

厚生労働科学研究研究費補助金  
子ども家庭総合研究事業

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

平成17年度 総括・分担研究年度終了報告書

主任研究者 中川原 章

平成18(2006)年3月

## 目 次

|      |  |    |
|------|--|----|
| I.   | 総括研究年度終了報告<br>難治性神経芽腫の克服に向けたトランスレーショナル<br>リサーチの基盤作りと臨床研究ネットワークの構築<br>中川原 章 | 1  |
| II.  | 分担研究年度終了報告   |    |
|      | 1. 難治性神経芽腫克服へ向けたトランスレーショナル<br>リサーチ確立のための基盤研究<br>中川原 章                      | 5  |
|      | 2. 難治性神経芽腫に対する多施設臨床研究の基盤に<br>関する研究<br>—特に中央病理診断システムの構築について—<br>秦 順一        | 9  |
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表   | 11 |
| IV.  | 研究成果の刊行物・別刷  | 15 |

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
総括研究年度終了報告書

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

主任研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所長

**研究要旨** 神経芽腫マススクリーニング休止後の難治性神経芽腫治癒率向上を目指して、以下の事業を行った。（１）我が国における神経芽腫組織バンクの確立を目的とし、現在組織編成が行われている日本神経芽腫スタディグループと密接に連携した体制の構築に尽力した。また、登録検体に関し、INPC 新国際分類を導入した中央病理診断と分子生物学的検査体制の確立を図った。（２）独自に開発した神経芽腫予後予測用実用化 DNA チップの臨床試験研究を民間企業に技術移管し、第 3 相の評価体制に入った。現在までに約 50 例の新規神経芽腫症例について検討を行った。（３）我々が創設した「神経芽腫研究会」の第 7 回、第 8 回を開催し、我が国における分野を超えた神経芽腫の臨床研究ネットワークの構築がより展開され、日本神経芽腫スタディグループとの連携も実現した。

分担研究者

秦 順一（国立成育医療センター 総長）

分子病態との関連：国立成育医療センターにおいて、INPC 新国際分類を確立し、組織切片を用いた FISH 法を導入した。

A. 研究目的

神経芽腫は小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度が高いにもかかわらず、進行した難治性神経芽腫の長期生存率は未だ 30%にとどまっております。一方、わが国の国家プロジェクトとして行われてきた乳児マススクリーニングは、大部分は自然退縮する神経芽腫を発見したに留まり、平成 15 年秋に休止された。そこで、我々は、我が国における新たなトランスレーショナルリサーチの基盤を確立することを目的とし、平成 17 年度は、神経芽腫組織バンクおよび中央病理診断と分子生物学的診断体制をさらに充実させ、日本神経芽腫スタディグループとの連携を目指した。さらに、「神経芽腫研究会」による臨床研究ネットワークの構築を進め、これもグループスタディとの連携を試みた。

3. 神経芽腫遺伝子診断体制の確立：千葉県がんセンター研究所において、DNA, RNA を抽出し、MYCN 増幅を Southern blot 法と FISH 法、TrkA 発現を Northern blot 法、DNA ploidy を FACScan にて測定した。また、神経芽腫の新たな腫瘍マーカーである血中 Midkine レベルおよび HGF レベルの測定を行った

2. 実用化神経芽腫用 DNA ミニチップ：千葉県がんセンター研究所において神経芽腫各サブセットから抽出した約 5,300 遺伝子を cDNA マイクロアレイ化したものを用いて開発した予後予測用実用化ミニチップ（上位 200 遺伝子を搭載）を、SRL 株式会社へ技術移管した。

（倫理面への配慮）

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

B. 研究方法

1. 神経芽腫組織バンクの確立：国立成育医療センターと千葉県がんセンター研究所に神経芽腫組織バンク体制を確立した。

2. 神経芽腫中央病理診断と病態の指標となる

C. 研究結果

（１）神経芽腫組織バンクの拡大・充実：国立成育医療センター研究所および千葉県がん

センター研究所の2カ所に神経芽腫組織バンク体制を確立した。送られてくるサンプルは、マススクリーニング症例の検体がほぼ皆無となり、進行神経芽腫が大部分を占めた。また、長期経過を辿っている再発例などが多く見られるようになってきたことは注目に値する。検体受領後の通常検査としては、MYCN がん遺伝子のコピー数を FISH 法も導入して行い、DNA ploidy、TrkA 発現、血中 Midkine レベル、血中 HGF (hepatocyte growth factor) レベルの測定を行った。

(2) 神経芽腫の中央病理診断システムの構築と国際的連携:

INPC 新国際神経芽腫病理診断を導入した中央病理診断システムを確立した。また、診断や予後予測が困難な症例、たとえば Ganglioneuroblastoma・nodular type では、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が、結節のどの部分がどのような分子遺伝学的背景を有するかの判別は、予後を推測するうえで重要である。そこで、組織切片を用いた FISH 法を開発し、MYCN がん遺伝子の増幅、1p 欠失、11p 欠失、17q 増加などを検索するシステムを確立した。

(3) 難治性神経芽腫克服のための新しい予後予測用 DNA ミニチップの開発とその臨床応用: In-house cDNA microarray を用いて我々が開発した神経芽腫予後予測用 DNA ミニチップ (選ばれた 200 遺伝子を搭載) を、民間大手臨床検査会社である SRL 株式会社に技術移管し、第3段階の前向き試験によるバリデーションを行うため、臨床試験研究として展開した。これまでに約50例について検証を行い、ほぼ満足のいく結果が得られている。

(4) 「神経芽腫研究会」の拡大と充実: 平成17年度は、第7回および第8回の神経芽腫研究会を東京において開催した。セミクロードの会であるが、分野を超えて神経芽腫に関連した基礎研究をしている研究者が多数参加し、臨床研究ネットワークの構築に重要な役割を果たした。また、第8回研究会は、日本神経芽腫スタディグループと連携して行い、大変有意義であった。

#### D. 考察

乳児神経芽腫マススクリーニングの休止後、

我々の神経芽腫検体センターに送られてくる症例の構成は、完全にスクリーニング開始前の状態に戻り、この間若干の治癒率向上が見られるものの、進行例の多くは未だ予後不良である。したがって、我が国における神経芽腫の臨床および基礎的研究の流れが大きく変化したことは明らかである。これまで我が国にとって最大の課題は、神経芽腫グループスタディが統一できず、その基盤研究支援体制が脆弱であったことである。しかし、本研究を含めた関係者の尽力により、日本神経芽腫スタディグループがようやく発足し、その基盤が確立されてきた。また、INPC 新国際分類を導入した神経芽腫中央病理診断体制の確立と、我々が世界に先駆けて開発に成功した神経芽腫予後予測用 DNA ミニチップの実用化は、我が国が今後難治性神経芽腫の撲滅に挑戦するための新しい基盤を作るために大きな貢献をしたものと思われる。また、これらは、ようやく体制作りが軌道に乗ってきた日本神経芽腫グループスタディと強く連携しており、我が国の新しい神経芽腫臨床研究とそのトランスレーショナルリサーチを加速させる原動力になるものと期待される。

#### E. 結論

主任及び分担研究者の施設が神経芽腫検体センター (中央病理診断と遺伝子診断) となり、日本神経芽腫スタディグループとの連携により、我が国における神経芽腫マススクリーニング休止後の新しい臨床研究体制が確立されてきた。また、第8回を迎えた神経芽腫研究会も基盤が固まり、我が国における神経芽腫トランスレーショナルリサーチの基盤作りと臨床研究ネットワークの構築に貢献することができた。今後、これらの体制基盤をさらに充実させていくことが重要である。

#### F. 健康危険情報

本研究により人の健康に危険となるようなことは考えられない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(主任研究者: 中川原 章)

1. Nakagawara A. Chapter 5. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. *In*

- Neuroblastoma*, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg, pp41-53.
2. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
  3. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
  4. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* 228:5-11, 2005
  5. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A, Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* 24:3385-3396, 2005
  6. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* 228:29-35, 2005
  7. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* 7:337-350, 2005
  8. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* 280:16665-16675, 2005
  9. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR. *J. Clin. Oncol.* 23: 5205-5210, 2005
  10. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 167:213-222, 2005
  11. Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.* 65:4587-4597, 2005
  12. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of *FBN2* correlates with progression of human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 50:43-49, 2005
  13. Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 96:653-660, 2005
  14. Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 96:729-737, 2005
  15. Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene* 24:7156-7169, 2005
  16. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogen* 25:917-928, 2006
  17. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* 46:285-291, 2006
  18. Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* 580:627-632, 2006
  19. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R,

- Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Moll. Cell. Biol.* 26:2758-2771, 2006
20. Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCCI*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* (in press)
21. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* (in press)
22. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* (in press)  
(分担研究者：秦 順一)
1. Shiozawa Y, Kiyokawa N, Saito M, Fujimoto J, Hata J, Yamashiro Y. Granulocytic sarcoma of the spine in a child without bone marrow involvement: a case report and literature review. *Eur. J. pediatr.* 164:616-620, 2005
2. Ukiyama E, Endo M, Yoshida F, Tezuka T, Kudo K, Sato S, Akatsuka S and Hata J. Recurrent yolk sac tumor following resection of a neonatal immature gastric teratoma. *Pediatric Surgery International.* 21:585-588. 2005
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
「難治性神経芽腫の克服に向けたトランスレーショナルリサーチの基盤作りと  
臨床研究ネットワークの構築」  
分担研究年度終了報告書

難治性神経芽腫克服へ向けたトランスレーショナルリサーチ確立のための基盤研究

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所長

**研究要旨** (1) 我が国における神経芽腫組織バンクの確立を目的とし、現在組織編成が行われている日本神経芽腫スタディグループと密接に連携した体制の構築に尽力した。また、登録された新規症例の検体に関し、従来の分子生物学的検査を継続的に行った。(2) 独自に開発した神経芽腫予後予測用実用化 DNA チップの臨床試験研究を民間企業に技術移管し、第3相の評価体制に入った。現在までに約50例の新規神経芽腫症例について検討を行った。(3) 我々が創設した「神経芽腫研究会」の第7回、第8回を開催し、我が国における分野を超えた神経芽腫の臨床研究ネットワークの構築がより展開され、日本神経芽腫スタディグループとの連携も実現した。

#### A. 研究目的

神経芽腫は小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度が高いにもかかわらず、進行した難治性神経芽腫の長期生存率は未だ30%にとどまっており、わが国でも緊急な対策を必要としている。一方、わが国の国家プロジェクトとして行われてきた乳児マスキニングは、大部分は自然退縮する神経芽腫を発見したに留まり、平成15年秋に休止された。そこで、我々は、我が国における新たなトランスレーショナルリサーチの基盤を確立することを目的とし、平成17年度は、神経芽腫組織バンクおよび分子生物学的診断体制をさらに充実させ、日本神経芽腫スタディグループとの連携を目指した。さらに、「神経芽腫研究会」による臨床研究ネットワークの構築を進め、これもグループスタディとの連携を試みた。

#### B. 研究方法

1. 神経芽腫組織バンクの確立と充実：千葉県がんセンター研究局に送られてきた検体に対しては、DNA, RNA を抽出し、MYCN 増幅を Southern blot 法、TrkA 発現を Northern blot 法、DNA ploidy を FACScan にて測定した。また、MYCN 増幅の測定には新たに FISH 法を導入した。神経芽腫の新たな腫瘍マーカーである

血中 Midkine レベルおよび HGF レベルの測定を行った

2. 実用化神経芽腫用 DNA ミニチップ：千葉県がんセンター研究局において神経芽腫各サブセットから抽出した約5,300 遺伝子を cDNA マイクロアレイ化したものを用いて開発した予後予測用実用化ミニチップを、SRL 株式会社へ技術移管し、第3段階の臨床試験研究として展開した。

(倫理面への配慮)

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

#### C. 研究結果

(1) 神経芽腫組織バンクの拡大・充実：マスキニング症例の検体がほぼ皆無となり、進行神経芽腫が大部分を占めた。また、長期経過を辿っている再発例などが多く見られるようになってきたことは注目に値する。検体受領後の通常検査としては、MYCN がん遺伝子のコピー数を FISH 法も導入して行い、DNA ploidy、TrkA 発現、血中 Midkine レベル、血中 HGF (hepatocyte growth factor) レベ

ルの測定を行った。

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

(3) 難治性神経芽腫克服のための新しい予後予測用 DNA ミニチップの開発とその臨床応用：In-house cDNA microarray を用いて我々が開発した神経芽腫予後予測用 DNA ミニチップ（選ばれた 200 遺伝子を搭載）を、民間大手臨床検査会社である SRL 株式会社に技術移管し、第 3 段階の前向き試験によるバリデーションを行うため、臨床試験研究として展開した。これまでに約 50 例について検証を行い、ほぼ満足のいく結果が得られている。

(4) 「神経芽腫研究会」の拡大と充実：平成 17 年度は、第 7 回および第 8 回の神経芽腫研究会を東京において開催した。セミクロズドの会であるが、分野を超えて神経芽腫に関連した基礎研究をしている研究者が多数参加し、臨床研究ネットワークの構築に重要な役割を果たした。また、第 8 回研究会は、日本神経芽腫スタディグループと連携して行い、大変有意義であった。

#### D. 考察

乳児神経芽腫マススクリーニングが休止されて 2 年以上が経過し、我が国における神経芽腫の臨床および基礎的研究の流れが大きく変化した。しかし、同時に、散発性神経芽腫の予後が現在も非常に厳しいものであることを改めて痛感させられる。平成 17 年度に送られてきた腫瘍検体もほとんどが進行症例または再発症例であった。これまで我が国にとって最大の課題は、神経芽腫グループスタディが統一できず、その基盤研究支援体制が脆弱であったことである。しかし、本研究を含めた関係者の尽力により、日本神経芽腫スタディグループがようやく発足し、その基盤が確立されつつある。また、我々が開発した神経芽腫予後予測用 DNA ミニチップは世界に先駆けて成功したものであり、その有用性が今回の前向き臨床試験による検証で強く裏付けられてきた。この DNA ミニチップ検査

は、神経芽腫グループスタディプロトコールの附随研究にも導入され、期待が持たれている。国際的な競争に勝てる枠組みを作り、難治性である進行神経芽腫の克服へ向けて全国的な取り組みを今後益々進める必要がある。

#### E. 結論

我が国における神経芽腫検体センターの充実と、その日本神経芽腫スタディグループとの連携が確立されてきた。また、神経芽腫研究会も基盤が固まり、我が国における神経芽腫のトランスレーショナルリサーチの基盤作りと臨床研究ネットワークの構築に貢献できることが期待される。

#### F. 健康危険情報

本研究により人の健康に危険となるようなことは考えられない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakagawara A. Chapter 5. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. *In Neuroblastoma*, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg, pp41-53.
2. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
3. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A., Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
4. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* 228:5-11, 2005
5. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A., Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* 24:3385-3396, 2005



6. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* 228:29-35, 2005
7. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* 7:337-350, 2005
8. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* 280:16665-16675, 2005
9. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR. *J. Clin. Oncol.* 23: 5205-5210, 2005
10. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 167:213-222, 2005
11. Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.* 65:4587-4597, 2005
12. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of *FBN2* correlates with progression of human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 50:43-49, 2005
13. Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 96:653-660, 2005
14. Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 96:729-737, 2005
15. Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene* 24:7156-7169, 2005
16. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogen* 25:917-928, 2006
17. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* 46:285-291, 2006
18. Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* 580:627-632, 2006
19. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Moll. Cell. Biol.* 26:2758-2771, 2006
20. Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCC1*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* (in press)
21. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* (in press)
22. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of *RASGRF2* and

RASSF1A in human non-small cell lung cancer.

*Oncol. Rep.* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
特になし

厚生労働科学研究補助金（子ども家庭総合研究事業）  
「難治性神経芽腫の克服に向けたトランスレーショナルリサーチの基盤作りと  
臨床研究ネットワークの構築」  
分担研究年度終了報告書

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

分担研究者 秦 順一 国立成育医療センター総長

研究要旨

難治性神経芽腫の多施設臨床研究の基盤となる中央病理診断システムを確立し、我が国における統一神経芽腫グループスタディにおける役割と位置付けについて検討した。また、神経芽腫の臨床研究に用いる新国際分類 INPC について普及活動を行い、国際的連携に基づく多施設臨床試験の確立に貢献した。

A. 研究目的および背景

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

B. 研究方法

- ① 神経芽腫の中央病理診断システムの構築
- ② 神経芽腫病理診断と病態の指標となる分子病態との関連
- ③ 新たな診断・治療法の開発のための検体リソースセンターの確立

C, D. 研究結果および考察

① 神経芽腫の中央病理診断システムの構築と国際的連携

神経芽腫の分類は多くのものが提唱されている。どのその中央病理診断に用いられる病理組織分類を決定する場合以下の点を考慮する必要がある。i) 国際的な共同研究への参加をも視野に入れ、WHO 分類またはそれに準じた国際的に通用する分類を用いること。ii) 使いやすい組織分類であること (User friendly)、iii) 診断の再現性のあること (Reproducible)、iv) 分類が病態 (予後) および腫瘍の生物学的特性と関連していること。以上の結果を踏まえて、神経芽腫の中央病理診断に用いる組織分類法を検討した結果、International Neuroblastoma Pathology Committee が策定した新国際分類 INPC を採用することにし、これを軸とした中央病理診断体制を確立した。

1) INPC 組織分類。

- 1) Neuroblastoma(NB)/subgroup
  - a) undifferentiated
  - b) poorly differentiated

- c) differentiating
  - 2) Ganglioneuroblastoma(GNB), intermixed
  - 3) Ganglioneuroma(GN)/subgroup
    - a) maturing
    - b) mature
  - 4) Ganglioneuroblastoma(GNB), nodular
- 2) FISH を導入した神経芽腫病理診断システム
- GNB・nodular type では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が、結節のどの部分がどのような分子遺伝学的背景を有するかの判別は、予後を推測するうえで重要である。そこで、組織切片を用いた FISH 法を開発し、MYCN がん遺伝子の増幅、1p 欠失、11p 欠失、17q 増加などを検索するシステムを確立した。

② 神経芽腫病理診断と病態の指標となる分子病態との関連

神経芽腫では病理組織像とともに病態の指標となる分子レベルの解析結果を総合して治療方針を決定すべきものである。病理組織診断と分子病態診断を相互に関連させるシステムを、トランスレーショナルリサーチ (TR) のための検体バンクの設立とともに主任研究者である中川原 章と検討し、両者の連携体制を確立した。

③ 日本神経芽腫多施設臨床研究 (JNBSG) の立ち上げと内容の充実

わが国の神経芽腫の治療および研究の個々の水準は決して低いものではないが、システム化の遅れによって国際的に必ずしも公認され、尊重されるものでなかったことの反省の上に立って、日本全国を対象とした多施設臨床研究実施の準備を進めた。その JNBSG と密に連携した中央病理診断、分子病態診断および検体バンクの設立に主任研究者と共に尽力し、ほぼその体制が確立した。

F. 健康危険情報

本研究により人の健康に危険となるようなことは考えられない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiozawa Y, Kiyokawa N, Saito M, Fujimoto J, Hata J, Yamashiro Y. Granulocytic sarcoma of the spine in a child without bone marrow involvement: a case report and literature review. *Eur. J. pediatr.* 164:616-620, 2005
2. Ukiyama E, Endo M, Yoshida F, Tezuka T, Kudo K, Sato S, Akatsuka S and Hata J. Recurrent yolk sac tumor following resection of a neonatal immature gastric teratoma. *Pediatric Surgery International.* 21:585-588. 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名                 | 論文タイトル名   | 書籍全体の編集者名             | 書籍名           | 出版社名            | 出版地        | 出版年  | ページ   |
|----------------------|---|-----------------------|---------------|-----------------|------------|------|-------|
| <u>Nakagawara A.</u> | Molecular and developmental biology of neuroblastoma. | N.K.Cheung & S. Cohn, | Neuroblastoma | Springer-Verlag | Heidelberg | 2005 | 41-53 |

雑誌

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名         | 巻号       | ページ       | 出版年  |
|--|--|--------------|----------|-----------|------|
| Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, <u>Nakagawara A.</u>  | Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells.               | Oncogene     | 24(5)    | 938-944   | 2005 |
| Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, <u>Nakagawara A.</u> , Ushijima T.   | CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas.   | Cancer Res.  | 65(3)    | 828-34    | 2005 |
| Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, <u>Nakagawara A.</u>  | A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas.   | Cancer Lett. | 228(1-2) | 5-11      | 2005 |
| Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, <u>Nakagawara A.</u> , Koseki H.                                     | Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. | Oncogene     | 24(21)   | 3385-3396 | 2005 |
| Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, <u>Nakagawara A.</u>   | Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death.   | Cancer Lett. | 228(1-2) | 29-35     | 2005 |
| Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, <u>Nakagawara A.</u> | Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas.              | Cancer Cell  | 7(4)     | 337-50    | 2005 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名                  | 巻号      | ページ         | 出版年  |
|--|---|-----------------------|---------|-------------|------|
| Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, <u>Nakagawara A.</u> | Identification of protein kinase A catalytic subunit beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function.                     | J. Biol. Chem.        | 280(17) | 16665-16675 | 2005 |
| Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, <u>Nakagawara A.</u> , Sugimoto T.   | Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction.                         | J. Clin. Oncol.       | 23(22)  | 5205-10     | 2005 |
| Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, <u>Nakagawara A.</u> , Nakagawa A, Sakai R.                                   | Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma.   | Am. J. Pathol.        | 167(1)  | 213-22      | 2005 |
| Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, <u>Nakagawara A.</u>              | LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma.  | Cancer Res.           | 65(1)   | 4587-97     | 2005 |
| Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, <u>Nakagawara A.</u> , Kimura H.                 | Aberrant methylation of FBN2 in human non-small cell lung cancer.   | Lung Cancer           | 50(1)   | 43-9        | 2005 |
| Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, <u>Nakagawara A.</u> , Kaneko Y.  | Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma.  | Cancer Sci.           | 96(10)  | 653-660     | 2005 |
| Ozaki T, <u>Nakagawara A.</u>  | p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world.   | Cancer Sci.           | 96(11)  | 729-737     | 2005 |
| Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, <u>Nakagawara A.</u> | UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination.  | Oncogene              | 24(48)  | 7156-7169   | 2005 |
| Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, <u>Nakagawara A.</u> , Takenaga K.   | Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. | Oncogene              | 25(6)   | 917-928     | 2006 |
| Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, <u>Nakagawara A.</u>   | Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan.  | Pediatr. Blood Cancer | 46(3)   | 285-291     | 2006 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名              | 巻号       | ページ       | 出版年  |
|--|--|-------------------|----------|-----------|------|
| Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, <u>Nakagawara A</u> , Taniguchi N.                   | High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis.  | FEBS Lett         | 580(2)   | 627-632   | 2006 |
| Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, <u>Nakagawara A</u> , Koseki H.  | Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals.            | Moll. Cell. Biol. | 26(7)    | 2758-2771 | 2006 |
| Machida T, Fujita T, Oo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, <u>Nakagawara A</u> . | Increased expression of pro-apoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. | Oncogene          | in press |           |      |
| Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, <u>Nakagawara A</u> .                                       | Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma.  | Oncogene          | in press |           |      |
| Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Suenaga Y, Ando S, Iida T., Nakajima T, <u>Nakagawara A</u> , Kimura H.                         | Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer.   | Oncol. Rep.       | in press |           |      |

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

|   |  |   |     |         |      |
|---|--|---|-----|---------|------|
| Shiozawa Y,<br>Kiyokawa N, Saito M,<br>Fujimoto J, <u>Hata J</u> ,<br>Yamashiro Y.              | Granulocytic sarcoma of the spine<br>in a child without bone marrow<br>involvement: a case report and<br>literature review | Eur. J.<br>pediatr.                             | 164 | 616-620 | 2005 |
| Ukiyama E, Endo M,<br>Yoshida F, Tezuka T,<br>Kudo K, Sato S,<br>Akatsuka S and <u>Hata J</u> . | Akatsuka S and Hata J. Recurrent<br>yolk sac tumor following resection<br>of a neonatal immature gastric<br>teratoma.      | <i>Pediatric<br/>Surgery<br/>International.</i> | 21  | 585-588 | 2005 |



## 研究成果の刊行物・別刷

# Molecular and Developmental Biology of Neuroblastoma

Akira Nakagawara

## Contents

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 5.1     | Neural Crest Development and Neuroblastoma                         | 41 |
| 5.1.1   | Genes of Neural Development and Molecular Targets of Neuroblastoma | 41 |
| 5.1.1.1 | Bone Morphogenetic Proteins  | 43 |
| 5.1.1.2 | <i>MASH1/hASH1</i>   | 43 |
| 5.1.1.3 | Phox2a and Phox2b  | 44 |
| 5.1.1.4 | Id   | 44 |
| 5.1.1.5 | <i>MYCN</i>  | 45 |
| 5.2     | Molecular Bases of Differentiation and Programmed Cell Death       | 45 |
| 5.2.1   | Molecular Aspect of Spontaneous Regression                         | 45 |
| 5.2.2   | Neurotrophic Factors and Their Receptors                           | 46 |
| 5.2.2.1 | Neurotrophins and Their Receptors in Neuroblastoma                 | 46 |
| 5.2.2.2 | Neurotrophin Signaling in Neuroblastoma                            | 46 |
| 5.2.2.3 | GDNF Family Receptors  | 48 |
| 5.2.2.4 | Other Factors and Receptors  | 48 |
| 5.2.3   | Functional Role of p53 Family Genes                                | 48 |
| 5.2.4   | Apoptotic Signals in Neuroblastoma                                 | 50 |
| 5.3     | Conclusions  | 50 |
|         | References   | 51 |

## 5.1 Neural Crest Development and Neuroblastoma

Cancer has its own face reflecting the characteristics of the tissue from which it is derived. This can be demonstrated by histopathologic examination, by immunohistochemistry, and/or by in situ hybridization. Recent advances in molecular biology and genetics have also revealed that these morphological distinctions among cancers are associated with differences in gene expression profiles within tumor cell and stromal cell components. Furthermore, the patterns of gene expression unique for each cancer are dictated by genetic abnormalities which have occurred in progenitors of the specific developmental lineage. Neuroblastoma originates from the sympathoadrenal lineage, and its biology is closely related to that of normal sympathetic neurons. In this chapter, the molecular and cellular bases for the genesis and biology of neuroblastoma are summarized.

### 5.1.1 Genes of Neural Development and Molecular Targets of Neuroblastoma

During neural development, neural crest cells migrate and differentiate into several cell lineages, e.g., melanocytes, sensory neurons, enteric ganglion cells, and sympathetic neurons (Fig. 5.1). The first signaling molecules which trigger crest cells to differentiate or migrate are bone morphogenetic proteins (BMPs) and their receptors (Huber et al. 2002). The commitment to differentiate into sympathetic neurons is associated with the transient expression of (a) basic helix-loop-helix transcription factors, e.g., *MASH1* (a proneural gene homologous to *drosophila achaete-*

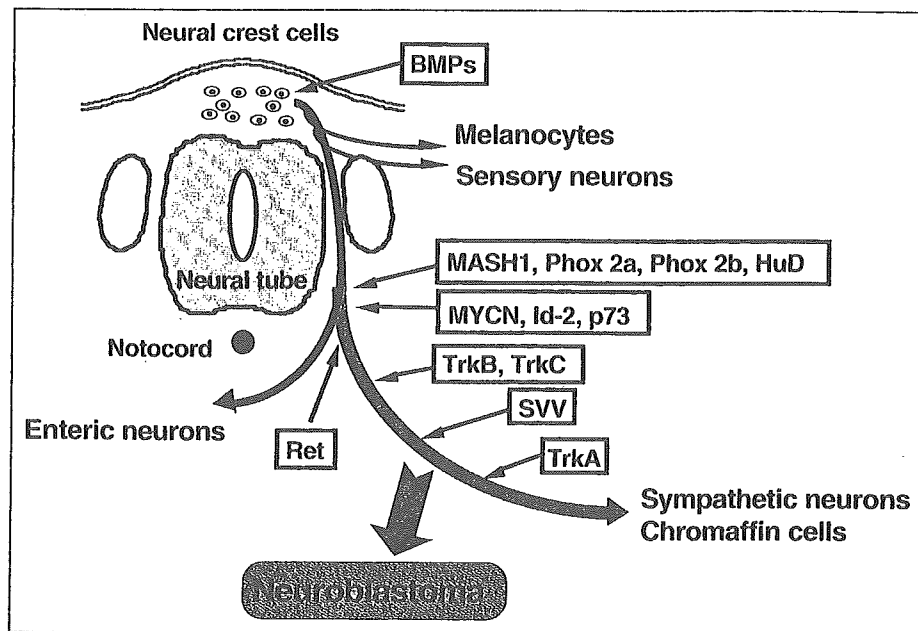


Figure 5.1

Neuroblastoma originates from the sympathoadrenal lineage of neural crest. The bone morphogenetic protein (BMP) signals may be important at the early stage of differentiation of neural crest cells. *MASH1* (*hASH1*) may function as one of the key transcription factors which define the direction of differentiation to sympathetic neurons. The other important nuclear factors, e.g., *Phox2a*, *Phox2b*, *HuD*, *MYCN*, *Id2*, and *p73*, may also be involved in the cell-fate determination. Some of those genes are often upregulated or amplified in aggressive neuroblastomas (Nakagawara 2004). At the stage of terminal differentiation of sympathetic neurons followed by programmed cell death, the signals through neuronal tyrosine kinase receptors, e.g., *Ret*, *TrkB*, *TrkC*, and *TrkA*, are necessary sequentially and/or in a form of crosstalk. The many genes involved in regulation of neuronal terminal differentiation or programmed cell death are often expressed at high levels in favorable neuroblastomas

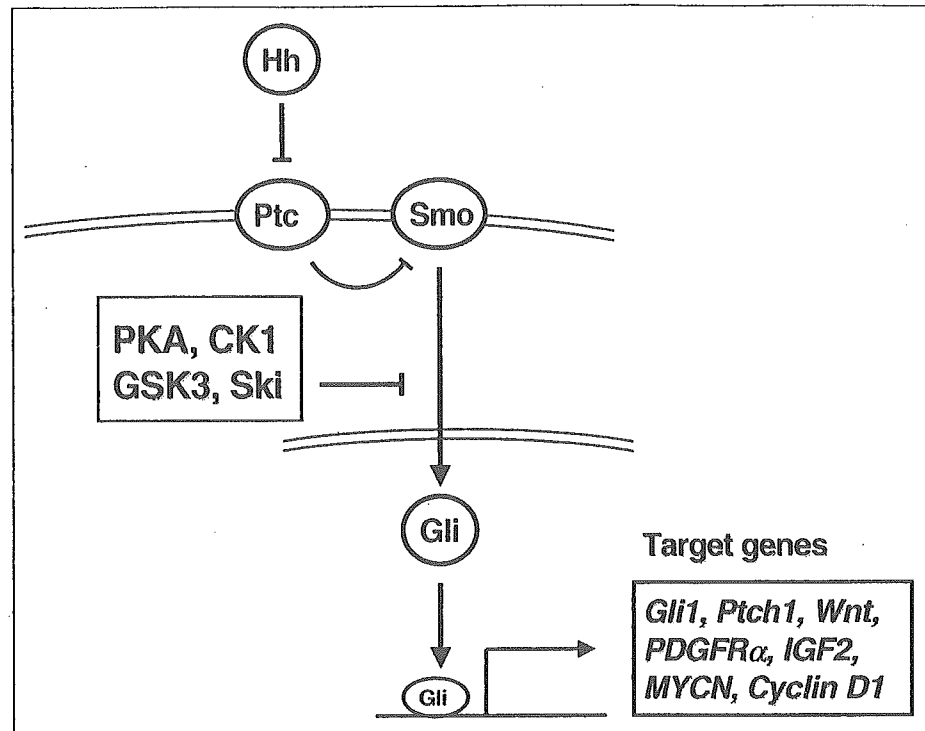
*scute*), *HES1*, *MYCN*, *HIF1 $\alpha$*  and *HuD*, (b) homeobox genes, e.g., *Phox2a* and *Phox2b*, and (c) *p73* (a family member of the tumor suppressor gene *p53*; Nakagawara 2004). Several lines of investigation support the importance of these genes. *MASH1* null mice lack sympathetic ganglion cells (Guillemot et al. 1993). Notch signaling, through its intracellular domain translocation into the nucleus, stimulates the transcriptional activation of the *HES1* and *HES5* genes whose products in turn inhibit transcription of the *MASH1* gene (Radtke and Raj 2003). *MYCN* is indispensable for the normal neural development. It induces *Id2* which is a negative regulator of *HES1* and *pRb*, a retinoblastoma suppressor (Lasorella et al. 2000). *p73* knockout mice also show abnormalities in cell survival in both the nervous and immune systems (Yang et al. 2000). Gene targeting of *HIF2 $\alpha$*  dis-

turbs the catecholamine metabolism in sympathetic neurons (Tian et al. 1998). All these genes regulate each other in an orchestrated manner to drive the correct differentiation of neural crest cells into sympathetic neurons.

Further downstream, terminal differentiation to mature sympathetic cells is strongly regulated by the signaling of neurotrophin family members and their receptors (Nakagawara 2001, 2004). In addition, other genetic aberrations associated with neuroblastoma have been mapped to specific genomic regions or genes well known to be important in regulating the normal development of neurons (Nakagawara 2001, 2004). It seems obvious that a relationship should exist between the genetic or biological targets of neuroblastoma and the key molecules involved in the normal development of neural crest cells.

Figure 5.2

Hedgehog-Gli signaling in neural development and tumorigenesis. Sonic hedgehog (Hh) signaling activates Gli transcription factors which then induce the target genes important for regulating neural differentiation as well as neuronal tumorigenesis. They include *MYCN*, *cyclin D1*, *IGF2*, and *PDGFR $\alpha$* , all of which are known to be players characterizing neuroblastoma biology. *T bars* show inhibitory interactions. *Arrows* show positive interactions.



### 5.1.1.1 Bone Morphogenetic Proteins

Bone morphogenetic proteins (BMPs), members of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily, may be the first signal that defines the early phase of differentiation and migration of neural crest cells during development (Oppenheim 1991). The ligand-dependent activation of BMP receptors transduces its signal into the nucleus through the sequential activation of Smad signaling molecules by phosphorylation. Although the role of BMPs in neuroblastoma has long been elusive, Nakamura et al. (2003) have recently reported that SH-SY5Y and RTBM1 neuroblastoma cell lines are responsive to BMP2 leading to growth arrest and differentiation. Of interest, BMP treatment also induces the downregulation of p53 family members including p53 and p73, as well as their target gene, *p21<sup>WAF1</sup>*. In contrast, a similar cyclin-dependent kinase inhibitor, *p27<sup>KIP1</sup>*, is markedly induced at the protein level by downregulation of Skp2, a component of its E3 ubiquitin ligase complex. BMP is also a direct transcriptional target of retinoic acid which induces neuroblastoma differentiation (see Chap. 15; Rodriguez-Leon et al. 1999). The DAN fam-

ily members are inhibitors of BMP, and are also expressed in neuroblastomas (Enomoto et al. 1994). The DAN gene itself, which is mapped to chromosome 1p36, is a transcriptional target of BMP (Nakamura et al. 2003; Shinbo et al. 2002), suggesting that the BMP signaling network may be important in the differentiation and survival of neuroblastoma (Nakamura et al. 2003). The role of other important signals which function during neuronal development, including Sonic Hedgehog (Shh) and Wnt, is less well known in neuroblastoma. Interestingly, the Shh downstream signaling molecule, Gli, can transactivate *MYCN* and *cyclin D1* (Altaba et al. 2004) (Fig. 5.2).

### 5.1.1.2 MASH1/hASH1

Achaete-Scute homolog-1 (*MASH1* in rodents and *hASH1* in humans) is a basic helix-loop-helix transcription factor which plays an important role in the early development of neural and neuroendocrine progenitor cells (Ball 2004). Helix-loop-helix proteins include achaete-scute homologs, E proteins, *MYCN*, *Math*, *NeuroD*, *neurogenin*, *Id*, and *HES*. Targeted disruption of *MASH1* in mice has led to the absence of