi H, Takata A, Hata J.: Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome? *J Med Gnet*. 35: 45-48, 1998.

4. 小児腫瘍

大喜多 肇*1 秦 順一*2

はじめに

小児腫瘍は頻度が少ないうえ、多彩な種類があるため一般病理医にとって、確定診断に困難を感じるものが少なくない。一方、最近小児腫瘍における分子遺伝学的な研究が進み、発症機序がかなり明確になってきた。同時に、これらの知見から腫瘍の確定診断や予後の推定を含む病態診断を客観的に行える指標が確立され、日常的に応用されている。本稿では、小児の固形腫瘍を中心に診断や治療方針の決定に有用な分子遺伝学的所見を取り上げる。

I. 神経芽腫群腫瘍

1. 病理学的特徴

神経芽腫群腫瘍は、神経堤に由来し交感神経節細胞に分化成熟する途上で腫瘍化したものである。典型的な胎児性腫瘍(発生母地が胎児性組織で乳幼児に好発する腫瘍を指す)の代表的な腫瘍である。病理学的に、大きく神経芽腫、神経節芽腫、神経節腫の3群に分類される。本腫瘍群には自然に分化・成熟し、退縮する予後の良好な腫瘍と同時に、進行性で予後不良な腫瘍が含まれている。したがって、予後良好な腫瘍と不良なそれを客観的指標で鑑別することは治療の選択にもきわめて重要である。そのために、予後を確定できる組織分類と分子遺伝学的解析が必須となる¹⁾。

神経芽腫群腫瘍の組織学的分類は、小児腫瘍組織分類図譜第3篇の分類が用いられてきた。一方、神経芽腫の治療法の改善や生物学的特性の解明を国際規模で行うことを目的に、本腫瘍の共通言語となる組織分類を策定する作業が開始され、その成果として1999年に、International Neuroblastoma Pathology Classi-

fication(以下、INPC分類)が発表された。本分類は、神経芽細胞の分化・成熟度とシュワン様細胞からなる間質の多寡により組織亜型を決定し、発症年齢および細胞増殖の指標としての mitosis karyorrhexis-index (MKI)を加味した予後判定基準として導入している。本分類は、Shimada分類に準じているが組織亜型の定義を明確にした点病理学的にも取り入れやすくなっている。すでに、米国、カナダ、オーストラリアで取り入れられており、近々ヨーロッパ諸国でも使用される。我が国においても、近々出版される小児腫瘍組織アトラス(旧小児腫瘍組織分類図譜)で詳細に紹介され、病理学的診断に用いられることになる。ここでは、INPC分類に加えて本腫瘍の病態の指標となる分子遺伝学的指標を取り上げる。

2. 分子遺伝学的所見

a. 染色体倍数(ploidy)

神経芽腫群腫瘍では、染色体倍数がその予後因子に重要であることが明らかになった。すなわち、2倍体や4倍体に近い腫瘍は、後述するMYCNの増幅や第1染色体短腕(1p)の欠失を伴い、1歳以上の症例に多く、予後も悪い。一方、3倍体に近い腫瘍は、1歳未満で、MYCNの増幅はみられない。これらは予後が良好であるとされている。染色体倍数は染色体の解析で明らかになるが、新鮮材料が必要なことに加え、間期核を得られないと解析できないため制約も多い。フローサイトメトリーによってDNA量を測定し、染色体倍数を推定することができるが、この方法はパラフィン包埋材料から行うことも可能で、ルーチン検査として実施可能な施設も多いと思われる。

b. MYCNの増幅

神経芽腫細胞を染色体分析すると、第2染色体のhomogenously staining regions(HSR, G band法で薄く均一に染まる染色体領域)やdouble minute chromatin bodies(DMs, 多数の微小な染色体断片)が認められることが知られている。これらの領域には、高度に増幅したMYCN遺伝子が存在する。本遺伝子は転写因子をコードする癌遺伝子で、第2染色体短腕(2p24)に存在する。症例の中にはMYCNが数十

*1国立成育医療センター研究所発生・分化研究部

*2国立成育医療センター研究所

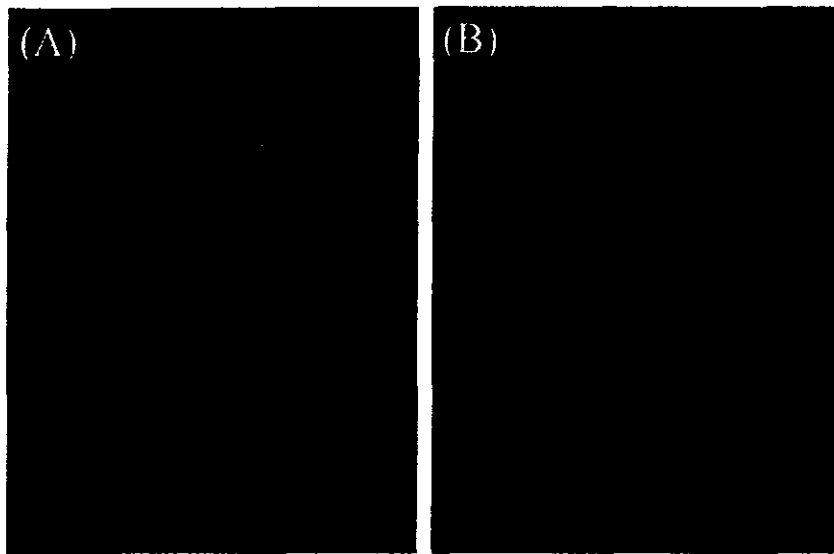


図1 FISH法によるMYCN増幅の解析
赤はMYCN遺伝子を、緑は、第2染色体短腕テロメアプローブを示す。緑のシグナルと赤のシグナルの比によって増幅の有無を判定する。A: MYCN非増幅症例(腫瘍塗印)、B: MYCN増幅神経芽腫細胞(国立成育医療センター、松岡健太郎博士による)。

から数百コピーまで増幅し、その結果、mRNAや蛋白も増加するものもある。MYCNが増幅する症例は、進行例に多い。したがってMYCN増幅は、予後不良因子である。遺伝子コピー数が10以上では、予後不良であるとされている。しかしながら、MYCNの増幅が神経芽腫の進展に直接的にどのように関連するか、今のところ不明である。MYCN蛋白過剰発現が細胞周期や細胞増殖を促進するという報告もある。

MYCNの増幅は、FISHあるいはサザンプロット法によって検出することができる。FISHによるMYCN増幅検出は正確な定量には欠ける面があるが、腫瘍成分(または細胞)ごとにまたは少量の腫瘍組織でも行うことが可能である点有用である。また、凍結標本だけでなく、touch smearあるいはパラフィン包埋標本も利用できることも有利である(図1)。一方、サザンプロット法では、凍結腫瘍組織が必要であるが、MYCNの増幅を定量することが可能である。

c. 1p36を中心とする第1染色体短腕の欠失

1pの欠失は、25~35%の神経芽腫にみられ、1歳以上の症例やMYCN増幅例に多い。このように、1p欠失は予後不良因子であることが示唆されているが、独立した予後因子かどうかは議論が多い。1pのなかで最も共通して欠損している領域は1p36であり、この領域に神経芽腫の進展に関わる癌抑制遺伝子が存在すると推測されている。また、第17染色体長腕の獲得は、予後不良例に多いと報告されているが、予後因子としての価値はさらに詳細な検討が必要である。

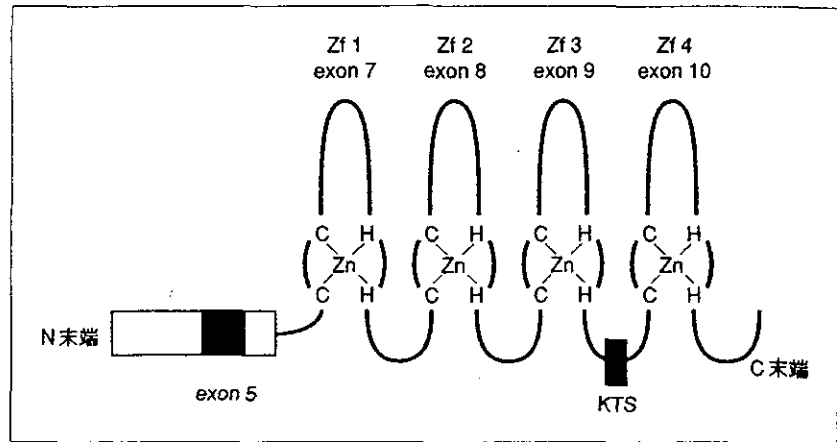
d. TrkAの発現

神経栄養因子の高親和性受容体であるTrkA遺伝子は、未熟な神経堤細胞から正常な交感神経節細胞への分化を促進すると考えられている。本腫瘍の予後因子に発症年齢との関連が重要であることは既述したが、年齢が1歳未満の腫瘍であれば、その時点で未分化な腫瘍でもTrkAが発現している腫瘍は分化、成熟が期待できる。一般に予後良好な神経芽腫では、高い発現を示すが、予後不良例では、発現が消失している。予後因子としての価値はMYCNや1p欠失よりも低い。



小児腎腫瘍の中には古典的なウィルムス腫瘍の他、肉腫型腫瘍である腎明細胞肉腫 clear cell sarcoma of the kidney (CCSK)、腎ラブドイド腫瘍 malignant rhabdoid tumor (MRTK)、先天性間葉芽腎腫 congenital mesoblastic nephroma (CMN)等が含まれる。これらの腫瘍は組織像が類似している腫瘍が多い。予後がまったく異なる腫瘍が含まれており、正確な鑑別診断がきわめて重要である。その診断確定に遺伝子解析が有用である。

図2 *WT1* 遺伝子の構造 *WT1* 遺伝子は、C末端側に4個の zinc finger 構造を有する転写因子である。エクソン5とエクソン9の3'側の9塩基の有無による splicing isoform が存在する。エクソン9の splicing isoform は、9塩基に由来する3アミノ酸(lysine, threonine, serine)の略をとって、それぞれ、+KTS, -KTSとよばれる。



1. ウィルムス腫瘍

a. 病理学的特徴

ウィルムス腫瘍は、典型的な胎児性腫瘍で小児期に発症する悪性腎腫瘍の中で最も頻度が高い。小児固形腫瘍の約8%を占め、1~3歳に好発する。本腫瘍は、腎の原基である後腎芽組織由来と考えられ、腫瘍組織は未熟な腎芽細胞と上皮系細胞成分、間葉系細胞成分が種々の割合で混在する。間葉系成分には、横紋筋、平滑筋、骨軟骨、脂肪等が含まれる。その中でも、特に横紋筋の豊富な腫瘍は、胎児性横紋筋腫型腎芽腫 fetal rhabdomyomatous nephroblastoma (以下FRN)とよばれている。

b. 分子遺伝学的所見

1) ウィルムス腫瘍と *WT1* 遺伝子

ウィルムス腫瘍で特筆すべきことは、単発の奇形または奇形症候群を伴うことである。また、しばしば家族内発症も多く報告されている。このような所見から、その腫瘍発生に遺伝的要因が強く関連していることが想定されてきた²⁾。腎芽腫を伴う奇形として11p13領域の欠失を伴う無虹彩症、尿道下裂がある。また、奇形症候群としてWAGR症候群 [ウィルムス腫瘍, aniridia (無虹彩症), genitourinary malformation (泌尿生殖器奇形), mental retardation (精神発達遅滞) syndrome], Denys-Drash症候群 (以下, Drash症候群), Beckwith-Wiedemann症候群が知られている。無虹彩症やWAGR症候群では、11p13領域が欠失している。この領域から癌抑制遺伝子である *WT1* 遺伝子が単離された。本遺伝子は、10のエクソンからなり、mRNAは約3.5 kbである。エクソン5とエクソン9の2カ所の alternative splicing があり、エクソン9の splicing isoform として3個のア

ミノ酸 lysine, threonine, serine (KTS) を含む isoform (+KTS) と含まない isoform (-KTS) ができる (図2)。*WT1* 産物は、C末端側に (Cys)₂-(His)₂ zinc finger 構造を有し、転写因子と考えられる。*WT1* は、EGR-1, IGF-2, PDGF, Pax-2等の発現を調節し、泌尿生殖器系の分化、成熟を制御すると考えられる。

奇形を伴わない散発性ウィルムス腫瘍では、*WT1* 変異の頻度は15%程度であるが、変異は広範囲の欠失から点突然変異までさまざま、その範囲はすべてのエクソンに及んでいる。間葉系成分が優位な組織型を示す腫瘍や両側性の腫瘍は *WT1* 変異を示すものが多い。我々の検討では、*WT1* のエクソン9の1168番目のCがTとなり、その結果390番目のアルギニンが stop codon になる変異を有する腫瘍は、いずれもFRNあるいは横紋筋成分の多い腎芽腫であり、特定の変異と横紋筋成分が多いという組織学的特徴に相関が認められた³⁾。この変異によって生じる蛋白質は、最後の zinc finger が欠損しており、標的遺伝子に結合できなくなると考えられる。この変異が腫瘍だけでなく生殖系列においても認められた症例では、尿道下裂、停留精巣等の泌尿生殖器の小奇形を伴っており *WT1* の機能喪失により泌尿生殖器奇形が発症することが示唆される。

2) Denys-Drash症候群と Frasier症候群

Drash症候群は、1970年にDrashらによって提唱されたウィルムス腫瘍、乳児期に発症する進行性の diffuse mesangial sclerosis による腎不全、性分化異常からなる症候群である。*WT1* のクローニングにより本症候群が *WT1* エクソン7~10の zinc finger 領域の点突然変異による遺伝子病であることが明らかに

なった。一方、Frasier 症候群は、Drash 症候群と類似しているが独立しウィルムス腫瘍は合併しない。我々は、本症候群が *WT1* イントロン 9 の特定の部位に点突然変異が存在することによりエクソン 9 の splicing が異常となり、+KTS 産物が生じないことにより惹起されることを明らかにした⁴⁾。すなわち、正常アレルからは、+KTS/-KTS 産物が正常に産生されるのに対して、変異アレルからは-KTS 産物しか生じず、+KTS と -KTS の産物の量の不均衡が生じることになる。このように Frasier 症候群は splicing isoform の不均衡によって生じる疾患であることが明らかとなった。なお、-KTS 産物は、主に転写因子として作用し、+KTS 産物は、post transcriptional regulation をつかさどると考えられている。すなわち、Drash 症候群は Frasier 症候群に近似した症状を呈するが、遺伝子レベルでは異なった異常によって生じることが明らかとなった (phenotype-genotype correlation)。両症候群ともまれな疾患であるが、*WT1* の変異を明らかにすることによって、腎障害の予後やウィルムス腫瘍発生を予知できる。ウィルムス腫瘍やこれらの奇形症候群の解析により、*WT1* が腫瘍発生とともに正常の器官形成にも深く関連していることが明らかになりつつある。

3) ウィルムス腫瘍と 11p15 領域

散発性ウィルムス腫瘍では、*WT1* 変異が必ずしも腎芽腫発生の十分条件でないことから、他の要因による腫瘍発生が想定されてきた。一部のウィルムス腫瘍では、第 11 染色体の欠失が 11p15 に限局していることから、11p15 領域が責任遺伝子の第 2 の候補となった。同領域には、*H19* や *IGF2* をはじめとし、インプリンティングによって片親由来のアレルのみが発現する遺伝子群が存在する。確かにウィルムス腫瘍で *IGF2* のインプリンティングの喪失により両アレル性に *IGF2* が発現している (loss of imprinting : LOI) 例や、*WT1* 変異と *IGF2* の LOI 双方を伴っている例もある。ウィルムス腫瘍の発症機序を明らかにするためには、*WT1* 異常とともに 11p15 領域の異常を系統的に検討する必要がある。

2. 先天性間葉芽腎腫および肉腫型腎芽腫

先天性間葉芽腎腫 (CMN) は、新生児・乳児期に好発する腎腫瘍である。手術による完全摘出のみによって根治が期待される予後良好な腫瘍である。本腫瘍は、その病理形態学的特徴から線維腫型、富細胞型、混合型に分類される。線維腫型では、紡錘形細胞が束

状に増殖し、腎実質内に浸潤性に増殖する。一方、富細胞型では、卵円形の核を有する腫瘍細胞が密に増殖し、核分裂像が目立つ。混合型は、線維腫型の形態の部と富細胞型の形態の部が混在する。

富細胞型では、染色体転座 t(12;15) (p13;q25) に由来する *ETV6-NTRK3* キメラ遺伝子が同定された。このキメラ遺伝子は、乳児線維肉腫に認められる遺伝子と同一である。このような事実から CMN、富細胞型と乳児線維肉腫は同一の entity の腫瘍と考えられるようになってきた⁵⁾。この染色体転座によって *ets* family に属する転写因子である *ETV6* の 5' 側と *NTRK3* の 3' 側が融合する。このキメラ遺伝子は凍結組織を用いた RT-PCR 法によって検出可能である。CMN と組織学的に鑑別の難しい腫瘍として腎明細胞肉腫があげられる。CMN に比較して予後が悪い。したがって、CMN の診断がキメラ遺伝子の同定で確定できれば有用である。また、腎ラブドイド腫瘍には *hSNF5/INI1* 遺伝子の変異が 70% 程度に認められる⁶⁾。本腫瘍はきわめて予後不良で、治療方針が異なるためウィルムス腫瘍との鑑別が重要である。鑑別診断には組織学的所見が重要であるが、以上述べた遺伝子解析を加えることによって確定診断を行うことが重要である。

III. 小児に好発する腎軟部腫瘍

一部の軟部肉腫は、腫瘍に特異的な染色体転座を有することが知られている (表 1)。これらの染色体転座では、ある遺伝子が切断され他の遺伝子と融合することによりキメラ遺伝子 (融合遺伝子) が形成されるが、この数年で各々の染色体転座に由来するキメラ遺伝子が、続々と同定されている。これらのキメラ遺伝子は、腫瘍の発生機序に深く関連しているのみならず、凍結組織を用いた RT-PCR 法による発現同定が、確定診断に非常に有用であることが示されている。その利点として、方法論 (手法) が確立していること (ただし、ホルマリン固定パラフィンブロックからの RT-PCR 法は、その感度と特異性についてさらなる検証が必要である)、迅速に行えること、少量の検体で可能であること等があげられる。ただし、この検出にあたっては腫瘍組織を確実に検索しているか、RT-PCR 法に際してコンタミネーションがないかを厳重に確かめる必要がある。特に前者では検体を直接病理

表1 小児に好発する腫瘍において検出される染色体転座とキメラ遺伝子

腫瘍	転座の核型	キメラ遺伝子
Ewing/PNET 腫瘍群	t(11;22)(q24;q12)	<i>EWS-FLI1</i>
	t(21;22)(q22;q12)	<i>EWS-ERG</i>
	t(7;22)(p22;q12)	<i>EWS-ETV1</i>
	t(17;22)(q12;q12)	<i>EWS-EIAF</i>
	t(2;22)(q33;q12)	<i>EWS-FEV</i>
線維形成小細胞腫瘍	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS-WT1</i>
胞巣型横紋筋肉腫	t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3-FKHR</i>
	t(1;13)(p36;q12)	<i>PAX7-FKHR</i>
滑膜肉腫	t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT-SSX1</i>
	t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT-SSX2</i>
乳児線維肉腫	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>
先天性間葉芽腎腫	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>
巨細胞性線維芽細胞腫	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>
隆起性皮膚線維肉腫	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>
明細胞肉腫	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-ATF1</i>
胞巣状軟部肉腫	t(X;17)(p11;q25)	<i>ASPL-TFE3</i>

医が確認して腫瘍であることを確かめることが必須である。いずれにせよ、腫瘍の確定診断には、組織学的診断とこのようなキメラ遺伝子の同定とが相補的に行われることによって、有用性が高くなる。小児期に好発する骨軟部腫瘍のうち、特に Ewing/PNET 腫瘍群を中心に、分子生物学的解析が診断上、有用と考えられる腫瘍を取り上げる。

1. Ewing/PNET 腫瘍

Ewing 肉腫、末梢性未分化神経上皮腫 peripheral primitive neuroectodermal tumor (以下 PNET) は、いずれも、小児ないし若年成人の骨軟部組織に発生する悪性腫瘍である。病理組織学的には、Ewing 肉腫では、小型類円形の核と明るい胞体を有する腫瘍細胞が、一定の配列を示さず増殖する。一方、PNET では、Ewing 肉腫同様の腫瘍細胞がびまん性に増殖し、しばしば Homer Wright 型のロゼットが認められるなど神経形質が認められるのが特徴である。歴史的には、異なる腫瘍として報告されてきた Ewing 肉腫と PNET は、共通した染色体転座 t(11;22)(q24;q12) が存在すること、未分化な Ewing 肉腫細胞でも神経形質を有するよう分化すること等の結果から、現在では、Ewing/PNET 腫瘍 (Ewing sarcoma family of tumor: ESFT) とも称せられるようになった⁷⁾。

Ewing/PNET 腫瘍に存在する t(11;22)(q24;q12) では、第 22 染色体に由来する *EWS* 遺伝子の 5' 側と

第 11 染色体上の *FLI1* 遺伝子の 3' 側が融合して *EWS-FLI1* キメラ遺伝子が形成される (図 3)。その産物は *EWS* の N 末端側と *FLI1* の C 末端側からなる新たな蛋白質である。本腫瘍群では、*EWS-FLI1* に加え 4 種類の染色体転座と、それに由来するキメラ遺伝子が同定されている (表 1)。いずれも 3' 側は転写因子である *ets* family に属する遺伝子から構成されることが特徴であり、*EWS-ets* キメラ遺伝子ともよばれている。*EWS* は、本腫瘍の転座点より単離された遺伝子で、その産物は RNA 結合蛋白と考えられているが、その機能はいまだに詳細になっていない。一方、*FLI1* は、85 アミノ酸からなる *ets* domain とよばれる DNA 結合領域を有しており、GGA(A/T) を中心配列とする約 10bp の塩基配列を認識、結合し、転写活性化を行う。主として細胞の増殖に関する転写因子と考えられている。*EWS-ets* キメラ遺伝子は、*EWS* の N 末端領域と *ets* family の転写因子の DNA 結合ドメインから構成されるので、その産物が特定の遺伝子の発現を調節することによって腫瘍化に強く関連していると想定されている。*EWS-ets* キメラ蛋白が、転写活性化作用や transform 活性を有することが知られており、かつ、*c-myc* や *Id2* 等がその標的遺伝子として報告されているものの、いまだにキメラ遺伝子による腫瘍化のメカニズムは解明されていない。

Ewing/PNET 腫瘍は、特徴的な形質に乏しく、組織学的にも確定診断が困難である。そこで、RT-

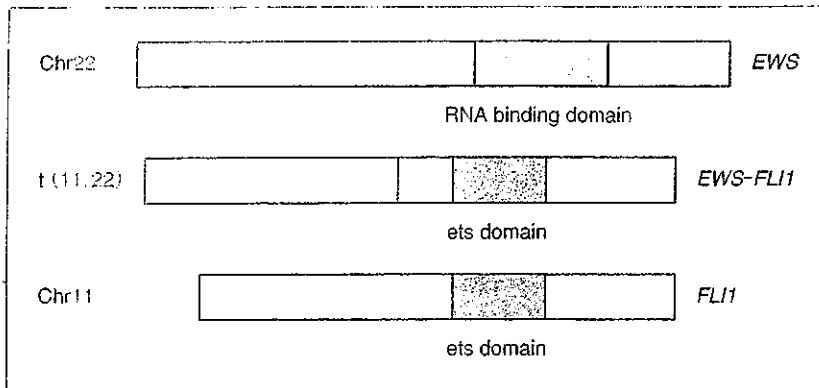


図3 *EWS-FLI1* キメラ遺伝子の模式図
EWS 遺伝子の5'側と *FLI1* 遺伝子の *ets* domain を含む3'側が融合している。

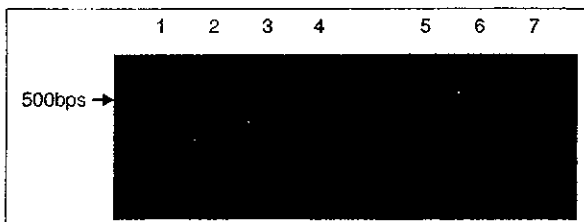


図4 RT-PCR法によるキメラ遺伝子の検出 lane 1~4: Ewing/PNET腫瘍と診断された腫瘍(lane 2)から *EWS-FLI1* キメラ遺伝子を同定した。シークエンスにより *EWS* のエクソン7と *FLI1* のエクソン6の組み合わせを確認した。Ewing肉腫細胞である NCR-EW2細胞(lane 3)では、*EWS* のエクソン7と *FLI1* のエクソン5が融合している。lane 5~7: 線維形成小細胞腫瘍と診断された腫瘍(lane 6)から *EWS-WTI* キメラ遺伝子を同定した。神経芽腫細胞である NCR-NB3細胞(lane 4, 7)では、*EWS-FLI1*, *EWS-WTI* キメラ遺伝子の発現を認めない。

表2 我々が検出した *EWS-ets* キメラ遺伝子

<i>EWS-FLI1</i>	46
<i>EWS</i> exon 7- <i>FLI1</i> exon 6	27
<i>EWS</i> exon 7- <i>FLI1</i> exon 5	12
<i>EWS</i> exon 10- <i>FLI1</i> exon 8	2
<i>EWS</i> exon 10- <i>FLI1</i> exon 5	2
<i>EWS</i> exon 7- <i>FLI1</i> exon 8	1
<i>EWS</i> exon 7- <i>FLI1</i> exon 4	1
<i>EWS</i> exon 10- <i>FLI1</i> exon 6	1
<i>EWS-ERG</i>	9
<i>EWS</i> exon 7- <i>ERG</i> exon 7	6
<i>EWS</i> exon 7- <i>ERG</i> exon 9	3
<i>EWS-ETV1</i>	1
<i>EWS-EIAF</i>	1
計	57

PCR法によるキメラ遺伝子の同定が病理診断に客観的な根拠を与えるものとして期待されている(図4)。我々の経験では、病理形態像、免疫染色結果等から Ewing/PNET腫瘍が強く疑われた腫瘍の約90%で *EWS-ets* キメラ遺伝子が同定された。キメラ遺伝子が検出された57例の内訳は、*EWS-FLI1* が46例、*EWS-ERG* が9例、*EWS-ETV1* が1例、*EWS-EIAF* が1例であった(表2)。*EWS-FLI1*, *EWS-ERG* では、転座による *EWS* と *FLI1* あるいは *ERG* の切断点は腫瘍ごとに異なっている。キメラ遺伝子の融合点の塩基配列を解析した結果、キメラ遺伝子の mRNA は表2のようなエクソンの組み合わせからなっていた。*EWS* のエクソン7と *FLI1* のエクソン6が融合した組み合わせが最も頻度が高く約半数を占め、*EWS* のエクソン7と *FLI1* のエクソン5の組み合わせがそれに続いていた。これらの *EWS* 関連キメラ遺伝子の検出率とその内訳は、欧米のそれとは差はないようである。

2. 線維形成小細胞腫瘍

線維形成小細胞腫瘍は、小児および若年成人の腹腔に好発する悪性腫瘍である。病理組織学的には小円形の腫瘍細胞よりなり、間質の線維形成を伴うのが特徴である。まれな腫瘍であるが、Ewing/PNET腫瘍、横紋筋肉腫等との鑑別が問題となることがある。本腫瘍には、特徴的な染色体転座 $t(11;22)(p13;q12)$ が存在し、それに由来する *EWS-WTI* キメラ遺伝子の発現が報告された。このキメラ遺伝子を RT-PCR法によって同定することが確定診断に有用である(図4)。

3. 横紋筋肉腫

横紋筋肉腫は、小児期に発生頻度の高い軟部肉腫の

一つである。胎児型、胞巣型、多形型に亜分類される。胞巣型横紋筋肉腫では、特徴的な染色体転座 $t(2;13)(q35;q14)$, $t(1;13)(p36;q12)$ が認められ、それに由来する *PAX3-FKHR*, *PAX7-FKHR* キメラ遺伝子が形成される。これらのキメラ遺伝子では、転写因子である *PAX3* 遺伝子あるいは *PAX7* 遺伝子の5'側と *FKHR* 遺伝子の3'側の forkhead domain を含む領域が融合する。胞巣型横紋筋肉腫では、RT-PCR法によって約80%の症例でキメラ遺伝子を同定することができるかとされており、他の小円形細胞腫瘍との鑑別が難しい本腫瘍の確定診断に応用することが可能である。同時に、胞巣型は胎児型に比し予後が不良であり、亜分類の決定は治療方針に強く影響する。さらに最近、*PAX7-FKHR* を発現する腫瘍は、*PAX3-FKHR* を発現する腫瘍と比較して予後が比較的良好であるという報告もある⁹⁾。一方、胎児型横紋筋肉腫では、第8染色体の trisomy, 11p15.5の LOH 等が観察される。

4. 滑膜肉腫

滑膜肉腫は、若年成人の四肢に好発する肉腫である。病理組織学的には、裂隙ないし管腔を形成する上皮様細胞成分と線維肉腫様の紡錘形細胞成分が混在し、二相性を呈することが特徴であるが、上皮様構造のほとんどみられない単相型もある。本腫瘍には、 $t(X;18)(p11;q11)$ が存在し、その結果 *SYT-SSX1*, *SYT-SSX2* キメラ遺伝子が生じる。*SYT-SSX1* を有する腫瘍は、二相型に多く、*SYT-SSX2* と比較して予後不良と報告されている⁹⁾。臨床像、病理組織像とキメラ遺伝子のタイプが関連していると考えられている。

5. その他

上述した腫瘍の他にも、染色体転座とそれに由来するキメラ遺伝子が報告されている。乳児線維肉腫は、前述したように $t(12;15)(p13;q25)$ と *ETV6-NTRK3* キメラ遺伝子が存在することから CMN と近縁の腫瘍と考えられつつある。一方、成人型の線維肉腫では、キメラ遺伝子は認めない。また、巨細胞性線維芽細胞腫は、隆起性皮膚線維肉腫と共通の遺伝学的異常として $t(17;22)(q22;q13)$ および余剰環状染色体、キメラ遺伝子 *COL1A1-PDGFB* が報告されており、隆起性皮膚線維肉腫の早期病変あるいは小児型と考えられている。明細胞肉腫や胞巣状軟部肉腫においても染色体転座とキメラ遺伝子が報告されている。また、炎症性筋線維芽細胞腫瘍においては、一部の症例で、

2p23 上の *ALK* の再構成が存在することが報告されはじめています。



小児固型腫瘍の中で分子遺伝学的所見が、病理診断に応用されつつある疾患を中心に取り上げた。小児腫瘍の分子遺伝学的知見は近年蓄積されつつあり、それを用いた病態診断(病理診断および治療法の決定)は日常の臨床検査のレベルに達しているものが少なくなく、成人の腫瘍に比し有用性が高い。小児腫瘍では形質に乏しい難治性腫瘍が多く、今後さらにこれらの腫瘍の分子遺伝学的特性を明らかにし、その知見を臨床応用することが必要である。

文 献

- 1) Brodeur, G. M. : Neuroblastoma : biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(3) : 203-216
- 2) Hata, J. : Wilms' tumor and the *WT1* gene. *Contrib Nephrol* 1999, 128 : 62-74
- 3) Shibata, R., Hashiguchi, A., Sakamoto, J. et al. : Correlation between a specific Wilms tumour suppressor gene (*WT1*) mutation and the histological findings in Wilms tumour (*WT*). *J Med Genet*. 2002, 39(12) : e83
- 4) Kikuchi, H., Takata, A., Akasaka, Y. et al. : Do intronic mutations affecting splicing of *WT1* exon 9 cause Frasier syndrome? *J Med Genet* 1998, 35(1) : 45-48
- 5) Rubin, B. P., Chen, C. J., Morgan, T. W. et al. : Congenital mesoblastic nephroma $t(12;15)$ is associated with *ETV6-NTRK3* gene fusion : cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma. *Am J Pathol* 1998, 153(5) : 1451-1458
- 6) Sevenet, N., Lellouch-Tubiana, A., Schofield, D. et al. : Spectrum of *hSNF/INI1* somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Human Mol Genet* 1999, 8(13) : 2359-2368
- 7) de Alava, E., Gerald, W. L. : Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 2000, 18(1) : 204-213
- 8) Sorensen, P. H., Lynch, J. C., Qualman, S. J. et al. : *PAX3-FKHR* and *PAX7-FKHR* gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma : a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002, 20(11) : 2672-2679
- 9) Ladanyi, M., Antonescu, C. R., Leung, D. H. et al. : Impact of *SYT-SSX* fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma : a multi-institutional retrospective study of 243 patients. *Cancer Res* 2002, 62(1) : 135-140

第19回日本小児がん学会

教育講座

神経芽腫新国際分類 INPCについて

—従来の分類との関連を含めて—

秦 順一

はじめに

近年、神経芽腫の病期の統一、治療法の改善、生物学的特異性の解明を多面的な領域を、国際レベルで行う International Neuroblastoma Risk Group(INRG)が結成された。その中で本腫瘍の国際病理組織分類の策定を目的とする International Neuroblastoma Pathology Committeeが6名のメンバーで組織された。筆者もそのメンバーの一人として加わってきた。4年ほどの討議の後1999年に International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)が発表されるに至った。本組織分類は神経芽腫の亜型を病理学的に明確に定義し、分類の再現性(reproducibility)、予後を含む本腫瘍の生物学的特異性(biological relevance)、分類が容易であることを目指している(user friendly)。神経芽腫の腫瘍細胞は年齢とともに分化・成熟を果たすという事実が知られており、本分類では Shimada 分類に準じて発症年齢と組織型との対応によって予後判定基準(age-linked histological classification and prognosis system)を取り入れた。この分類はすでに米国、カナダ、オーストラリアで使用が開始され、EU諸国でもその導入が考慮されている。わが国においても、腫瘍の病態、生物学的特性の解明ならびに治療法の開発を進める点からも、国際的な共通言語(組織分類)を取り入れる必然性が共通認識となりつ

つある。本年3月に改訂、出版された日本病理学会小児腫瘍アトラス「神経芽腫群腫瘍」では全面的にこの分類を取り入れている。本稿では INPC を紹介するとともに従来の分類との相違点を述べる。

1. INPC 分類とその方針について

分類の概要は以下に記載した。国際分類であり、和訳による誤解を避けるためオリジナルの診断名で統一した。

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

A) INP 組織学的分類の方針

神経芽腫の組織像は、基本的には腫瘍細胞である神経冠由来の神経芽腫細胞(腫瘍性、以下同様)と反応性に増生すると考えられるシュワン様細胞から成る間質によって構成される。このような観点から本組織学的分類は、1) シュワン様細胞の量、腫瘍細胞である神経芽細胞の増殖率との関連、2) 増殖している神経芽細胞の分化・成熟度、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。すなわち、この分類では単なる組織像の記載にとどまらず、予後の推定をも行うことを特徴としている(表1, 2)¹⁻⁴⁾。

B) INP の説明

1. Neuroblastoma(NB, Schwannian stroma-poor tumor)

神経芽細胞の増殖が主体で間質であるシュワン細胞は認められないか、わずかに腫瘍細胞増殖巣を取り囲むように存在する血管結合組織周囲にみられる。以下の亜群が存在する。

a) Undifferentiated sub type

小型ないし中型の未熟な神経芽細胞からなり、胞体に乏しい、腫瘍細胞間に光顕上明らかな神経細線維(neuropil)がみられない。この亜型に診断されると年齢に関連なく予後不良群にはいるので、診断は慎重にする必要がある。

b) Poorly differentiated sub type

神経細線維が増殖する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。時には好酸性の胞体と核小体が明瞭な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。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。

c) Differentiating neuroblastoma sub type

腫瘍細胞の多くは、なお未熟な神経芽細胞であるが前述した交感神経節細胞へ分化傾向を示す細胞が腫瘍全体で5%を超える腫瘍をいう。

d) Mitosis karyorrhexis-Index(MKI)

Neuroblastoma では腫瘍細胞の増殖性を示し、予後とも密接に関連する組織学的所見として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。神経芽腫の組織学的予後判定に重要な指標となるので、正確なカウントが必要である。

表1 INPCの基本的考え方

1. 全ての神経芽腫群腫瘍に適用できる
2. 組織分類の定義を明確にする組織分類の基準
・神経芽細胞の分化度
・間質であるシュワン細胞の発達
・Mitosis-Karyorrhexis-Index (←細胞増殖の指標)
3. 予後との相関(予後を推定しうる)を重視する組織分類とする
Age-linked Morphologic Classification
←Shimada system

表3 日本病理学会分類との相違

1. 腫瘍の間質であるシュワン細胞の量を考慮している(vs 神経芽細胞の分化度を重視)
2. MKIを採用←腫瘍細胞の増殖指標
3. 発生年齢を加味した組織分類 予後を推定し得る組織分類

2. Ganglioneuroblastoma(GNB), intermixed type

成熟したシュワン様細胞が腫瘍組織の50%以

表2 INPC腫瘍亜分類とシュワン細胞の発達との関連

<u>Neuroblastoma(NB)</u>	
Undifferentiated(UD)	➡ 50%未満
Poorly differentiated(PD)	
Differentiating(D)	
<u>Ganglioneuroblastoma(GNB)</u>	
Intermixed	50%以上
<u>Ganglioneuroma(GN)</u>	
Maturing GN	➡ シュワン細胞が主体
Mature GN	
<u>Ganglioneuroblastoma(GNB)</u>	
Nodular	Composite Stroma poor/rich

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, Schwannian stroma-rich)

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、その他の構成細胞は分化したまたは分化途上にある交感神経節様細胞である。分化した神経節様細胞には外套細胞を伴う。以下の亜群が存在する。

a) Ganglioneuroma, maturing sub type

腫瘍のほとんどが神経節腫様組織から成るが、一部に神経細線維を伴った神経芽細胞が散在している腫瘍をいう。

b) Ganglioneuroma, mature sub type

成熟したシュワン様細胞から成る間質が腫瘍組織の殆どを占め、神経突起を伴った成熟した神経節細胞が散在性に存在する。未熟な神経芽細胞は認められない。

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、前者は後者とは明らかに異なるクローンから成ると考えられる。組織学的には未熟神経芽細胞の

増殖巣（結節）と成熟した神経節腫様組織との間には明瞭な境界が存在する。また、予後の判定のため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) INPC による組織分類の手順

i) 大項目としてまず NB, GNB, GN に分類する。

ii) それぞれの腫瘍の亜型 (subtype) を決定する

iii) NB については腫瘍細胞の分化度とともに MKI の程度を決定する。

iv) NB では組織像が一様でなく、しばしば組織型が混在する 경우가少なくない。その際には優勢度で診断するのが原則であるが、判断が困難な場合はその成分を所見として記載する。

v) 転移先から採取された腫瘍の組織分類

INPC では未治療で原発巣の摘出腫瘍に対して腫瘍分類を付すことを原則としている。しかしながら神経芽腫の場合、腫瘍が進展し原発腫瘍が採取不可能で、転移巣を生検する 경우가少なくない。この場合、転移腫瘍であっても未治療の腫瘍であれば十分に予後を推定できる情報が得られるので、原発巣に準じた組織分類をすることができる。

D) 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

表4 INPC/従来の分類との比較

INPC/Category and Subtype	日本病理学会 小児腫瘍分類委員会	Shimada Classification
Neuroblastoma(NB)	神経芽腫	NB(Stroma-poor)
undifferentiated	円形細胞+花冠細線維形成型	undifferentiated
poorly differentiated	花冠細線維形成型	
differentiating	花冠+神経節芽腫・低分化型	differentiating
Ganglioneuroblastoma	神経節芽腫/神経節腫	GNB/GN
intermixed/Ganglioneuroma	(GN)	(Stroma-rich)
GNB	神経節芽腫	
intermixed	分化型	GNB intermixed
GN		
maturing	神経節芽腫分化型+神経節腫	GNB, well differentiated
mature	神経節腫	GN
Ganglioneuroblastoma, nodular	神経節芽腫・混成型	GNB, nodular

(Prognostic risk grouping)

米国 Children's Cancer Group (CCG) study で取り扱われた手術後5年経過し、その間の予後が判明している腫瘍 (CCG-3881, low and intermediate risk group および CCG-3891, high risk group) 500 例について、INPC による組織分類、発生年齢と disease free survival (DFS) の解析によって年齢を加味した組織型と予後との関連が以下のように決定された。

(1) 神経芽腫について

- 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 は年齢に関係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 NB 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 (i) から (iv) 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群である。

2. INPC と従来の分類との関連について

日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会⁶⁾ の神経芽腫分類との比較は表 3 に、さらに同分類と Shimada 分類⁷⁾ との対応は表 4 に示した

おわりに

INPC の概要について概説した。本分類は、従来の分類とほぼ対応しており、理解されやすい。先に記したようにすでに多くの国々でこの組織分類に基づいて神経芽腫が分類されており、標準的な分類法として確立されつつある。わが国でもこのほど改訂された日本病理学会小児腫瘍分類委員会による小児腫瘍組織分類アトラス「神経芽腫群

腫瘍」(2004年3月金原出版刊行)⁶⁾でもINPCの分類を全面的に取り入れて詳細に解説した。従ってわが国においても本腫瘍の標準的な病理診断は今後INPCに準じて行われることになる。なお、INPCの詳細はこのアトラスを参照して頂きたい。本分類が病理医をはじめわが国の小児腫瘍を携わる方々全てに広く理解され、活用されることを強く望むものである。

文 献

- 1) Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 86:349-363,1999
- 2) Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, et al: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86:364-372,1999
- 3) Peuchmaur M, d'Amore ESG, Joshi VV, Jata J, Roald B, Dehner LP, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H: Revision of the International Neuroblastoma Classification: Confirmation of favorable and unfavorable prognostic subset in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 98:2274-2281 2003 (in press).
- 4) Ambros IM, Hata J, Joshi VV, Roald B, Dehner LP, Tuchler H, Potschger U, Shimada H: Morphologic features of neuroblastoma (Schwannian stroma-poor tumors) in clinically favorable and unfavorable groups. *Cancer* 94:1574-1583,2002
- 5) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会:小児腫瘍組織カラーアトラス第2巻 神経芽腫群腫瘍-国際分類INPCによる-, 金原出版, 東京, 2004
- 6) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会:新訂版小児腫瘍分類図譜 第3篇, 神経芽腫群腫瘍および類縁腫瘍, 金原出版, 東京, 1992
- 7) Shimada H, Chatten J, Newton, WA, Sachs, N, Hamoudi, AB, Chiba, T, Marsden, HB, Misusgi, K: Histopathologic prognostic factor in neuroblastic tumors: Definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas *JNCI* 73:405-416,1984

Review Article

Reduced-intensity Hematopoietic Stem Cell Transplantation (RIST) for Solid Malignancies

Masahiro Kami, Atsushi Makimoto, Yuji Heike and Yoichi Takaue

Department of Medical Oncology, Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, The National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

Received June 18, 2004; accepted October 6, 2004

Reduced intensity stem cell transplantation (RIST) is a new approach of stem cell transplantation, which has shown promising features as reported in multiple phase I and II studies. Elderly patients, who are not eligible for conventional myeloablative hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), are now treatable with RIST. It has also reduced regimen-related toxicity and provided better prognosis in short-term follow-up than conventional HSCT. Among solid tumors, metastatic renal cell carcinoma was found to respond well to RIST. Clinical studies are currently being conducted to evaluate the efficacy of RIST in other types of solid tumors. However, the mechanism of graft-versus-host disease (GVHD) and graft-versus-tumor (GVT) effects remains unclear. More knowledge on the mechanism is crucial to enhance the antitumor effect and to improve the prognosis further.

Key words: graft-versus-tumor effects – graft-versus-host disease – renal cell carcinoma – allogeneic hematopoietic stem cell transplantation – breast cancer

ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION AS AN IMMUNE THERAPY

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT) for the treatment of hematological malignancies was originally based upon the effect of a myeloablative preparative regimen. A preparative regimen using high-dose chemoradiotherapy would suppress the host's immune response and eradicate the residual tumor cells. Marrow was infused to restore hematopoiesis (1). In combination with preceding induction and consolidation cytotoxic chemotherapy, myeloablative preparative regimens followed by allo-SCT were supposed to eradicate the residual underlying diseases.

However, it was found that allogeneic cells were responsible for immunological responses against tumor cells. This is called a graft-versus-leukemia (GVL) or graft-versus-tumor (GVT) effect (2). Evidence supporting this hypothesis includes (i) lower incidences of relapse in patients receiving allo-SCT than in those receiving autologous SCT (3); (ii) higher risk of relapse in patients receiving syngeneic SCT (4); and

(iii) lower risk of relapse in patients with acute and/or chronic graft-versus-host disease (GVHD) than those without these conditions (5). Furthermore, GVL or GVT effects were found to be mediated by lymphocytes, especially T cells, based on the clinical findings of (i) higher risk of relapse after T-cell depletion than non-depleted SCT (6); and (ii) therapeutic effects of donor lymphocyte infusion (DLI) (7). In particular, chronic myeloid leukemia (CML) responds well to DLI, and most patients with CML who relapse following allo-SCT can achieve remission with DLI (8). Based on these findings, allo-SCT is now regarded as one of the available immune therapies.

REDUCED-INTENSITY STEM CELL TRANSPLANTATION (RIST)

The high-dose chemotherapy and radiation used as preparative regimen for allo-SCT are associated with a considerable morbidity and mortality (9). This approach has therefore been restricted to young patients without co-morbidities. The majority of patients with hematological malignancies are ineligible for high-dose chemotherapy or radiotherapy because of their old age and co-morbidities. Although allo-SCT is the most powerful treatment for refractory hematological malignancies, only a small proportion of these patients have the opportunity to undergo this treatment.

For reprints and all correspondence: Masahiro Kami, Department of Medical Oncology, Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, the National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-0045, Japan. E-mail: mkami@ncc.go.jp

Recently, a new strategy for transplantation using a reduced-intensity or non-myeloablative preparative regimen has been developed to reduce regimen-related toxicity (RRT) while preserving adequate antitumor effects (10–14). Various regimens with different intensity can be categorized roughly into two intensity groups: (i) reduced-intensity regimens which retain a certain degree of RRT and require hospitalization; and (ii) minimally myelosuppressive regimens which rely on post-grafting immunosuppression to permit engraftment (15,16). The aim of post-grafting immunosuppression is to control GVHD and to suppress residual host-versus-graft (HVG) effects that would impede engraftment.

These reduced-toxicity regimens are frequently termed 'non-myeloablative' and 'reduced-intensity' regimens. At present, a variety of preparative regimens have been developed. Both myelosuppression and immunosuppression vary widely among them. According to a working definition, a truly non-myeloablative regimen should allow prompt hematopoietic recovery (within 28 days of transplantation) without stem cell rescue, and mixed chimerism usually occurs upon engraftment (15,16). These regimens do not ablate host immunity and depend on the activity of donor T cells to achieve engraftment. The regimen of 2 Gy total body irradiation (TBI) with or without fludarabine reported by the Seattle Transplantation Team (12) is classified as a truly non-myeloablative regimen. In contrast, autologous hematopoietic recovery does not occur without stem cell support after the other regimens such as fludarabine/busulfan and fludarabine/cyclophosphamide, and they are termed reduced-intensity preparative regimens.

PRECLINICAL MODEL OF NON-MYELOABLATIVE SCT

The Seattle Transplantation Team reported the results of preclinical canine studies on non-myeloablative SCT. The researchers considered that two immunological barriers must be overcome in the setting of allo-SCT (17). One is the GVHD, and the other is the rejection or HVG reaction. Both reactions are mediated by T lymphocytes, suggesting that immunosuppressive agents given after allo-SCT to control GVHD might modulate HVG reactions. The latter feature would allow minimization of the high-dose chemotherapy given before allo-SCT for host suppression.

Animal models demonstrated a dose–response relationship between TBI and engraftment (18). In random-bred dogs, a single fraction of 920 cGy TBI, corresponding to 1500 cGy fractionated TBI, resulted in engraftment of dog leukocyte antigen (DLA)-identical littermate marrow in all cases. When the dose was decreased by 50%, the majority of dogs rejected their grafts. At the reduced dose, the addition of post-grafting prednisone did not enhance engraftment, while cyclosporin given for 5 weeks led to engraftment in all of the animals. When the TBI dose was decreased further to 200 cGy, cyclosporin only allowed engraftment for 3–4 months, after which the grafts were rejected. The combination of methotrexate and cyclosporin resulted in engraftment in two out of five animals,

but the rest rejected. A combination of mycophenolate mofetil (MMF) and cyclosporin given for 4 and 5 weeks after transplantation was evaluated for its effect on engraftment. The regimen was capable of both controlling GVHD and preventing graft rejection by suppressing a GVH reaction, with 11 of 12 dogs demonstrating stable engraftment of marrow from DLA-identical littermates (19).

They further investigated whether the major role of TBI is to create marrow space or to provide host immunosuppression (20). They irradiated the central lymph node chain from the neck to the upper abdomen with 450 cGy before allo-SCT, and administered MMF and cyclosporin after allo-SCT. At 6 weeks post-transplant, donor cells were present in non-irradiated marrow spaces, suggesting that radiation was not essential to create marrow space for engraftment. After 1 year, DLI was given to the animals and recipient cells disappeared within 9 weeks. These findings indicate that engraftment might be accomplished by blocking HVG reactions and inducing the GVH reaction, and that high-dose cytotoxic chemotherapy and radiotherapy could be eliminated from the preparative regimens.

RATIONALE OF ALLO-SCT FOR SOLID TUMORS

Several findings justify allo-SCT for solid tumors: (i) GVT effects can target tissue-specific polymorphic antigens which are not derived from hematopoietic lineages; (ii) some solid tumors are sensitive to immunotherapy, such as renal cell carcinoma (RCC), melanoma and ovarian cancer; (iii) antigens restricted to the tumor could stimulate tumor-specific allo-immunity in contrast to defective T cells in the tumor-bearing host; and (iv) in theory, all carcinomas arising from epithelial tissues such as keratinocytes, fibroblasts, exocrine glands, hepatobiliary trees and the gastrointestinal tract, which are targets of acute and chronic GVHD, should be susceptible to a GVT effect.

Before clinical trials were initiated, murine models have provided some evidence for a GVT effect (21,22). Among animals inoculated with mammary adenocarcinoma cells, the recipients of allo-SCT showed better survival than did those of syngeneic SCT (21). Further studies provided evidence that murine mammary adenocarcinoma cells expressed minor histocompatibility antigens (mHas) that could be targeted by alloreactive donor T cells in the setting of allogeneic but not autologous bone marrow transplantation (23). Prigozhina et al. demonstrated in animal models that effective eradication of tumor cells as well as leukemic cells can be achieved following allo-SCT using non-myeloablative preparative regimens (24).

The earliest clinical evidence supporting the existence of a GVT effect in a solid tumor was observed in a patient with metastatic breast carcinoma undergoing fully myeloablative SCT for relapsed acute myeloid leukemia. The incidental regression of a metastatic lesion of breast carcinoma raised the possibility of a responsible GVT effect (25). Regression of liver

metastasis in association with severe acute GVHD was reported in a woman transplanted for metastatic breast carcinoma. The researchers demonstrated that allogeneic T cells collected during GVHD and cultivated were able to mediate a cytotoxic effect against breast cancer cell lines (26), suggesting that disease regression resulted from donor T cells targeting broadly expressed mHAs. Since then, similar anecdotal reports have been published concerning a possible GVT effect in lung cancer (27), ovarian cancer (28), colon cancer (29), neuroblastoma (30), pancreas cancer (31,32) and ependymoma (33). Porter et al. conducted a phase I clinical trial to determine whether a GVT effect could be observed after primary DLI without stem cell support in patients with primary cancers (34). Three of four patients with acute GVHD and late chimerism responded to primary DLI. These findings indicate that the GVT effect does occur in the setting of allo-SCT for solid tumors.

CLINICAL TRIALS FOR SOLID TUMORS

METASTATIC RENAL CELL CANCER (RCC)

In 1997, Childs et al. initiated a clinical trial to evaluate GVT effects in metastatic RCC (35). Chemotherapy is ineffective in the majority of cases and does not prolong survival. However, RCC has a distinct nature from that of other solid tumors. There is increasing evidence that they may be susceptible to T-cell immune responses. Biopsy of spontaneously regressing lesions has shown tumor-infiltrating lymphocytes with predominant CD8⁺ T cells exhibiting major histocompatibility complex (MHC) class I restricted cytotoxicity against autologous tumor targets (36). Furthermore, unlike most solid tumors, RCC is susceptible to cytokines such as interleukin-2 (IL-2) and interferon- α (37), suggesting that T cells represent the principle effector.

Childs' group treated 19 patients with metastatic RCC (35). The preparative regimen consisted of fludarabine 25 mg/m² for

5 days and cyclophosphamide 60 mg/kg for 2 days. Cyclosporin, used to prevent GVHD, was withdrawn early in patients with mixed T-cell chimerism and/or disease progression. Patients without response received up to three courses of DLI. At the time of the last follow-up, nine of the 19 patients were alive 287–831 days after transplantation (median follow-up, 402 days). Two died of transplantation-related causes, and eight from progressive disease. In 10 patients, metastatic disease regressed: three had a complete response, and seven had a partial response. The patients who had a complete response remained in remission 27, 25 and 16 months after transplantation. Results of this clinical trial were updated in 2002 (38). Clinical response is significantly associated with the development of GVHD. There is a 4–6 month interval between transplantation and development of a GVT effect, and patients with rapidly progressive diseases are unlikely to benefit from RIST. Disease response was observed most commonly in patients with pulmonary metastases of clear-cell histology without other organ involvement. Some patients who had failed to respond to interferon- α prior to transplantation achieved responses following administration of a low dose of this agent after transplantation.

After the first report on RIST for RCC, several phase I/II studies have been reported (Table 1) (39–44). Response rates varied widely from 0 to 57%, but it should be noted that some responses were reported in seven of the nine studies. While long-term prognosis remains unknown, response to allo-SCT has been confirmed in some independent studies. Rini et al. described regression of primary kidney tumors, a rare event among responders to cytokine-based therapy (39). According to a European retrospective survey (45), allo-SCT was used in <20 cases of solid tumors until 1997; since then it increased to 159 in 2002, mainly for RCC.

We also initiated a phase I clinical trial on RIST for metastatic RCC (46). From June 2000 to April 2002, nine patients received peripheral blood stem cell transplantation from a

Table 1. Clinical trials on RIST for metastatic renal cell carcinoma

Reference	Donor	No. of patients	Preparative regimen	GVHD prophylaxis	Response rates
Childs et al. (35)	An HLA-identical or one locus-mismatched related donor	19	CY/Flu	CSP	53%
Childs and Barrett (38)	HLA-identical and one locus-mismatched related	52	CY/Flu	CSP	48%
Rini et al. (39)	An HLA-identical sibling	12	CY/Flu	Tacrolimus and MMF	33%
Bregni et al. (40)	An HLA-identical sibling	7	CY/Flu	CSP and MTX	57%
Blaise et al. (42)	An HLA-identical sibling	25	ATG/BU/Flu	CSP	4%
Ueno et al. (43)	An HLA-identical related or matched unrelated donor	15	Melphalan/Flu	Tacrolimus and MTX	27%
Pedrazzoli et al. (41)	An HLA-identical sibling	7	CY/Flu	CSP and MTX	0%
Hentschke et al. (44)	An HLA-identical related or matched unrelated donor	10	2 Gy TBI/Flu*	CSP and MMF	0%
Nakagawa et al. (46)	An HLA-identical sibling	9	ATG/BU/Flu	CSP	11%

CY, cyclophosphamide; Flu, fludarabine; CSP, cyclosporin; MMF, mycophenolate mofetil; MTX, methotrexate; ATG, anti-thymocyte globulin; BU, busulfan; TBI, total body irradiation.

*Recipients receiving transplants from unrelated donors were given thymoglobulin.

human leukocyte antigen (HLA)-identical sibling donor. The conditioning regimen consisted of fludarabine 180 mg/m² or cladribine 0.66 mg/kg, plus busulfan 8 mg/kg and rabbit anti-thymocyte globulin (ATG). GVHD prophylaxis consisted of cyclosporin 3 mg/kg alone. All of the patients achieved engraftment, with no grade III–IV non-hematological RRT, and complete donor cell type chimerism was achieved without additional DLI by day 60. Acute and chronic GVHD was seen in four patients each. One patient achieved partial remission (response rate 11%) and, as of July 2003, six patients are alive with a median follow-up of 22.5 months. The actuarial overall survival rate was 74% at 2 years. We followed all the 26 patients who were referred to our institute for RIST and were subject to HLA typing. Transplanted patients ($n = 9$) showed significantly higher overall survival rate than those who had not received RIST ($n = 17$) (Fig. 1A, $P = 0.016$). We compared the overall survival rates between 12 patients with matched donors and the other 14 patients without them (Fig. 1B). The 1-year actuarial survival rates were 74 and 48%

in patients with donors and those without them, respectively ($P = 0.088$). This study confirmed the feasibility of allo-SCT for metastatic RCC, and suggests that it might improve prognosis of patients with metastatic RCC. Further phase II or III studies are warranted.

BREAST CANCER

After the first case report by Eibl et al. (26), Ueno et al. reported the results of a feasibility study on conventional myeloablative allo-SCT for metastatic breast cancer in 16 patients (47,48). This study included patients without progressive disease. The preparative regimen consisted of cyclophosphamide, carmustine and thiotepa. GVHD prophylaxis was mainly tacrolimus and methotrexate. The responses were complete response ($n = 1$), partial response ($n = 5$) and stable disease ($n = 8$) in the 15 evaluable patients. Two patients responded during acute GVHD following the withdrawal of immunosuppression.

Ueno et al. further investigated the feasibility of RIST for metastatic breast cancer (43). A total of eight patients received allo-SCT following fludarabine and melphalan. Three patients showed some clinical responses (complete response two, minor response one). Metastatic lesions resolved 3 months after development of chronic GVHD in one patient, and the other two patients demonstrated tumor response at 13 and 17 months after transplantation. The delayed response was comparable with that in RIST for RCC. Since fludarabine and melphalan produce little cytoreduction in metastatic breast cancer and the underlying disease progressed immediately after transplantation in more than half of the patients, it is reasonable to assume that the disease response was attributable to a GVT effect.

Since their reports, GVT effects against breast cancer have been confirmed by other researchers (40–42,49) (Table 2).

MELANOMA

Childs and Srinivasan treated 11 patients with metastatic melanoma (50). This study highlights some of the potential problems in applying RIST for some solid tumors. Death from rapid disease progression occurred before day 100 in five patients. Although three patients achieved partial regression, their responses occurred early in the courses of RIST with a short duration, suggesting that these responses were attributable to chemotherapy effects related to preparative regimens rather than GVT effects. One patient had delayed regression of several subcutaneous metastatic nodules. The investigators speculated that RIST should be limited to a minority of melanoma patients who have slow-growing diseases.

OTHER CANCERS

There is little information on the efficacy of allo-SCT for most solid tumors. Some anecdotal reports have been published on allo-SCT for a variety of cancers (28,31,44,51–54). A case report and a small case series of RIST for metastatic ovarian

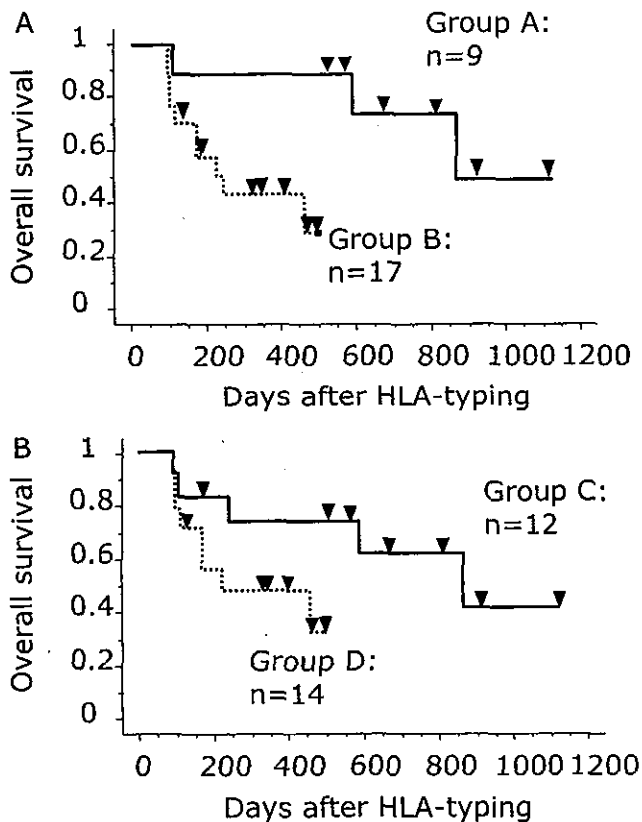


Figure 1. Kaplan-Meier estimates of the overall survival rates following HLA typing. (A) A comparison of overall survival rates between transplanted and non-transplanted patients. The overall survival rate was significantly higher in transplanted patients than in non-transplanted patients ($P = 0.016$). (B) A comparison between patients with an HLA-matched donor and those without. A trend toward a better survival was observed in patients with an HLA-matched donor ($P = 0.088$). Group A, transplanted patients ($n = 9$); group B, patients who had not received transplantation ($n = 17$); group C, patients with an HLA-matched donor ($n = 12$), including nine transplanted patients; group D, patients without an HLA-matched donor ($n = 14$).