

Fig.8-b カテコールアミン類の XIC 及び MS/MS スペクトル

#### D. 結論

今回の実験により、内面逆相カラム及びイオンペア試薬を用いることにより血清中低分子の網羅的分析が可能となった。また microLC/MS 化を図ることにより分析の感度を向上させることができた。IDA による LC/MS/MS 分析は、血清中の種々の物質の構造情報を一度の分析で多量に取得しうる手法であり、今後の新規マーカーの検索に大きく貢献するものである。今回確立した分析法を用いて、現在、疾患試料を全国から集めていただきつつあり、いよいよ次年度からカテコールアミンの量関係と予後との関係を追及していくとともに新規マーカーの検索を進める。

#### E. 参考文献

- Ikue Morita, Tsutomu Masujima, Hisanobu Yoshida, and Hideo Imai  
Direct Plasma Injection Method for the Analysis of Tryptophan Metabolites by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Precolumn Deproteinization  
Jap. J. Clin Chem. 12: 312-318, 1983.
- Ming-Ren Fuh, Chiuan-Hung Haung, Shiang-Ling Lin and Wynn H. T. Pan  
Determination of free-form amphetamine in rat brain by ion-pair liquid chromatography/electrospray mass spectrometry with in vivo microdialysis  
J Chromatogr A. 1031:197-201, 2004.
- Qu J, Wang Y, Luo G, Wu Z, Yang C.  
Validated quantitation of underivatized amino acids in human blood samples by volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry.  
Anal Chem. 74: 2034-40, 2002.
- Kushnir MM, Urry FM, Frank EL, Roberts WL, Shushan B.  
Analysis of catecholamines in urine by positive-ion electrospray tandem mass spectrometry.  
Clin Chem. 48: 323-31, 2002.
- Lagerstedt SA, O'Kane DJ, Singh RJ.  
Measurement of plasma free metanephrine and normetanephrine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for diagnosis of pheochromocytoma.  
Clin Chem. 50: 603-11, 2004.
- Magera MJ, Stoor AL, Helgeson JK, Matern D, Rinaldo P.  
Determination of homovanillic acid in urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass

spectrometry.

Clin Chim Acta. 306: 35-41, 2001.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Tomomi Hasegawa, Eiso Hiyama, Katsuya Wada, and Tsutomu Masujima.

Pre-treatment and one-shot separating analysis of whole catecholamine metabolites in plasma by using LC/MS

Analytical and Bioanalytical Chemistry, in press.

- 長谷川朝美, 檜山英三, 和田克哉, 升島 努.

LC/MS によるカテコールアミン類及びその代謝物の一斉分析法の確立

日本マスキリーニング学会誌, in press.

##### 2. 学会発表

###### 第 12 回クロマトグラフィーシンポジウム

(福岡:2005 年 5 月 19・20 日)

LC/MS によるマスキリーニングのための尿中カテコールアミン類の分析法の開発

○久保田耕司, 杉山礼隆, 守田弘之, 青木悠里, 長谷川朝美, 升島 努, 前田昌子, 檜山英三

###### 第 18 回バイオメディカル分析科学シンポジウム

(静岡:2005 年 8 月 5 日~7 日)

LC/MS による神経芽細胞腫診断のための血清カテコールアミン代謝物の一斉分析

○長谷川朝美, 青木悠里, 久保田耕司, 升島 努, 檜山英三, 前田昌子

クライオディテクター MALDI-TOF/MS による高分子高感度分析

○青木悠里, 植村雅子, 小田 寛, Gertraund Hayn, Urs Matter, 升島 努

###### 日本分析化学会第 54 年会

(名古屋:2005 年 9 月 14 日~16 日)

LC/MS による神経芽細胞腫診断のための血清カテコールアミン代謝物の一斉分析

○長谷川朝美, 青木悠里, 久保田耕司, 升島 努, 檜山英三, 前田昌子

クライオディテクター MALDI-TOF/MS による高分子高感度分析

○青木悠里, 植村雅子, 小田 寛, Gertraund Hayn, Urs Matter, 升島 努

###### 日本マスキリーニング学会

(久留米:2005年10月7・8日)

LC/MSによる神経芽細胞腫診断のための血清カテコールアミン代謝物の一斉分析

○長谷川朝美、青木悠里、久保田耕司、升島 努、檜山英三、前田昌子

第16回クロマトグラフィー科学会議

(岐阜:2005年11月7・8日)

血中カテコールアミン代謝物一斉分析のための前処理法の確立及びLC/MS分析

○長谷川朝美、青木悠里、久保田耕司、升島 努、檜山英三、前田昌子

日本薬学会第126年会

(仙台:2006年3月28日～30日)

LC/MSによる神経芽細胞腫診断のための新規マーカーの検索

○長谷川朝美、植村雅子、吉田孟史、久保田耕司、升島 努、檜山英三

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 「マススクリーニング症例の病理組織研究と腫瘍特性」 —神経芽腫の組織型とその予後および生物学的特性との関連—

分担研究者 浜崎 豊 静岡県立こども病院臨床病理科

## 研究要旨

多施設、多数例の神経芽腫群腫瘍について組織学的、生物学的、年齢的要因あるいは臨床的予後などとの関連性を調査・研究し、乳児期、6カ月のマススクリーニング時期から1歳代、さらに年長児にわたる神経芽腫の組織型と生物学的特性、およびその予後との関連性を検討した。自然消退や成熟傾向を示すマススクリーニング発見神経芽腫は年齢的に12カ月を越えると症例数は減少するが、1歳半ばを境として、神経芽腫にみられる種々の組織型の比率は一定化する傾向があり、また、臨床的に発見される神経芽腫例が増加し、その死亡率もしだいに高くなる傾向がある。あわせて、組織学的に予後不良群に分類される神経芽腫の比率が年齢的には18カ月前後から高くなる。予後不良因子のひとつであるMYCN増幅例も未熟な組織型を示す神経芽腫での比率が高く、予後不良となる傾向を示す。このことは未熟な組織型およびMYCN増幅が1歳代から年長児における神経芽腫の予後不良の主たる要因となることを示唆している。

## A. 研究目的

神経芽腫においては、自然退縮して腫瘍縮小するもの、あるいは分化・成熟傾向を示して良性の神経節腫に移行する例、あるいは骨髄など多くの臓器に転移する予後不良な乳児例も存在するなど、臨床的にも多様性のある腫瘍であり、マススクリーニング休止後の神経芽腫患者について、その早期発見とその組織型を把握することにより治療への効果的な対応がはかられる。

前年度の研究結果を踏まえて、今年度は多施設、多数例の神経芽腫症例を調査研究対象とし、神経芽腫の組織型と年齢的因子、予後との関連性を詳細に検討した。また、生物学的特性のひとつとして、腫瘍細胞核のDNA量解析を利用したDNA倍数体と神経芽腫の組織型、予後との関連性の検討を進めた。あわせて、多数例の後ろ向き研究から組織型とMYCN増幅や予後との関連性なども調査研究することで、乳児から年長児まで広い範囲での神経芽腫の臨床病理学的、生物学的特性とその基本的概念を理解し、今後の治療法の改善に役立てることを目的とした。

## B. 研究方法

小児医療7施設、および乳児神経芽腫登録症例で組織学的検索および臨床所見、予後の調査がおこなわれた神経芽腫群腫瘍、997例（小児医療7施設656例、乳児神経芽腫登録341例）について、INPC (International Neuroblastoma Pathology Classification) 国際分類による組織型と年齢分布、予後との関連性を検討した<sup>1-3)</sup>。上記の神経芽腫群腫瘍

の997症例については、さらに、3カ月毎の年齢区分と組織型との関連性を検討した。また、組織型と年齢分布についてはさらに1施設（国立成育医療センター）の症例を加えた1121例の検討を加えた。

神経芽腫症例における予後不良因子のひとつであるMYCN増幅の有無については527例を、また、乳児神経芽腫や予後との関連性がいわれているDNA倍数体解析では474例について、いずれも組織型、予後との関連を検討した。

以上の検索により、乳幼児から年長児にわたる神経芽腫群腫瘍全体としての組織型とそれらの年齢分布、および予後との関連性を検討し、とくに二次スクリーニング時期の1歳から2歳にかけての神経芽腫の発生とその予後を予測した。

なお、多数例の調査にあたっては、各施設で患者名を匿名化してデータベースを集計し、個人情報保護についても配慮した。各症例の組織診断については、各施設の小児病理医がINPC基準を熟知しているため、上記の施設病理医の診断に従った。乳児神経芽腫登録例の診断については、中央病理診断によった（浜崎、八反田、中川）。

共同研究者：岸本宏志（埼玉県立小児医療センター病理部）、田中祐吉（神奈川県立こども医療センター病理科）、小林庸次（大阪市立総合医療センター病理部）、中山雅弘（大阪府立母子保健総合医療センター検査部）、堀江 弘（千葉県こども病院検査部）、横山繁昭（北海道立小児総合保険センター検査部）、秦 順一（国立成育医療センター）、家原知子、杉本 徹（京都府立医科大学小児科）

C. 研究結果

1) 神経芽腫の組織型について

INPC 国際分類により神経芽腫群腫瘍 997 例の組織型を分類した結果（表 1）、全体として、undifferentiated neuroblastoma (NB)（未分化型神経芽腫）が 2.8%、poorly differentiated NB（低分化型神経芽腫）が 80.0%、differentiating NB（分化型神経芽腫）が 8.1%、ganglioneuroblastoma (GNB) intermixed（混成型神経節芽腫）が 2.9%、GNB, nodular（結節性神経節芽腫）が 1.9%（予後良好型 0.6%、予後不良型 1.3%）、ganglioneuroma（神経節腫）が 4.2% であり、低分化神経芽腫の頻度が高いが、死亡率でみると、未分化型神経芽腫、および核分裂像、核

破壊が目立つ（high MKI）低分化型神経芽腫が 40% 以上の死亡率を示し、腫瘍細胞の未熟な組織型での予後不良が明瞭である。さらに年齢分布と組織型を 1121 例で検討してみると、神経芽腫の組織型は 18 ヶ月前後から比較的一定の比率を示すようになり、予後因子として年齢的因子を加えると、予後不良群の割合が高くなる。それとともに、2 歳頃から良性的神経節腫が年齢とともに多く認められる（図 1）。

2) マス例、非マス例と組織像との関連性

これらの症例をマス例、非マス例に分類して検討してみると、マス例が、69.7%、非マス（臨床）例が 30.3% を占め、マス 695 例についてみると（87.5% は 6 ヶ月から 12 ヶ月までの乳児症例で、腫瘍死は全体で 1 例のみ）、予後不良

群が 2.7% に対して、予後良好群は 97.3% で、組織型としては、核分裂像などの少ない（low MKI）低分化型神経芽腫が 74.5% を占めている。一方、非マス 302 例では、予後良好群が 52.0%（死亡率 5.2%）に対して、予後不良群は 48.0%（死亡率 58.8%）と死亡率の高い予後不良群の比率が高く、また、組織型でみても、未分化型神経芽腫が 8.3%、低分化型神経芽腫が 68.2% と、未熟な神経芽腫の頻度が高い。

3) 神経芽腫の年齢分布

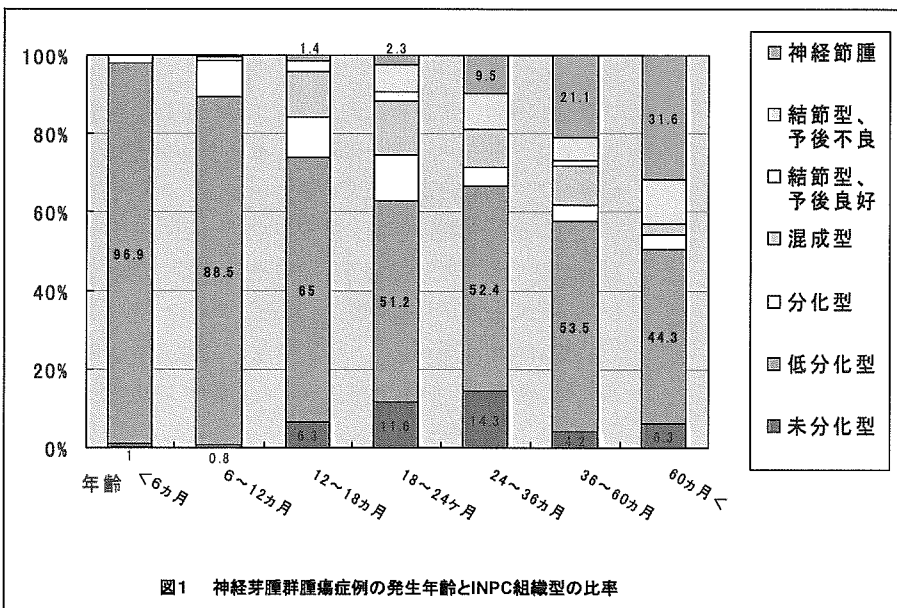
症例の年齢分布をみると、マス例と非マス例で年齢分布が大きく異なり、マス例では、これまでのマスキリーニングの結果として、6 ヶ月から 12 ヶ月症例が大半を占める。乳児神経芽腫の年齢分布と組織所見については、1 歳代についての症例数が少なく詳細な検討ができていないが、また、12 ヶ月から 24 ヶ月まででは死亡例もみられていない。非マス例では、6 ヶ月前から年長児まで、発生頻度がほとんど一定していて、18 ヶ月前後でマス例と非マス例の発見頻度の割合が交差し、この年齢以降、非マス例の頻度が高くなる（図 2）。

生後 12 ヶ月から 24 ヶ月の 1 歳代の神経芽腫症例数が限られているので、統計的解析は控えたが、今

表 1 神経芽腫の年齢別の組織型とその予後

神経芽腫組織型	年齢	6か月未満	6-12か月	12-18か月	18-24か月	24-36か月	36-60か月	60か月以降	計
未分化NB	例数	1	6	4	4	6	2	5	28
	死亡		1	1	2	5		3	12(42.9%)
低分化型NB High MKI	例数	4	17	3	5	9	2	6	46
	死亡	2	2	1	2	8	2	3	20(43.5%)
低分化型NB Intermed.MKI	例数	13	64	2	4	5	7	10	106
	死亡		1	1	1	4	2	6	14(13.3%)
低分化型NB Low MKI	例数	59	496	40	9	4	22	17	647
	死亡	3	1(ADM)*		3	3	15	10	35(5.4%)
分化型NB	例数	2	59	9	3	2	3	3	81
	死亡						1	1	2(2.5%)
混成型GNB	例数		6	9	6	3	3	2	29
	死亡					1	1		2(6.9%)
結節性GNB Fav.	例数		2	2	1		1		6
	死亡								0(0%)
結節性GNB Unfav.	例数				3	3	1	6	13
	死亡				1	1	1	4	7(53.8%)
神経節腫	例数			1	1	4	14	22	42
死亡率		6.3%	0.6%	4.3%	25.0%	61.1%	40.0%	38.0%	9.2%

\* ADM: Adriamycinによる副作用死  
 (小児医療7施設および乳児神経芽腫登録、マス・非マス例を含む997例の組織型と予後)



回の3ヵ月毎の年齢区切りの集計を利用して、12ヵ月、15ヵ月、18ヵ月、21ヵ月をそれぞれひとつの時点として、その前後3ヵ月の症例を加え、その死亡率をみることで、比較的、早期発見できる時点を推測した。その結果、12ヵ月前後での死亡率は1.6%、15ヵ月では5.7%、18ヵ月では15.6%、21ヵ月では25.0%であり、15ヵ月前後と18ヵ月前後での死亡率に差が認められた(表2)。

4) 神経芽腫の組織型と MYCN 増幅との関連性

小児医療7施設、681例で検索された MYCN 増幅の有無についての検討では、非マス、非増幅の123例でみると、組織型による差はみられないが、30.1%が死亡し、とくに2歳以降に死亡率が高い。非マス、MYCN 増幅の56例では、未分化型、低分化型神経芽腫での増幅例の比率が高く、58.9%が死亡し、とくに18ヵ月以降に死亡率が高くなっている。一方、マス例のうち大半を占める非増幅の369例では、年齢、組織型による差異は少なく、マス例での増幅例は6~12ヵ月の323例中、3例(0.9%)のみである。

組織型を予後良好群と予後不良群に分類すると、予後良好群の460例では、非増幅が415例で、MYCN 増幅が45例(9.8%)である。一方、予後不良群67例では、非増幅が52例に対し、増幅が15例(22.4%)とやや MYCN 増幅例の頻度が高い。

詳細な組織型でも、分化型神経芽腫例よりも未熟な、すなわち未分化型、低分化型神経芽腫での MYCN 増幅症例の頻度が高い(図3)。

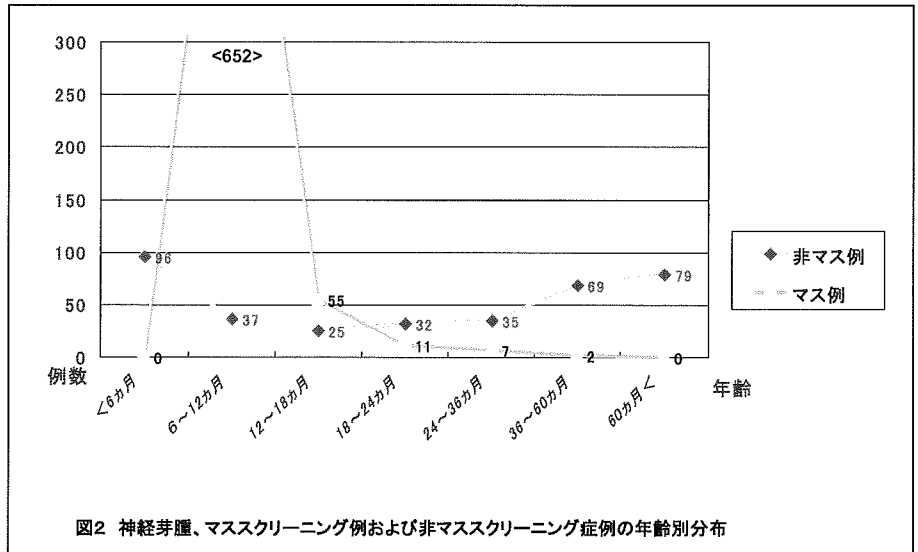


図2 神経芽腫、マスキング例および非マスキング症例の年齢別分布

表2 神経芽腫の発生年齢分布についての予測 -とくに12ヵ月から24ヵ月における-

症例 (401例)	設定年齢 年齢幅	<12ヵ月>	<15ヵ月>	<18ヵ月>	<21ヵ月>
		9ヵ月~ 15ヵ月	12ヵ月~ 18ヵ月	15ヵ月~ 21ヵ月	18ヵ月~ 24ヵ月
予後不良群		14 (死亡4)	7 (死亡2)	17 (死亡6)	22 (死亡9)
予後良好群		236 (死亡0)	63 (死亡2)	28 (死亡1)	14 (死亡0)
計		250 (死亡1.6%)	70 (死亡5.7%)	45 (死亡15.6%)	36 (死亡25.0%)

年齢が1歳から2歳までの神経芽腫の分布を推測するために、仮に設けた設定年齢の前後3ヵ月における神経芽腫症例を予後不良群、予後良好群に分類して検討した。全体としてみると、年齢とともに死亡率が増加するが、とくに15ヵ月前後から18ヵ月前後において、死亡率の増加傾向がみられる。

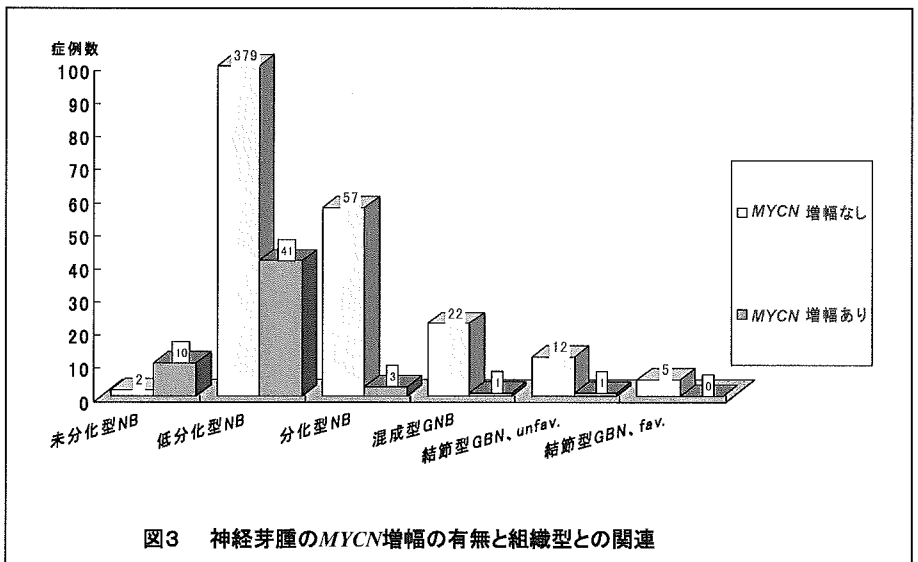


図3 神経芽腫の MYCN 増幅の有無と組織型との関連

5) 組織型と DNA 倍数体との関連性

神経芽腫群腫瘍で DNA 倍数体解析を施行した 474 例について、DNA 倍数体と MYCN 増幅や組織型との関連性でみると(タイプ 1:3 倍体および MYCN 非増幅、タイプ 2:2 倍体/4 倍体および MYCN 非増幅、タイプ 3:2 倍体/4 倍体および MYCN 増幅)、非マス例でタイプ 1 の 38 例では、26.3% が死亡し、とくに 18 カ月以降に死亡率が高い。非マス例でタイプ 2 の 60 例では、31.7% が死亡し、2 歳以降に死亡率が高い。非マス例でタイプ 3 の 39 例では、59.0% が死亡し、しかも年齢にかかわらず死亡率が高い。

一方、マス例では、タイプ 1 の 255 例、タイプ 2 の 89 例、およびタイプ 3 の 2 例では、タイプ分類と予後との関連性に乏しく、タイプ 1 で 3 例の死亡(1.2%)があるのみである。組織学的な面では(図 4)、予後良好群の 398 例のうち、タイプ 1 が 276 例、タイプ 2 は 102 例、タイプ 3 は 20 例を占める。一方、予後不良群 76 例では、タイプ 1 が 17 例、タイプ 2 が 38 例、タイプ 3 が 21 例を占め、マス例に比較して、組織型では未分化型、低分化型神経芽腫、タイプ別ではタイプ 3 が多い傾向がある。

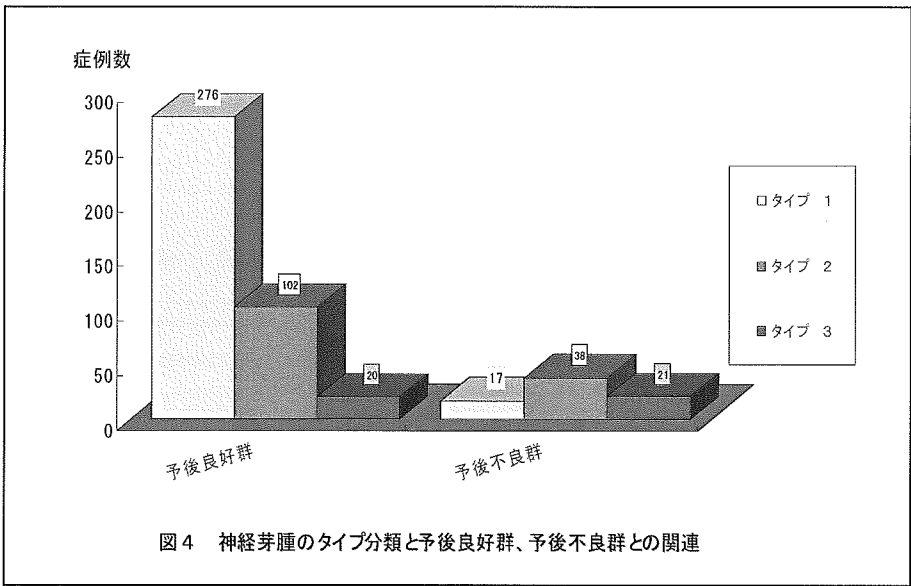


図 4 神経芽腫のタイプ分類と予後良好群、予後不良群との関連

6) 神経芽腫群腫瘍と予後との関連性

乳児神経芽腫から年長児神経芽腫までの 997 例の内訳では、12 カ月までの 729 乳児例(全体の 73%)のうち、マス発見例は 620 例とその 85% を占め、マス例では腫瘍死亡例はないが、非マス 109 例では 10% が死亡している。12 カ月から 24 カ月までの症例は 106 例で、マス 66 例での死亡はないが、非マス 40 例のうち、13 例が死亡している(32.5%の死亡率)。2 歳以降には良性の神経芽腫の症例

も増加するので、マス例、非マス例ともに、予後良好群の死亡率は少ないが、非マス例の予後不良群では、2 歳以降の 106 例のうち 69 例が死亡している(死亡率 65%)。

D. 考察

神経芽腫群腫瘍においては、とくにマスキリーニングで発見された乳児期腫瘍の大半は、多数例の組織学的検索や無治療例の臨床経過からみると、12 カ月ないし 18 カ月頃から退縮傾向あるいは腫瘍成熟の傾向を示し、予後良好の経過をたどることが分かっている<sup>4,5)</sup>。

今回のより多数例の詳細な組織型と年齢分布の検討でも、上記と同様、マス発見例の大半は予後良好群の範疇に入る。また、年齢が 12 カ月から 24 カ月の間に、組織学的な予後不良群の症例が増加する時期があり、臨床的にも予後不良の症例も増加する傾向がある。

神経芽腫の生物学的特性においても、DNA 倍数体と組織型、予後との関連性が認められ<sup>6)</sup>、予後良好なタイプ 1 は乳児期に多いことが確かめられ、予後不良なタイプ 2、タイプ 3 は 18 カ月ないし 24 カ月頃からの比率の増加があり、組織型でも、未熟型でのタイプ 3 の比率が高くなっている。

神経芽腫の予後との密接な関連性が考えられている腫瘍組織の MYCN 増幅に関しても、未分化型神経芽腫や低分化型神経芽腫など、未熟な神経芽腫症例で MYCN 増幅傾向があり、年齢的にも 18 カ月頃から、腫瘍組織での MYCN 増幅の比率が高くなる。

6 カ月マスキリーニング休止後、乳児神経芽腫に関しては、前年度の報告でも述べたごとく、年長児になってから良性の神経節腫が発見される頻度が増加する可能性があり<sup>5,7)</sup>、これまでの乳児神経芽腫での無治療経過観察などで解明されてきた腫瘍成熟などの特異的な生物学的形質を踏まえて、治療を再度、模索することになる。

進行神経芽腫に対しては、今回の検討結果を考えると、1 歳 6 カ月前後における早期発見をどうするかが課題となる。

マスキリーニングによる発見のほかにも、小児科領域での受診時の検査の普及により早期の発見も期待される。

今回の後ろ向き臨床病理学的な検討に加えて、今後の課題としては、1) 12 カ月から 24 カ月の症例についての統計

学的解析、2) マススクリーニング陰性例で、その後に発症した神経芽腫例の検討、3) 組織学的に予後良好群であるが、臨床的には予後不良であった症例の検討、などがあげられる。

## E. 結論

今回の多数例の後ろ向き調査研究により、マス発見例と非マス（臨床）発見の神経芽腫群腫瘍の間には組織学的、生物学的、および予後に大きな差異のあることが解明された。神経芽腫の組織型と年齢分布、MYCN増幅、DNA倍数体などの生物学的特性との間に関連性のあることも示唆された。今回の調査研究が神経芽腫の早期発見、早期治療の一助となり、今後の神経芽腫治療における基本資料になるものと考えている。

## F. 参考文献

1. 小児腫瘍組織分類委員会：神経芽腫群腫瘍—国際分類INPCによる— 小児腫瘍カラーアトラス 第2巻 第1版 金原出版 2004.
2. Shimada H, et al: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. Cancer, 86:349-363,1999.
3. Shimada H, et al: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system) . Cancer, 86:364-372,1999.
4. 水田祥代、他：マススクリーニングで発見され無治療で経過観察された神経芽腫 82 例 - 日本小児がん学会 平成 10 年— 12 年度神経芽腫委員会報告— 小児がん, 39:131-136, 2002.
5. 浜崎 豊、小林庸次、中山雅弘、田中祐吉：神経芽腫の減少について—マススクリーニング発見神経芽腫摘出の影響—。 小児がん 40:182-185, 2003.
6. 浜崎 豊、岸本宏志、田中祐吉、山本圭子：神経芽腫の予後、とくに DNA ploidy によるタイプ分類および組織型との関連性。小児がん 42:216-221, 2005.
7. 浜崎 豊： マススクリーニング症例の病理組織研究と腫瘍特性に関する研究—神経芽腫の組織型とその年齢分布、予後との関連性—。平成 16 年度厚生労働科学研究（子ども家庭総合研究事業） 神経芽細胞腫マススクリーニング研究報告書、95-99、2005.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 浜崎 豊、岸本宏志、田中祐吉、山本圭子：神経芽腫の予後、とくに DNA ploidy によるタイプ分類および組織型との関連性。小児がん 42:216-221, 2005.
- 2) 浜崎 豊： マススクリーニング症例の病理組織研究と腫瘍特性に関する研究—神経芽腫の組織型とその年齢分布、予後との関連性—。平成 16 年度厚生労働科学研究（子ども家庭総合研究事業） 神経芽細胞腫マススクリーニング研究報告書、95-99、2005.

### 2. 学会発表

- 1) 浜崎 豊、小林庸次、中山雅弘、田中祐吉、岸本宏志、堀江 弘、横山繁昭、他： 神経芽腫の臨床病理学的検討 - 多施設、多数例の調査・研究 - . 第 21 回日本小児がん学会 宇都宮 2005.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



# 神経芽細胞腫の網羅的遺伝子異常と特性解析

檜山英三<sup>1,2</sup> 山岡裕明<sup>2</sup> 末田泰二郎<sup>2</sup> 檜山桂子<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究支援分野生命医科学研究開発部

<sup>2</sup> 広島大学病院小児外科

<sup>3</sup> 広島大学原爆放射線医科学研究所 遺伝子診断治療開発

## 研究要旨

神経芽細胞腫は、その予後が腫瘍特性に大きく依存し、神経芽細胞腫マススクリーニング（マス）の施行により、臨床面からいくつかのサブグループに分かれることが明らかになってきた。腫瘍特性の解析としては、従来さまざまな面から解析され、*MYCN* 増幅をはじめ 1 p 欠失、11q 欠失、17q 増加など多くの予後関連因子が報告されてきた。そこで、マスによって多く無症状で発見された分化/退縮腫瘍と、症状発現から発見され予後不良であった腫瘍を用いて、網羅的に遺伝子異常の解析を行うことで、腫瘍特性の層別化を試みるとともに、従来報告されてきた様々な予後関連因子を同一のプラットフォームで解析することで、重要な予後因子を選別することを目的とした。昨年度に引き続き、マス発見例 60 例を含む 125 例を対象とし、遺伝子変化は SNPs アレイ (Affymetrix 社製) を用いて検索した。遺伝子異常のパターンは 4 群に分かれ、ほとんど異常ないもの (Silent 型)、それぞれ染色体全体が増減しているもの (Whole Gain/Loss 型)、染色体の一部の増減があるもの (Partial Gain/Loss 型) と、*MYCN* 領域の増幅を認めるもの (*MYCN* 増幅型) の 4 群に大別し得た。その予後は、Whole Gain/Loss 型 42 例は 1 例を除いて生存し極めて予後良好であったのに対し、*MYCN* 増幅型 32 例は 4 例を除き予後不良であった。Silent 型 23 例、Partial Gain/Loss 型 28 例は予後良好型と不良型がほぼ半数であり、中間の悪性度であった。そこで、これらの 51 例の腫瘍の遺伝子発現を全ゲノム型の CodeLink Whole Genome Array (55K) にて検討した。その結果、約 2,500 遺伝子の発現パターンにより明らかに予後良好腫瘍と予後不良腫瘍を層別化することができた。以上から、神経芽細胞腫の生物学的特性はゲノム異常に依存しており、ゲノム異常の解析が予後予測に極めて有用であることが示唆された。さらに、中間群では遺伝子発現レベルが予後を左右していることから、これらの遺伝子発現変動の原因となっている遺伝子異常について詳細に検討することで、本腫瘍の生物学的特性の本質を解明できる可能性が示唆された。

## Summary

### Genomic alterations and biological characteristics in neuroblastoma.

Eiso Hiyama, Hiroaki Yamaoka, Taijiro Sueda, Keiko Hiyama.

Natural Science Center for Basic Research and Development, Dept. Surgery., Graduate School of Biomedical Science, Translational Cancer Research, RIRBM, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

Prognosis of the patients with neuroblastoma mainly depends upon biological characteristics of tumor cells. Japanese mass-screening (MS) program turned out the existence of several clinically heterogeneous subgroups in neuroblastoma. Biological characteristics have been examined in various fields and many factors including *MYCN* amplification, 1p deletion, 11q deletion and 17q gain have been reported as prognosis-associated factors. In this study, to distinguish heterogeneous subgroups in neuroblastoma and identify essential factors for this grouping, genomic alterations in whole genome were analyzed in neuroblastoma tissues including regressing/maturing tumors detected by MS and aggressive tumors. This method is capable to compare many prognosis-associated factors previously reported in the same platform, resulting in the selection of essential factors to distinguish tumor biology.

Since last year, genomic DNA extracted from 125 neuroblastomas including 60 MS-detecting tumors has been analyzed by single-nucleotide polymorphisms (SNPs) arrays (Affimetrix® GeneChip Human Mapping Array). The pattern of genomic alterations in neuroblastoma was classified into four groups as follows: tumors with no apparent alteration in genome (silent type), those with gain or a loss of whole chromosome (whole gain/loss type), those with partial gain and loss of a chromosome (partial gain/loss), and those with amplified 2p region including *MYCN* gene locus (*MYCN* amplified type). All 42 patients with whole gain/loss tumors are alive disease-free except for 1 case, while only 4 of 32 patients with *MYCN* amplified tumors are alive disease-free. These results of SNPs array showed that whole gain/loss tumors are favorable and *MYCN* amplified tumors are unfavorable. In 51 cases with the remaining two types, approximately half of the patients had poor prognosis, indicating that these two types showed intermediate grade of malignancy. Then, we examined the gene expression analysis for whole human genes using CodeLink Whole Genome Array in these 51 cases. The expression levels of approximately 2500 genes were different between the tumors with good prognosis and those with poor outcomes.

In neuroblastoma, the pattern of genomic alteration is considered as a useful prognosis-predicting factor. In intermediate types (partial gain/loss and silent types), cluster of genes which are differentially expressed between favorable tumors and tumors with poor outcome indicates that the analysis of these genes and gene network in detail might reveal the key genes responsible for the biological behavior of neuroblastoma.

## A. 研究目的

神経芽細胞腫の予後は、その細胞の腫瘍特性に大きく依存し、退縮或いは分化する腫瘍がある一方、大量化学療法によっても腫瘍が増大し、予後が極めて不良な腫瘍まで存在する<sup>1)</sup>。一方、1才を越える頃から悪性度が高く、転移或いは再発を繰り返す予後不良例も多くみられる。この違いは、腫瘍のゲノム異常に起因していることが推測され、昨年度の多標的仮説に基づいた罹患過程の数理モデル化・罹患年齢に関するモンテカルロ数値実験による検討結果においても、受精早期のゲノム異常がその腫瘍の発生時期と特性に大きく関与していることが推察された。特に、本邦では生後6ヶ月児の神経芽細胞腫マススクリーニング事業によって、従来診断されず、分化退縮していた腫瘍が数多く発見され、発症率が倍増した。さらに、その事実から、臨床診断がついても無治療で経過観察する試みが行われ、この経過観察中に後になって切除された腫瘍の多くが、分化傾向が観察されたこともそれを支持するエビデンスである。

こうした神経芽細胞腫の腫瘍特性に関しては、1980年頃から多方面で検討され、1番染色体単腕(1p)異常をはじめ、多くの異常が報告されてきた<sup>1)</sup>。それぞれの異常について、予後と関連していることが示されてきているものも少なくなく、異常があることが予後不良のマーカーともいえる程である。しかし、一方で、染色体の異数性、特に三倍体は、他の腫瘍とは異なり、予後がきわめて良好であることも知られている。その検査法は、*MYCN* 遺伝子増幅に関しては、サザンブローディング法、定量PCR法、FISH(Fluorescence in situ hybridization)法、染色体異常の検査では、染色体分析、RFLP(restriction fragment length

polymorphisms)法、microsatellite analysis, SNP(single nucleotide polymorphisms)法など様々な検討方法が存在する<sup>2)</sup>。従来これらの遺伝子異常は、個々に解析を行ってきたが、他の異常と共に同時に網羅的に検討し、遺伝子異常の頻度とその重み付けを行うべき時代であると考えられる。その方法として開発されたのがCGH(comparative genomic hybridization)法であるが、感度が悪い一方極めて煩雑であった。近年のナノテクノロジーの進歩により、マイクロアレイの技術が進歩し、アレイCGH、さらにSNPsアレイが開発された。この方法を用いることで、神経芽細胞腫の遺伝子異常を網羅的に解析できると考えられ、今回検討した。

## B. 研究方法

### 対象

1991年以降、広島大学およびその関連施設で化学療法前に切除した神経芽細胞腫腫瘍125例を対象とした。INSS病期分類(括弧内はマススクリーニング発見例60例)はINSS分類で、1:23例(20例)、2A:11例(8例)、2B:15例(10例)、3:22例(13例)、4:43例(4例)、4S:11例(5例)、病理分類(嶋田分類)はfavorable:71例(57例)、unfavorable:49例(3例)であった。切除腫瘍は、病理学的確認後、使用まで-80度に冷凍保存した。また、治療前の末梢血を採取し、有核細胞を採取し、患児の体細胞として-80度に冷凍保存した。

### 方法

切除腫瘍を粉碎後、末梢血細胞はそのペレットを

Proteinase K 処理し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールにて除蛋白し、DNA を抽出した。

遺伝子異常の検索 (図 1) は、GeneChip® Human Mapping 100K Set (Affymetrix 社製) を用いて、ヒトゲノム上の約 10 万個の SNPs を検索した。DNA 250 ng を制限酵素 (*Xba* I または *Hind* III) で処理しアダプターをライゲーションしたのちにアダプターに相補的なプライマーを用いた PCR で増幅し、その後断片化して、エンドラベルして、SNPs Chip にハイブリダイズした。シグナルは専用のスキャナーで読みとり、体細胞の解析データと併せて、各 SNP のアレールシグナルとコピー数を算出した。

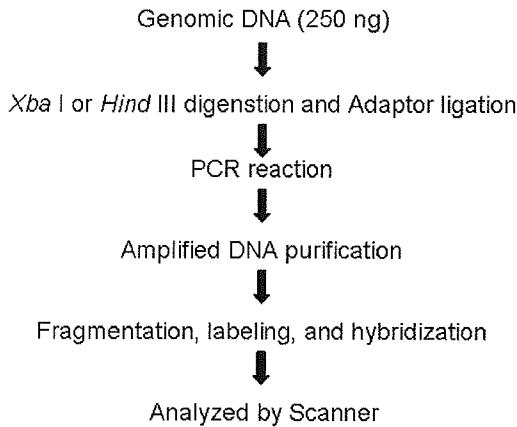


図 1: GeneChip® を用いた検索法

これらの解析には、主に解析用ソフト (CNAG) を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

今回使用した検体は、全て、広島大学医学部倫理委員会承認の「小児固形腫瘍の染色体および遺伝子解析」(承認番号医倫ヒ第 20 号) 研究に基づき、同意が得られているもののみを使用した。

**C. 研究結果**

対象とした 125 例について、その遺伝子異常を網羅的に解析した。その結果、大きな増減を検討すると、以下の 4 群に層別することができた (図 2)。

- A: Silent 型: 大きなゲノム異常を認めないもの。
- B: MYCN 増幅型: 2 番染色体単腕の MYCN 領域に明らかに増幅を認めるもの。
- C: Partial gain/loss 型: 染色体の部分的な増減をみとめるもの。
- D: Whole gain/loss 型: 染色体全体として増減をみとめるもの。

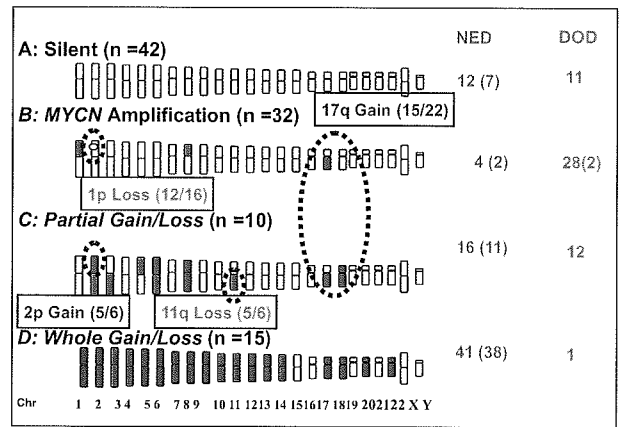
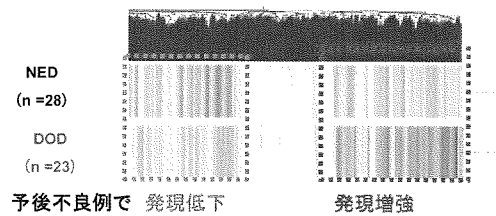


図 2: SNPs でのゲノム異常パターン



NED: no evidence of disease DOD: died of disease  
図 3: 遺伝子の網羅的解析 (whole genome 型 CodeLink 発現解析)

予後との関連を検討すると、MYCN 増幅型の 32 例中 28 例が死亡し、一方、Whole gain/loss 型の 42 例中 41 例が無病生存しており、相対する結果であった。残りの Partial deletion/loss 型では 28 例中 12 例が腫瘍死し、Silent 型でも 23 例中 11 例が腫瘍死で、予後良好なもの和不良なものに両者が混在していた。よって、ゲノム異常からは、Whole gain/loss 型は予後良好な特性を有していることが示唆された。一方、MYCN 増幅型は、従来から指摘されているように予後不良で、残りの二群はその中間に位置するものと考えられた。そこで、この Partial deletion/loss 型を少し細かく観察すると、17 番染色体長腕 (17q) の gain のある症例が予後不良で、この 17q gain は MYCN 増幅群にも少なからず認められた。さらに、11q loss と 2p gain を伴う症例が存在し、これらの症例に MYCN 増幅や 17q gain は希であるが、予後は不良であった。以上から、神経芽細胞腫の予後不良因子は単一でなく、幾つか存在することが示唆された。

Partial deletion/loss 型と Silent 型に予後不良例と予後良好例が混在していることから、これらの群 51 例の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、予後良好であった 28 例が不良例に対して 2 倍以上に発現上昇した遺伝子が 842 個、発現低下した遺伝子が 1174 個、クラスタリング解析にて同定された。(図 3)。これらから、この中間型の 2 群

においては遺伝子発現解析によって悪性度を層別化することが可能であることが示された。また、これら遺伝子発現を詳細に検討し、特に Silent 型において、小さな遺伝子異常に起因した遺伝子発現変化を検討することで、神経芽細胞腫の悪性度を規定している遺伝子変化を同定することが可能と考えられる。そこで、現在、全ゲノム上の異常を特に Silent 型を対象に検討している。

また、MYCN 増幅群では、MYCN 遺伝子の位置する 2p の領域に MYCN とは異なった複数のアンプリコンを有する症例が見られ、増幅過程について興味ある所見であると共に、MYCN 増幅群の中にそれぞれ個性が存在する可能性が示唆された。

#### D. 考察

今回の検討から、従来の遺伝子異常として報告されてきた増幅、増加、あるいは欠失は、SNPs アレイを用いることで十分検出可能であり、また、核型に異常を認める症例はそれぞれの染色体数の算出もほぼ可能であった。さらに、MYCN 領域の検索から、増幅倍数ものみならず、アンプリオコンの領域やアンプリコンを構成する断片が見出され、これらは、増幅の発生機序について興味ある所見であるとともに、増幅領域に含まれる遺伝子によってそれぞれの腫瘍の性質に差が生じる可能性が示唆された。

今回の検討では、神経芽細胞腫のゲノム異常の発生機構が複数存在し、これらが生物学的特性に密接に関連していることが示された。とくに、染色体が全体として増減している症例は予後良好で、これらは別のサブセットとして治療方針を決定すべきグループであると考えられた。これに対し、MYCN 増幅型は従来指摘されてきたとおり、極めて予後不良であり、これらに対してスクリーニングによる早期発見も含めた新たな治療戦略が必要であると考えられる。残りの Silent 型、Partial gain/loss 型はいわゆる中間群であり、これらを詳細に解析することで、神経芽細胞腫の発生、進展に関与する真の遺伝子を見出せるものと考えている。そこで、従来我々が行ってきた遺伝子発現アレイを組み合わせる<sup>3,4)</sup>ことで、ある程度予後を層別化することができた。この事実、発現量が予後と相関している遺伝子の中で、遺伝子量の変化に伴って変動している遺伝子を抽出し、さらにネットワーク解析することで本腫瘍の発生あるいは悪性度獲得に密接に関連したシグナル伝達系を見出すことができると考えて検討中である。とくに、マス症例の高頻度に認められる異常と臨床発見例にて見られる異常の比較、さらに悪性度の高い腫瘍で見出される異常の程度から、悪性度の高い腫瘍の早期発見法や過剰診断例の特性を検討し、

マスの効果判定、さらに新たなスクリーニング法への知見が得られると考えている。

また、今回用いた SNPs アレイによるゲノム解析は、腫瘍 DNA 量が 250 ng と極めて少量で、検査結果が 2 日程度で得られることは、限られた臨床サンプルを使用している実際の検討には、有用性が高いと考えられる。

さらに、遺伝子異常解析を網羅的に行うことで、今まで個別に検討されてきた異常がそれぞれの因果関係として検討され、遺伝子異常がどの時点で生じ、悪性度の獲得がどのように起きているかを見出すことも可能となる。網羅的発現解析や蛋白解析〔プロテオーム〕も導入し、遺伝子異常と遺伝子発現、蛋白発現解析から、真に予後因子として重要なものを選別し、それらに重み付けを行う。そして、これらから腫瘍の個性診断を行い、網羅的遺伝子解析に基づいたリスク分類を作成し、治療のガイドライン作りとそれぞれのリスク群の個性を把握した上での早期診断法としてのスクリーニング法の開発とテーラード治療をめざしている。

#### E. 結論

神経芽細胞腫検体の DNA を用いた SNPs 解析を行い、遺伝子異常の網羅的解析を行った結果、ゲノム異常は 4 つに大別された。これらのうち、Whole gain/loss 型は予後良好で、MYCN 増幅型は予後不良であり、Silent 型および Partial gain/loss 型はその中間であった。中間の 2 つのタイプは、遺伝子発現の網羅的解析によって予後の良いものと悪いものを送別することが可能であった。これらの網羅的解析によって、遺伝子異常から本腫瘍のリスク分類が可能となるだけでなく、本腫瘍の発生、進展の機序、さらに腫瘍特性の決定因子の探索に極めて有用であることが示された。

#### F. 参考文献

- 1) Brodeur, GB: Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Rev. Cancer* 3:203-206, 2003
- 2) Hiyama E, et al: Biological characteristics of neuroblastoma with partial deletion in the short arm of chromosome 1. *Med Pediatr Oncol.*36:67-74, 2001
- 3) Hiyama E, et al. Differential gene expression profiles between neuroblastomas with high telomerase activity and low telomerase activity. *J. Pediatr Surg*, 38: 1730-1734, 2003.
- 4) Hiyama E., et al. Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. *Pediatr Surg*, 20: 33-38, 2004.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hiyama E, Hiyama K. Molecular and biological heterogeneity in neuroblastoma. *Current Genomics*, 6:319-332, 2005.
- 2) 檜山英三、山岡裕明. 神経芽細胞腫スクリーニング 小児医学, in press.
- 3) 檜山英三、家原知子、金子道夫. 神経芽腫 小児がん, 42:311-321, 2005.
- 4) 檜山英三、山岡裕明. - 周産期スクリーニングへの新しい考え方と進歩 - 神経芽細胞腫のスクリーニングの展望と問題点. *周産期医学*, 35:1278-1282, 2005.

### 2. 学会発表

- 1) Hiyama E, Kobayashi T, Kamimatsuse A, Yamaoka H, Hiyama K, Nishiyama M, C. Patrick Reynolds, Sueda T. Genomic alterations that are associated with altered gene expression in neuroblastoma. 96<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research., April 16-20, 2005, Anaheim, CA, USA
- 2) Hiyama E, Ohtaki M Use of Mathematical model based on "target" theory to evaluate natural history of human neuroblastoma. 37<sup>th</sup> Congress Interanational Society of Pediatric Oncology. Sept. 21-24, 2005 Vancouver, Canada
- 3) Hiyama E, Kamimatsuse A, Onitake M, Yamaoka H, Hiyama K, Nishiyama M, C. Patrick Reynolds, Sueda T. Genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis for validation of neuroblastoma biology. 37<sup>th</sup> Congress Interanational Society of Pediatric Oncology. Sept. 21-24, 2005 Vancouver, Canada
- 4) 檜山英三、山岡裕明、末田泰二郎、上松瀬新、檜山桂子、パトリックレイノルズ. 神経芽細胞腫における遺伝子発現変化と関連したゲノム異常検索. 第64回日本癌学会学術総会 ワークショップ小児がん、札幌、2005. 9. 14-16.
- 5) 檜山英三、山岡裕明、末田泰二郎、小林健、檜山桂子 進行神経芽腫の分子診断と新たな治療法 進行神経芽腫のマイクロアレイ解析からみた分子標的の解析. 第42回日本小児外科学会総会、幕張 2005.6.1-3.
- 6) 檜山英三. 神経芽細胞腫マススクリーニングから得られたエビデンスと今後. 第33回日本マススクリーニング学会. 久留米, 2005.10.7-8.
- 7) 檜山英三. 神経芽細胞腫マススクリーニングに関する

る厚生労働科学研究班の成果と今後の展望. 第28回日本マススクリーニング学会技術部会. 久留米, 2005.10.8.

- 8) 檜山英三、山岡裕明、西村真一郎、小林正夫、末田泰二郎、檜山桂子. 神経芽細胞腫の腫瘍特性解析を目的としたゲノムワイド解析. 第21回日本小児がん学会, 宇都宮 2005.11.21-22.

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案特許 なし
3. その他 なし

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Hiyama E, Hiyama K.	Molecular and biological heterogeneity in neuroblastoma.	Current Genomics	6(5)	319-332	2005
檜山英三、山岡裕明.	神経芽細胞腫スクリーニング	小児医学		in press	
檜山英三、家原知子、金子道夫.	神経芽腫	小児がん	42(2)	311-321	2005
檜山英三、山岡裕明.	- 周産期スクリーニングへの新しい考え方と進歩 - 神経芽細胞腫のスクリーニングの展望と問題点.	周産期医学	35(9)	1278-1282	2005
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.	Pediatric Blood & Cancer	46(3)	285-291	2006
Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y.	Clinical significance of serum NM23H1 protein in neuroblastoma.	Cancer Science	96(10)	653-660	2005
Misawa A, Inoue J, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Hosoda F, Ohki M, Imoto I, Inazawa J.	Methylation-associated silencing of the nuclear receptor 112 gene (NR112) in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification.	Cancer Research	65(22)	10233-10242	2005
Tanaka T, Iehara T, Sugimoto T, Hamasaki M, Teramukai S, Tsuchida Y, Kneko M, Sawada T.	Diversity in neuroblastomas and discrimination of the risk to progress.	Cancer Letters	228(1-2)	267-270	2005
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		in press	
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 Research	65(3)	828-834	2005
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 Research	65(11)	4587-4597	2005
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.	Journal of Clinical Oncology	23(22)	5205-5210	2005
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.	The Journal of Biological Chemistry	280(17)	16665-16675	2005
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 Letters	580(2)	627-632	2006
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.	Oncogene		in press	

Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, <u>Nakagawara A.</u>	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	
Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, <u>Nakagawara A.</u>	A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas.	Cancer Letters	228(1-2)	5-11	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 neuroblastoma.	Cancer Cell	7(4)	337-350	2005
Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, <u>Nakagawara A.</u> , Nakagawa A, Sakai R.	Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma.	The American Journal of Pathology	167(1)	213-222	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 Letters	228(1-2)	29-35	2005
Ozaki T, <u>Nakagawara A.</u>	p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world.	Cancer Science	96(11)	729-737	2005
Oue T, Inoue M, Yoneda A, Kubota A, Okuyama H, Kawahara H, Nishikawa M, <u>Nakayama M.</u> , Kawa K.	Profile of neuroblastoma detected by mass screening, resected after observation without treatment: results of the Wait and See pilot study.	Journal of Pediatric Surgery	40(2)	359-363	2005
浜崎 豊、岸本宏志、田中祐吉、山本圭子	神経芽腫の予後、とくに DNA ploidy によるタイプ分類および組織型との関連性	小児がん	42(2)	216-221	2005
Soh H, Wasa M, Wang HS, <u>Fukuzawa M.</u>	Glutamine regulates amino acid transport and glutathione levels in a human neuroblastoma cell line.	Pediatric Surgery International	21(1)	29-33	2005
米田光宏、大植孝治、福澤正洋、草深竹志、奈良啓悟、野瀬聡子、田中夏美、窪田昭男、奥山宏臣、桑江優子、中山雅弘.	新生児期に発見された悪性固形腫瘍症例の検討.	周産期新生児誌	41(4)	714-720	2005
Hasegawa T, <u>Hiyama E.</u> , Wada K, Masujima T.	Pre-treatment and one-shot separating analysis of whole catecholamine metabolites in plasma by using LC/MS.	Analytical and Bioanalytical Chemistry		in press	
長谷川朝美、檜山英三、和田克哉、 <u>升島努.</u>	LC/MS によるカテコールアミン類及びその代謝物の一斉分析法の確立.	日本マススクリーニング学会誌		in press	
Toyabe S, Cao P, Kurashima S, Nakayama Y, Ishii Y, Hosoyama N, Akazawa K.	Actual and estimated costs of disposable materials used during surgical procedures.	Health Policy	73(1)	52-57	2005
Fujikoshi Y, Kanda T, <u>Ohtaki M.</u>	LR tests for some linear hypotheses in an extended growth curve model,	American Journal of Mathematical and Management Sciences		in press	
Arcana M, <u>Ohtaki M.</u>	Multi-target Models and their Application to Data Analysis of Cellular Mortality due to Radiation Exposure.	Hiroshima J. Med. Sci.	54(1)	9-20	2005
Satoh K, Ohtani K, Ushijima M, Isomura M, Matsuura M, Miki T, <u>Ohtaki M.</u>	Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms Based on a Mathematical Model for Two-Dimensional Data.	Japanese Journal of Biometrics	25(2)	61-67	2005



厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

神経芽細胞腫マスキリーニング研究

Ohtaki M, Otani K, Satoh K, Kawamura T, Hiyama K, Nishiyama M.	Model-based analysis of microarray data: Explanation of differentially expressed genes between two cell types based on a two-dimensional mixed normal model.	Japanese Journal of Biometrics	26(1)	31-48	2005
--	--	--------------------------------	-------	-------	------

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakagawara A.	Molecular and developmental biology of neuroblastoma. (Chapter 5)	In Neuroblastoma, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg.		41-53	2005

200500402 A 1/2

厚生労働科学研究費補助金  
(子ども家庭総合研究事業)

登録症例に基づく神経芽細胞腫マススクリーニングの  
効果判定と医療体制の確立

平成 17 年度研究報告書 (2 / 2 冊)

平成 18 年 4 月

主任研究者 檜山英三

# Molecular and Biological Heterogeneity in Neuroblastoma

Eiso Hiyama<sup>1,\*</sup> and Keiko Hiyama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Natural Science Center for Basic Research and Development and <sup>2</sup>Department of Translational Cancer Research, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8551, Hiroshima, Japan

**Abstract:** Neuroblastoma, one of the common malignant childhood tumors, arises from neuroblast cells derived from the neural crest and destined for the adrenal medulla and the sympathetic nervous system and shows remarkable biological heterogeneity, resulting in favorable or unfavorable outcomes. Some neuroblastomas tend to regress spontaneously in infants or to differentiate into a benign ganglioneuroma in older patients. In other instances, the tumors make rapid progress with a fatal outcome. This heterogeneity within neuroblastoma depends on the molecular characteristics of tumor cells. Several distinct genomic alterations have been found in neuroblastoma, including *MYCN* amplification, ploidy changes, deletion of the short arm of chromosome 1, gain of chromosome 17q, and deletion of 11q. The difference of expression was also found in genes related to cellular growth, differentiation, and apoptosis of neural network including Trk receptor tyrosine kinase and telomerase activity. This review discusses the extensive heterogeneity of neuroblastoma at molecular level, providing evidences that neuroblastoma is not a single disease. This should lead to more risk-adapted therapies according to the genetic markers by which individual neuroblastomas are biologically characterized.

Received on: 06 May 2005 - Accepted on: 08 June 2005

**Key Words:** Neuroblastoma, prognosis, *MYCN*, ploidy, chromosome, telomerase, telomere, apoptosis.

## INTRODUCTION

Neuroblastoma, which is derived from neuroectodermal cells in neural crest, is the most common malignant solid tumor in children. The incidence of neuroblastoma is about 1 case per 7,000 born babies a year [1]. More than 90% of children with neuroblastoma are diagnosed within the first 5 years of age, typically characterizing an embryonic tumor. Neuroblastoma exhibits three distinct patterns of clinical behavior: life-threatening progression, spontaneous regression and maturation to ganglioneuroma. Many patients who are diagnosed at more than one year of age have advanced neuroblastomas with metastasis which are usually associated with poor outcome despite multimodal therapy. On the other hand, some tumors undergo complete regression without any treatment. Spontaneous regression usually occurs as part of a clinically identified entity designated stage 4S which has a primary tumor localized in the adrenal gland and metastasis restricted in the liver, bone marrow, and/or skin [2-4]. Maturation to benign ganglioneuroma is less frequent and usually observed after chemotherapy. Although spontaneous regression mainly occurs in infants, maturation is well described in older patients [5]. Since more than 80% of neuroblastomas produce catecholamine metabolites (vanillylmandelic acid and homovanillic acid) are detectable in the urine, mass-screening projects to detect earlier stages of neuroblastoma have been carried out in some countries including Japan. Surprisingly, the incidence of this disease increased two fold whereas the incidence of advanced neuroblastoma in older

patients did not change remarkably, indicating that a large number of neuroblastomas occur in infants without clinical detection and spontaneously regress or mature behind the scenes. These projects were not so effective to reduce progressive neuroblastoma but gave us a lot for solving the biological problem in neuroblastoma. [6-8]. These phenomena raised the question whether advanced stage tumors develop from early stage tumors or represent a subgroup. Transition from favorable type to unfavorable type has not been clearly evaluated but seems to occur rarely [9], suggesting that neuroblastoma consist of at least more than two distinct subtypes [10], which may be distinguishable by genetic characteristics.

These clinical findings suggest biological heterogeneity of neuroblastoma: some tumors regress or mature and other instances advance aggressively. To distinguish progressive tumors from favorable tumors is needed because multimodal appropriate therapies are necessary to improve the prognosis of the patients with progressive tumors and aggressive therapy should be avoided in the patients with favorable tumors to reduce side effects and cost. Clinical evaluation for this difference is based on stage of disease (the degree of tumor spread) at diagnosis, age at diagnosis, histological classification, and only more recently several biological markers have been incorporated [11]. Histological classification by Shimada *et al.* according to the degree of ganglionic differentiation and Schwannian stroma has been widely accepted as an important prognostic factor [12, 13].

To identify the molecular and biological heterogeneity of neuroblastoma clearly, numerous multilateral approaches have been performed for the past two decades and several distinct alterations have been found including *MYCN* amplification, ploidy, chromosomal loss and gain, expression of

\*Address correspondence to this author at the Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8551, Hiroshima, Japan; Tel: +81-82-255-5951, Fax: +81-82-257-5219; E-mail: eiso@hiroshima-u.ac.jp

Trks, and telomerase activity. In this review, the extensive heterogeneity of neuroblastoma was summarized at molecular and biological evidences that neuroblastoma is not a single disease. This should lead to more risk-adapted therapies according to the genetic markers by which individual neuroblastomas are biologically characterized. This approach will lead to find the molecular marker to distinguish progressive tumors at diagnosis as well as the molecular targets to treat these tumors. In addition, it will provide insights into mechanisms of malignant transformation, progression, spontaneous regression and maturation in neuroblastoma.

## BIOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS

### *MYCN* Amplification

Amplified *MYCN* is one of the most distinguished genomic aberrations of neuroblastomas. Cytogenetic analysis of neuroblastoma cells with amplified *MYCN* gene showed chromosomal abnormalities such as homogeneously staining regions (HSRs) or double minutes (DMs). DMs are usually detected in primary tumors and HSRs which are generally located on different chromosomes from the resident site 2p24 of *MYCN*, were found in cell lines with amplified *MYCN* (Fig. (1)) [14, 15].

Amplified *MYCN* was observed in half of advanced neuroblastomas, but was hardly detected in early stage tumors [14, 15]. In patients who have the tumors with non-amplified *MYCN*, overall survival was approximately 60% over a 5-year period, but less than 30% of patients survived a 1-year period when *MYCN* was amplified at more than ten copies [9, 11]. Thus, amplified *MYCN* is established as a powerful clinical marker of high-risk neuroblastoma and the only tumor genetic marker used as a basis for treatment stratification in neuroblastoma clinical trials [16-19]. Recent studies revealed that the patients who have tumors with amplified *MYCN* gene between three and nine copies also showed poor outcomes [20, 21]. Moreover, FISH analyses of primary tumors for detection at the single cell level revealed that individual cells from *MYCN*-amplified tumors typically stray widely from the copy numbers estimated by molecular analyses (Fig. (1)) [20, 22]. These suggested that amplified *MYCN* gene characterizes a subset of neuroblastoma with extremely aggressive growth potential regardless of the copy number of *MYCN* gene.

The copy numbers of amplified *MYCN* gene, which ranges between three-fold and more than 500-fold, is considered to be consistent within a tumor; not only at different tumor sites, but also at different times *in vivo* [23]. This suggests that amplified *MYCN* is generally present at the time of diagnosis. However, there are some evidences that the *MYCN* gene is amplified during progression of neuroblastoma [24]. Our distinguished case which had the rearrangement in the half copies of amplified *MYCN* gene in one of metastatic lesions suggested that the *MYCN* amplification occurred during tumor progression [25]. In the majority of cases amplified *MYCN*, 1p deletion and 17q gain coexist in the same tumors. Amplified *MYCN* rarely, if ever, occurs without either 1p deletion or 17q gain or both. These phenomena imply that *MYCN* amplification is a later event in the sequence of genetic aberrations underlying neuroblastoma progression [26].

The size of amplicon with amplified DNA encompassing *MYCN* ranges from 100 kb to more than 1 Mb [27], suggesting the possibility that additional genes are co-amplified. *DDX1* gene and neuroblastoma amplified gene (*NAG*) were reported to be coamplified in 50-70% of the tumors with *MYCN* amplification but no amplification of *DDX1* or *NAG* without concomitant *MYCN* amplification has been reported, indicating that *MYCN* is functionally responsible for the maintenance of the amplicon.

High levels of *MYCN* expression are observed in *MYCN*-amplified tumors and seem to contribute to tumorigenesis. However, there are conflicting reports regarding the potential prognostic significance of expression products, both mRNA and protein. Whereas one study demonstrated no significant correlation of *MYCN* expression and *MYCN* protein levels with patient prognosis [28], others reported that in patients older than 1 year with *MYCN* non-amplified tumors, high levels of *MYCN* expression are associated with poor outcome [29, 30].

### DNA Ploidy

Cytogenetic and flow cytometric analyses have been used for evaluating DNA ploidy in neuroblastoma. Flow cytometric analysis revealed that hyperdiploidy, mostly the near-triploidy, is mainly observed in favorable tumors of younger patients, whereas diploid is usually detected in advanced tumors with unfavorable outcomes [31]. In addition, in children 12-24 months of age, diploidy predicted resistance for chemotherapy, whereas half of the patients with hyperdiploidy achieved long-term disease-free survival. The DNA ploidy did not have its prognostic significance for patients over 2 years of age [32].

Cytogenetic analyses classified neuroblastoma tumors into four ploidy patterns: near-diploid, near-triploid, near-tetraploid, and near-pentaploid tumors [33]. The near-diploid and near-tetraploid tumors were usually detected in children older than 1 year and frequently had genetic abnormalities involving 1p and *MYCN* amplification. On the other hand, near-triploid and near-pentaploid tumors were predominantly detected in infants with favorable outcome and rarely showed genetic abnormalities. Near-diploidy and near-tetraploidy have been identified as one of the most useful markers for poor prognosis [34].

Using two-color FISH for observing 1p deletion and ploidy in tumors in Japan where mass-screened program had been performed [33], event-free survival (EFS) rate was lowest in the disomy 1 with 1p deletion group, intermediate in the disomy 1 with normal 1p group and highest in both trisomy 1 regardless 1p status. This indicates that cytogenetic 1p deletion is a poor prognostic factor for diploid tumors, but not for triploid tumors. The majority of trisomy 1 tumors with 1p36 deletion were detected by mass screening.

### Chromosome Loss and Gain

Chromosome loss and gain in neuroblastoma were reported in more than 20 different chromosome regions, most frequently chromosome 1, followed by 11q, and 17q. More recently CGH analyses have substantially contributed to the identification of unbalanced 17q gain in primary neuroblastoma [35-37].