

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

## 神経芽腫における分子標的治療マーカーの免疫組織化学的検討

分担研究者 林 富 東北大学小児外科

### 研究要旨

【目的】神経芽腫においては、集学的治療によっても難治性の症例が少なくなく、そのような予後不良例での治療法の検討が課題となっている。近年、悪性腫瘍で過剰発現する因子を特異的に阻害する薬剤を用いた標的治療が行われるようになってきており、今回、神経芽腫における標的治療の有用性を判定するのに重要となる標的因子の発現を、良性腫瘍と比較して検討した。【対象と方法】当院および関連病院で摘出された検体のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて、現在用いられている標的治療の特異的因子および細胞増殖に関与する細胞内情報伝達系の因子の発現を免疫組織化学にて検討した。【結果】神経芽腫において VEGFR2 と 4EBP が有意に高発現を示した。一方、VEGFA や EGFR、HER2/neu は高発現とはならなかった。【結論】現在、臨床の場で使用されてきている Bevacizumab、Trastuzumab、Cetuximab、Rapamycin といった薬剤は神経芽腫の治療において有効性は低いことが示唆された。

### Summary

[Purpose] Neuroblastoma is one of the most common malignant solid tumors in children. Another treatment is required to research because the prognosis of patients with advanced neuroblastoma remains poor in spite of aggressive antitumor therapy. In recent years, the targeted therapies to specific molecules over-expressed in malignant tumors have good effects on several cancers. In this study, we examined the expression of the molecules in neuroblastoma to assess the effectiveness of the specific targeted therapy. [Methods] Expressions of the 11 specific molecules were examined using immunohistochemistry in paraffin-embedded specimens of neuroblastoma and ganglioneuroma which were developed from adrenal gland. [Results] VEGF receptor-2 and 4E-BP were significantly expressed in neuroblastoma, while expressions of VEGF-A, EGFR and HER2/neu were not significant. [Conclusion] We suggest that Bevacizumab, Trastuzumab, Cetuximab and Rapamycin, which are medicines for target specific therapy, may not have good effects on neuroblastoma.

### A. 研究目的

近年、腫瘍分子生物学の進歩により、腫瘍細胞の分子レベルでの増殖・転移・浸潤機構が明らかにされてきており、増殖因子や受容体とその下流の細胞内情報伝達経路の異常などの関与が報告されてきている。そして多くのヒト悪性腫瘍においてこの機序に関わる分子に着目し、これを標的とする治療薬(分子標的治療薬)の開発が進められてきている。

従来の抗癌薬は、主として細胞分裂や細胞増殖と

いったDNAの複製や代謝経路など細胞の生命活動の基本となる機能に作用することで細胞分裂や増殖を阻害するものであり、癌細胞だけでなく、分裂・増殖を盛んに行っている正常の細胞に対しても非選択的に毒性を呈することは避けられない現象であった。

その一方で、今回着目する分子標的治療薬は、細胞内情報伝達物質や細胞周期に関わる蛋白など、特定の機能を持つ分子を狙って作用することで全身の

正常組織への副作用を最小限にして抗腫瘍効果の向上と副作用の軽減が期待されている薬剤であり、今後、抗癌治療の主流となる可能性を秘めている<sup>1</sup>。

しかしこれら分子標的治療薬はその作用が特異的であることから、腫瘍細胞にその薬剤の標的因子が発現していなければまったく臨床効果が認められない。このような理由から生検あるいは手術で摘出した腫瘍の標本を用いてこれらの標的因子が発現しているか否か、発現しているのであればどの程度発現しているのかといった検討が治療効果を得るにあたっては極めて重要である。

現在、分子標的治療としては、Trastuzumab、Rituximab、Bevacizumab、Imatinib、Erlotinib といった薬剤が実際に臨床の場で用いられており、更に多くの同様な薬剤の開発・治療が行われている。そしてこれら標的治療薬は乳癌・大腸癌などの悪性腫瘍に対する単独療法または併用療法において、従来の標準治療と比べ有意な生存延長を示したとする報告もなされている<sup>2,3</sup>。

神経芽腫においては、集学的治療によっても予後不良な症例の治療法が課題となっており、分子標的治療のような新たな治療法の可能性が検討されるべきであると考えられる。

そこで今回、神経芽腫における標的治療の有用性を判定するのに重要となる標的因子の発現を、良性腫瘍と比較して検討した。

## B. 研究方法

当院および関連病院で摘出された副腎原発の神経芽腫 (NB) 23 例 (Table. 1) と、副腎髄質良性腫瘍である神経節腫 (GN) 7 例 (Table. 2) を対象とした。

今回検討した標的因子 (Fig. 1-1, 2) は、現在標的治療の因子として挙げられるリガンドおよび受容体である Bevacizumab の標的因子 VEGFA (vascular endothelial growth factor A) と、その受容体 VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) , Cetuximab の標的受容体 EGFR (epidermal growth factor receptor) , Trastuzumab の標的受容体 HER2/neu (human EGF receptor type 2) , これら受容体の下流に存在する細胞内情報伝達経路の因子として p-ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2) , p-AKT, mTOR (mammalian target

of Rapamycin) , p-p70S6K (p70 S6 kinase)、p-S6RP (S6 ribosomal protein)、p-4EBP (4E binding protein)、中心体構成蛋白として NPM (Nucleophosmin) を対象とした。

今後の広範な普及を図るために標本はホルマリン固定パラフィン包埋標本を使用した。

抗体は汎用性の高いものを購入し使用した。

免疫組織化学の手順は従来通りの avidin-biotin signaling system もしくは polymer signaling amplification system に従って行った。(Table.3)

染色した標本は半定量的に解析し、染色陽性細胞の割合に応じて 0～5 に分類した。(Table.4)

結果は 0～5 に分類した値の腫瘍ごとの平均値の差の検定 (t 検定もしくは Welch の方法) を行い、良性腫瘍と比較して悪性腫瘍で過剰発現の見られた因子を検討した。

### (倫理面への配慮)

症例はすべて匿名化して検索しており、研究計画は東北大学医学部倫理委員会に提出済みである。

## C. 研究結果

染色した病理組織標本の写真を (Fig. 2) に示す。

標本を 0～5 に分類し、腫瘍ごとの平均値の差の検定を行った (Fig. 3)。VEGFR2 (平均値 NB=2.13, GN=1.00) と 4EBP (平均値 NB=1.34, GN=0.00) では神経芽腫の方が、神経節腫よりも有意に高発現であった ( $p < 0.05$ )。一方、EGFR では神経芽腫 (平均値 0.04) より神経節腫 (平均値 1.43) のほうが有意に高発現であった ( $p < 0.05$ )。他の分子については発現に有意差は認められなかった。

また、有意差の認められた VEGFR2 と 4EBP に関しては、神経芽腫の予後因子として挙げられる stage (INSS)、発症年齢、MYCN 増幅の有無、trkA 発現の程度、DNA ploidy との相関についても平均値の差の検定を行った (Fig. 6)。VEGFR2 ではいずれの予後因子も有意な相関関係は認められなかった。4EBP では予後因子のうち DNA ploidy に関して、diploidy (平均値 2.67) のほうが hyperploidy または aneuploidy (平均値 0.5) よりも高発現であった。

## D. 考察

腫瘍ごとの平均値の差の検定の結果、VEGFR2は神経芽腫で有意に( $p=0.010$ )高発現となった(Fig. 3)。今回検討に用いた神経芽腫は副腎原発であり、血管の豊富な内分泌組織から生じてきた腫瘍ということ考えると、その血管合成を阻害する VEGF拮抗薬が有効である可能性も示唆される。しかし、VEGFA の染色結果を見ると (Fig. 3)、神経芽腫と神経節腫で発現に有意差は認められず ( $p=0.296$ )、むしろ今回の結果は良性の方が発現が高い傾向となった。また、VEGFR2と VEGFA の発現に相関関係も得られなかった (Fig. 4)。すなわち、神経芽腫において VEGFR2が過剰発現していたとしても VEGFA が必ずしも過剰発現しているとは限らず、VEGF を標的とした薬剤である Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) による治療の有効性は低いと考えられた。

4EBP に関しても神経芽腫で有意に ( $p=0.0002$ ) 高発現となった (Fig. 3)。4EBP は eIF-4E と結合し、これを不活化している。4EBP がリン酸化されると eIF-4E は活性化され細胞内情報伝達経路が進み蛋白合成が促進される。したがって4EBP のリン酸化を阻害することで異常な蛋白合成を抑制することができる。4EBP のリン酸化は p-mTOR によって Thr46、37で、続いて Ser65、70で起こる<sup>4,7</sup>。mTOR によるリン酸化、または引き続き起こるリン酸化を阻害すれば異常な蛋白合成を制御することができる。mTOR の特異的阻害薬として Rapamycin が知られており、文献的にも細胞を Rapamycin で処理すると4EBP の脱リン酸化が起こることが報告されている<sup>8</sup>。しかし今回、mTOR の発現は必ずしも4EBP の発現とは相関しておらず (Fig. 5)、mTOR を阻害しても有効に4EBP を脱リン酸化することができない可能性が考えられる。したがって Rapamycin による標的治療の有効性は低いものと考えられる。今後、4EBP のリン酸化を特異的に阻害する手段が発見されるならば、神経芽腫の新たな治療法となる可能性が考えられる。

4EBP に関しては、NB の予後因子との相関についても検討した (Fig. 6)。この結果からは4EBP の発現と神経芽腫の DNA ploidy が相関している可能性が考えられた。

また、現在では乳癌において HER2/neu の標的治療薬である Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) による治療が効果を挙げているが<sup>2</sup>、今回、神経芽腫では発現が認められず臨床応用の可能性は低いと考えられた。

さらに、大腸癌や非小細胞肺癌などでは EGFR の標的治療薬として Cetuximab (Erbix<sup>TM</sup>)、Gefitinib (Iressa<sup>®</sup>)、Erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>) といった薬剤が臨床の場で使用されてきているが<sup>3</sup>、今回、神経芽腫ではほとんど発現が認められず、むしろ神経節腫で発現が認められる結果となり、これらの薬剤に関しても、神経芽腫に対する臨床応用の可能性は低いと考えられた。

他の分子については、神経芽腫と神経節腫で発現に差は認められず、神経芽腫における異常増殖に関与している可能性は低いと考えられた。

## E. 結論

神経芽腫においては、集学的治療によっても予後不良な症例の治療法が課題となっているが、最近、注目されている分子標的治療のような新たな治療法の有効性については、ほとんど検討されていないのが現状である。そこで今回、分子標的治療の可能性を検討するため、摘出組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本を使用して免疫組織化学的に標的分子が発現しているか否かを検討した。

副腎髄質良性腫瘍である神経節腫と比較して検討した結果、神経芽腫では VEGFA、EGFR、HER2/neu、mTOR は過剰発現しておらず、現在、臨床の場で使用されてきている Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>)、Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>)、Cetuximab (Erbix<sup>TM</sup>)、Rapamycin といった薬剤は神経芽腫の治療において有効性は低いことが示唆された。

今回の免疫組織化学による検討の結果から得られたのは negative data ではあったが、今後も新たな治療法の有効性を検討するために、様々な角度からの更なる研究が必要であると考えられる。

## F. 参考文献

1. 上原至雅: 分子標的治療の標的分子. 日本臨床, 62: 1206-08, 2004.
2. Slamon DJ, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for

- metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med, 344: 783-92, 2001.
3. Rogerio CL. The evolving role of Cetuximab in non-small cell lung cancer. Clin Can Res, 12: 4432s-35s, 2006.
  4. Holland EC. Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. Oncogene, 23: 3138-44, 2004.
  5. Dever TE. Gene-specific regulation by general translation factors. Cell, 108: 545-6, 2002.
  6. Gingras AC, et al. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. Genes Dev, 15: 807-26, 2001.
  7. Gingras AC, et al. eIF initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Ann Rev Biochem, 68: 913-63, 1999.
  8. John CL Jr, et al. PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. Trends Biochem Sci, 22: 345-9, 1997.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

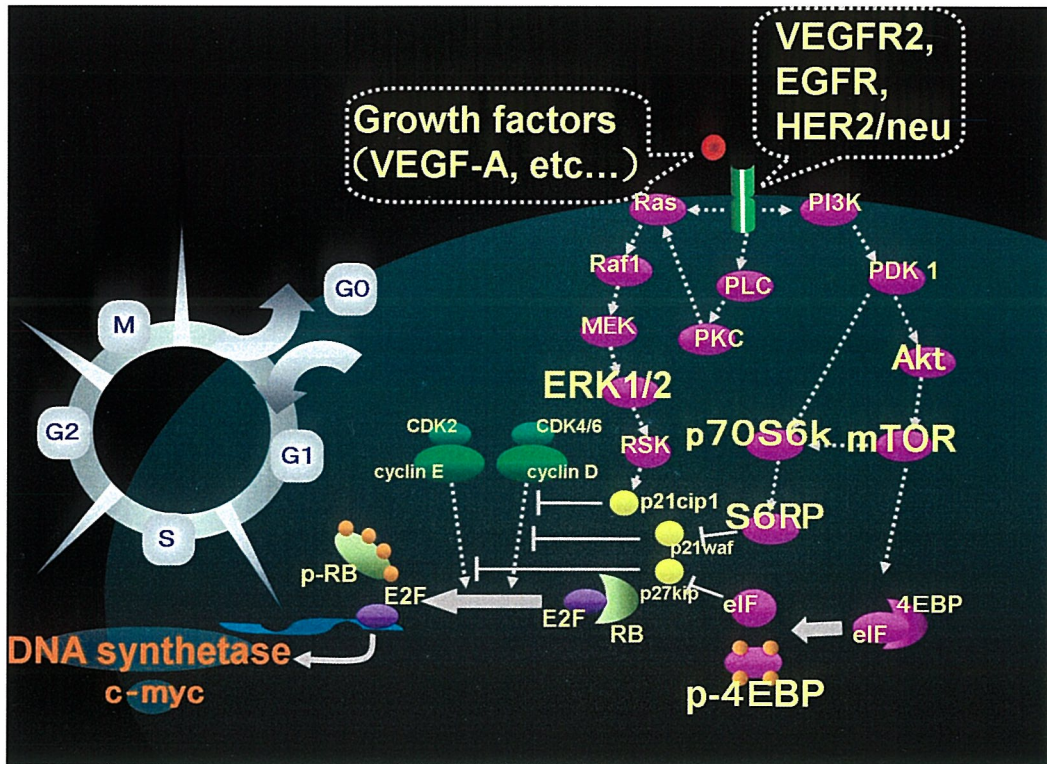
なし

NB 予後	年齢	INSS	MYCN	trkA	染色体数
NB-1	6mass	stage1	1	high	
NB-2	6mass	stage1			
NB-3	6mass	stage4S	1	low	di.
NB-4	6mass	stage1			
NB-5	6mass	stage1			
NB-6	6mass	stage4			
NB-7	6mass	stage4	1	high	di.+hyp.
NB-8	6mass	stage3			
NB-9	6mass	stage3	1	high	hyp.
NB-10	1y1m	stage4			
NB-11	6mass	stage3	1	high	aneu.
NB-12	6mass	stage1			
NB-13	6mass	stage1	1	high	di.
NB-14	1y2m	stage4	100		
NB-15	2y2m	stage4	>200		
NB-16	2y4m	stage4	1		
NB-17	6mass	stage2B	1	int-high	di.+hyp.
NB-18	6mass	stage3	1	high	aneu.
NB-19	6mass	stage3	1		aneu.
NB-20	4y	stage3	1	int	di.
NB-21	6mass	stage3	1		
NB-22	1y9m	stage3	1	low	
NB-23	5y1m	stage4			

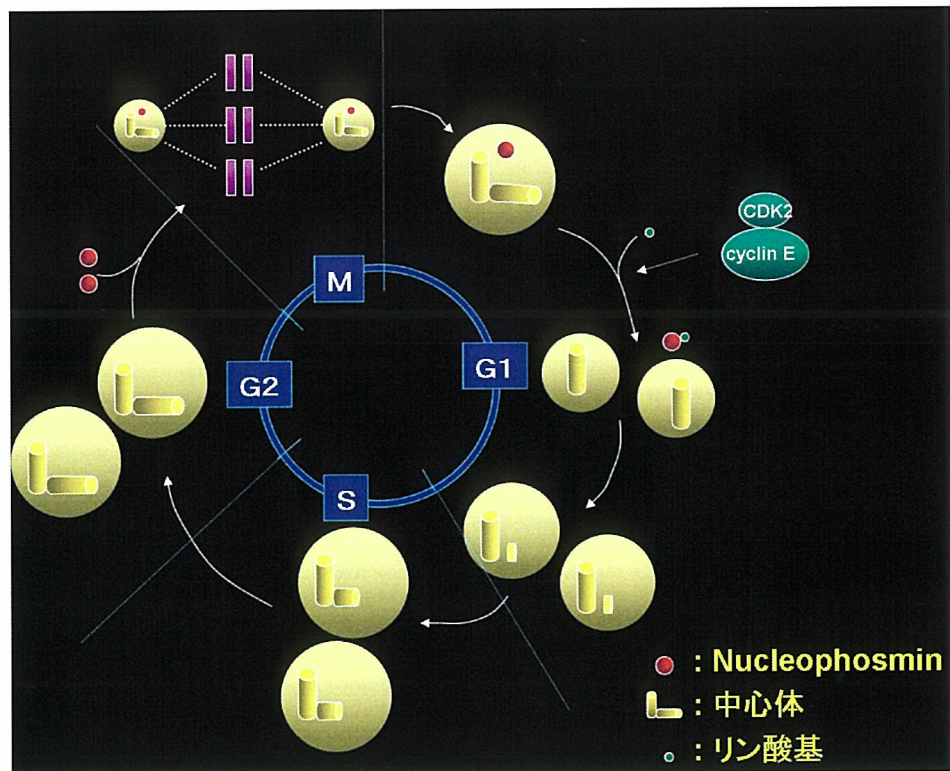
(Table. 1) 神経芽腫23症例

GN 症例	年齢
GN-1	13y10m
GN-2	51y
GN-3	63y
GN-4	69y
GN-5	?
GN-6	?
GN-7	59y

(Table. 2) 神経節腫7症例



(Fig. 1-1) 標的治療の因子として挙げられるリガンドおよび受容体とその下流に存在するシグナル伝達系の因子：Bevacizumabの標的因子である VEGFA と、その受容体である VEGFR2、Cetuximabの標的受容体である EGFR、Trastuzumabの標的受容体である HER2/neuを対象とした。これら受容体からのシグナルは PI3k/Akt系や Ras/ERK系を活性化し、cyclin dependent kinase inhibitorの発現を制御する。cyclin/cyclin dependent kinaseは癌抑制遺伝子産物である RB蛋白がリン酸化することを促進させ、RB蛋白が結合することで不活性化されていた E2Fが離脱し活性化される。活性化された E2FはS期に必要な遺伝子の転写を促進し、これにより細胞周期が進行する。今回はこのシグナル伝達系のうち、ERK1/2、p42,44-MAPK、Akt、Rapamycinの標的である mTOR、p70S6k、S6RP、4EBPを対象とした。



(Fig. 1-2) 中心体複製に関わる因子：細胞周期のG1/S移行期にCDK2/cyclinEが活性化されると、Nucleophosmin (NPM) がリン酸化され中心体から離脱する。これによって中心体の解離および複製が開始する。分裂期にはNPMは紡錘体極に再局在する。

分類	染色陽性細胞
0 :	0%
1 :	1-5%
2 :	6-25%
3 :	26-50%
4 :	51-75%
5 :	76-100%

(Table. 4) 半定量的解析による分類

antibody	方 法	キ ャ ッ ト	バッファー	抗原賦活化処理	ブロッキング
VEGFA	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	—	—	1% normal goat serum
VEGF-R2	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal goat serum
EGFR	polymer signal amplification system	EGFR pharmDx kit (Dako)	citric acid buffer	proteinase	peroxidase
HER2/neu	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	—	—	1% normal goat serum
phospho-p44/42MAPK	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal goat serum
phospho-Akt	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal rabbit serum
mTOR	polymer signal amplification system	EnVision kit (Dako)	citric acid buffer	microwave	1% normal goat serum
phospho-p70S6K	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	EDTA	microwave	1% normal rabbit serum
phospho-S6RP	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal goat serum
phospho-4EBP1	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	autoclave	1% normal goat serum
Nucleophosmin	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal rabbit serum

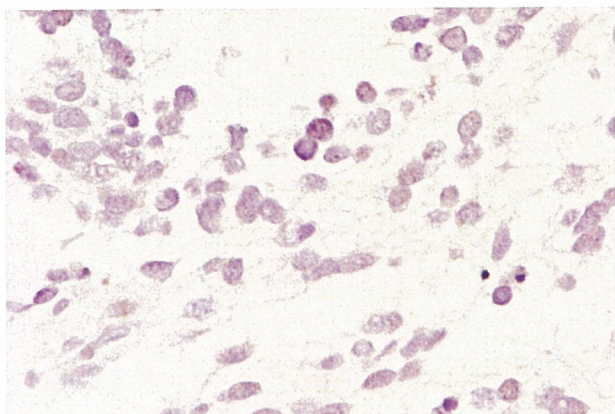
(Table. 3) 抗体および免疫組織化学の方法：

<avidin-biotin signaling system> # Histofine kit (1) 脱パラフィン (2) 抗原賦活化処理 (3) 室温で約1時間冷却 (4) ブロッキング試薬を添加し室温湿室で30分間処理 (5) 1次抗体を添加し4℃湿室で20時間処理 (6) ペルオキシダーゼ活性を阻止するため0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / methanol buffer で室温で30分間処理 (7) ビオチン標識2次抗体を添加し室温湿室で30分間反応 (8) ペルオキシダーゼ標識ストレプトアヴィジンを添加し室温湿室で30分間反応 (9) 3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて発色 (10) ヘマトキシリン染色

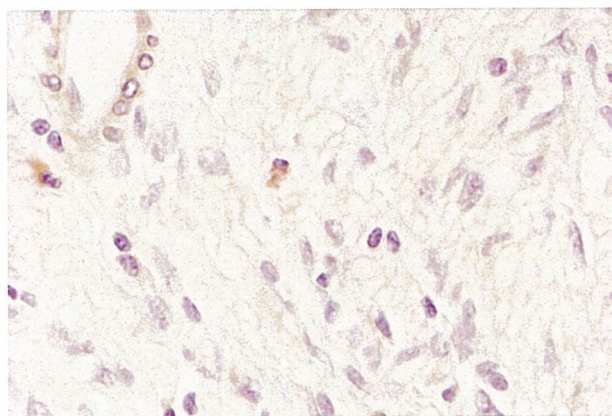
# En Vision kit (1)~(6) 同前 (7) Envision 試薬 (ペルオキシダーゼ/デキストランポリマー標識2次抗体) を添加し室温湿室で1時間反応 (8) 3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて発色 (9) ヘマトキシリン染色

<polymer signaling amplification system> (1) 脱パラフィン (2) 蛋白分解酵素試薬 (Proteinase K) を添加し室温湿室で5分間処理 (3) ブロッキング試薬 (過酸化水素水) を添加し室温湿室で5分間処理 (4) 1次抗体試薬 (抗ヒトEGFRマウスモノクローナル抗体) を添加し室温湿室で30分間処理 (5) ポリマー試薬 (ペルオキシダーゼ標識デキストラン結合抗マウス免疫グロブリンヤギポリクローナル抗体) を添加し室温湿室で30分間処理 (6) 3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて発色 (7) ヘマトキシリン染色

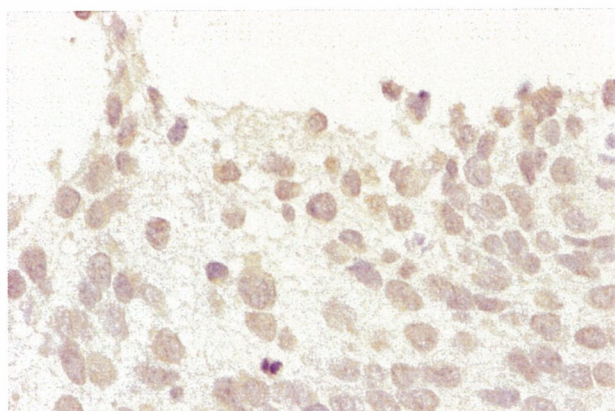




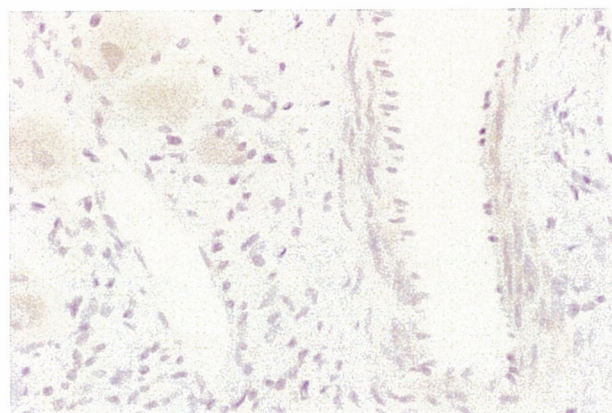
(a) NB VEGFA (-)



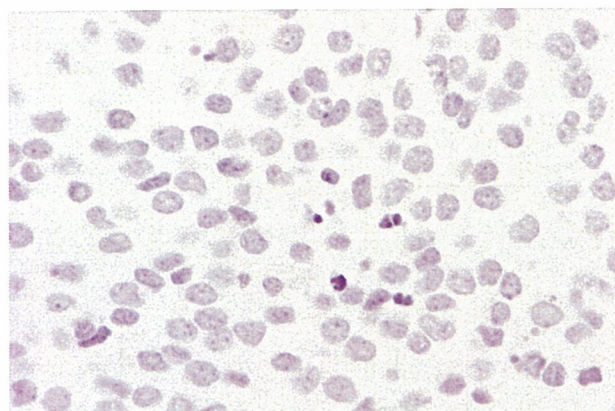
GN VEGFA (1+)



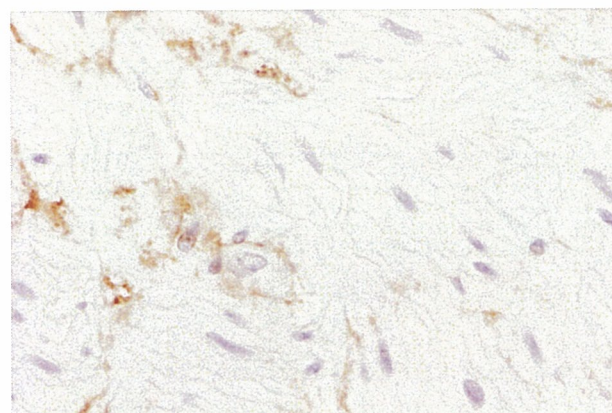
(b) NB VEGFR2 (5+)



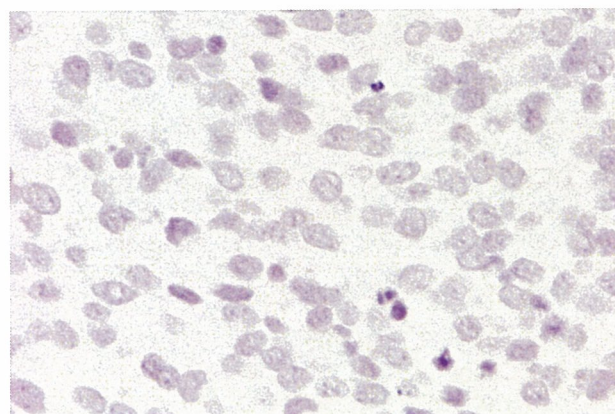
GN VEGFR2 (1+)



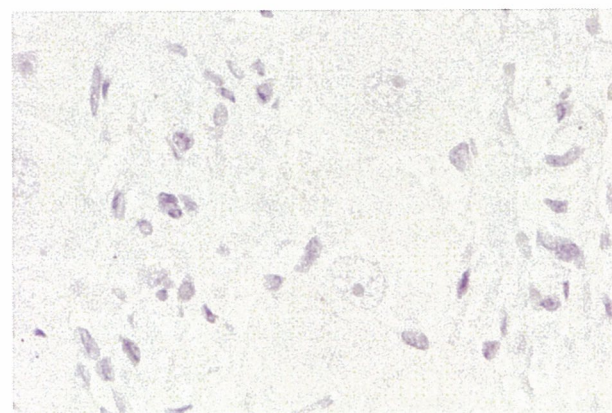
(c) NB EGFR (-)



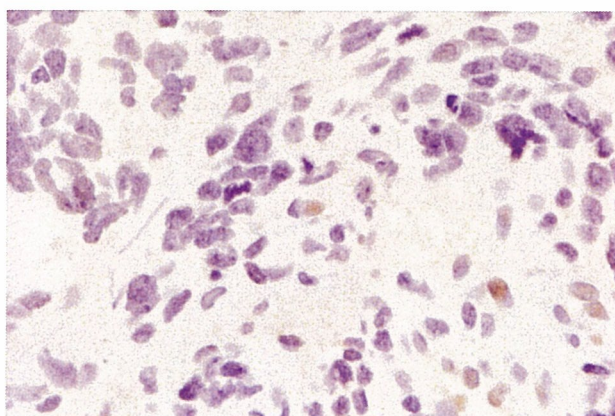
GN EGFR (1+)



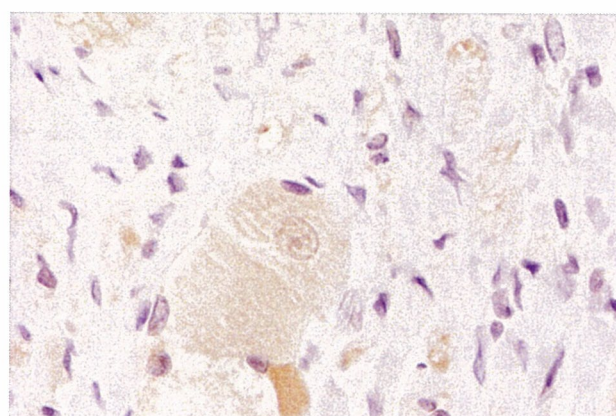
(d) NB HER2/neu (-)



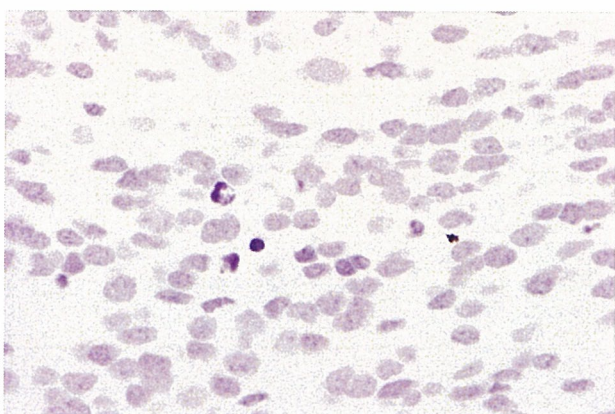
GN HER2/neu (-)



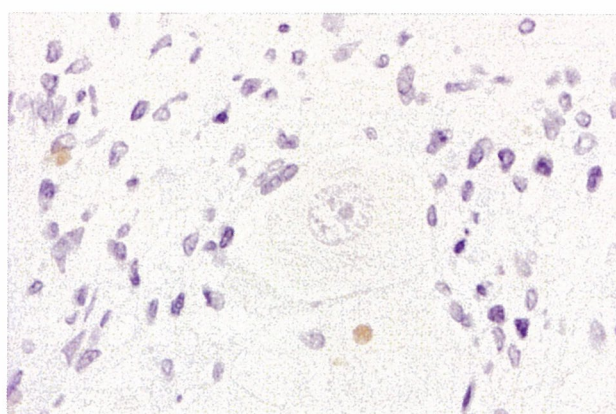
(e) NB ERK1/2 (1+)



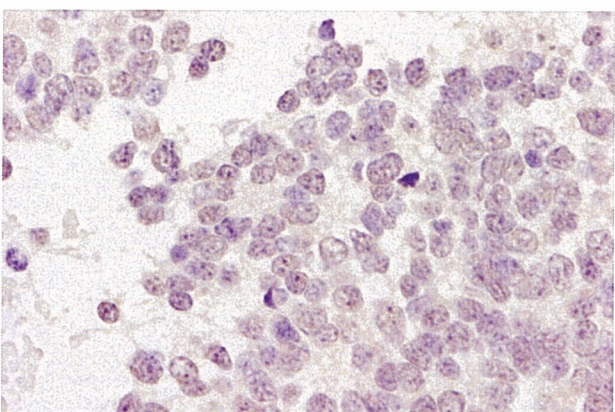
GN ERK1/2 (2+)



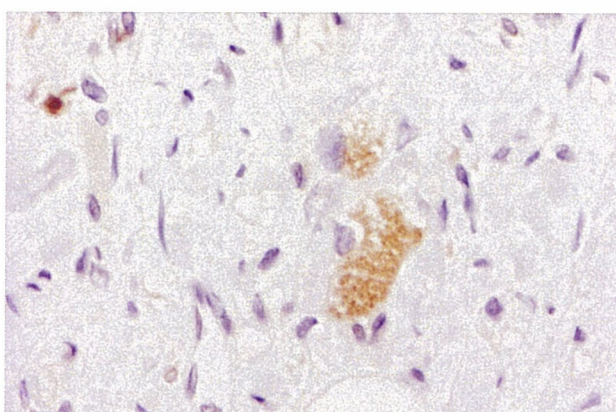
(f) NB Akt (-)



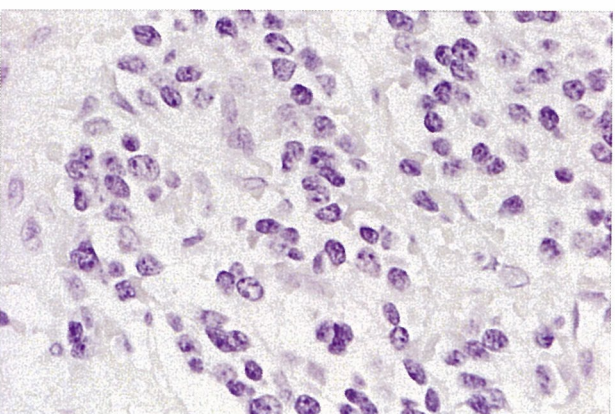
GN Akt (1+)



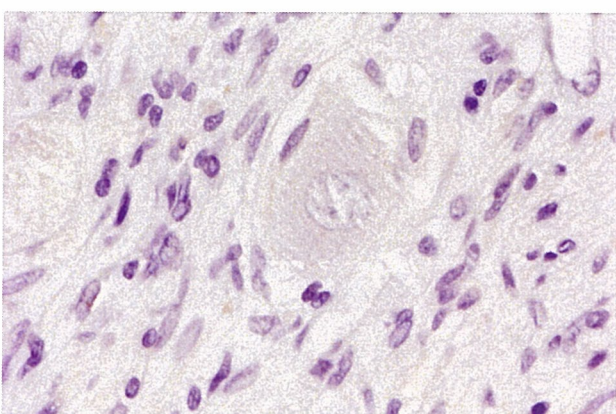
(g) NB mTOR (4+)



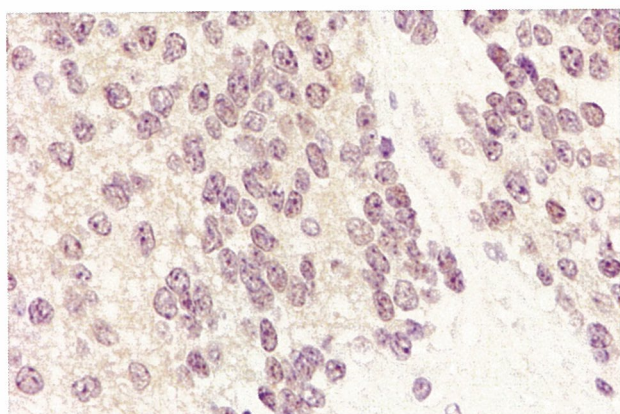
GN mTOR (2+)



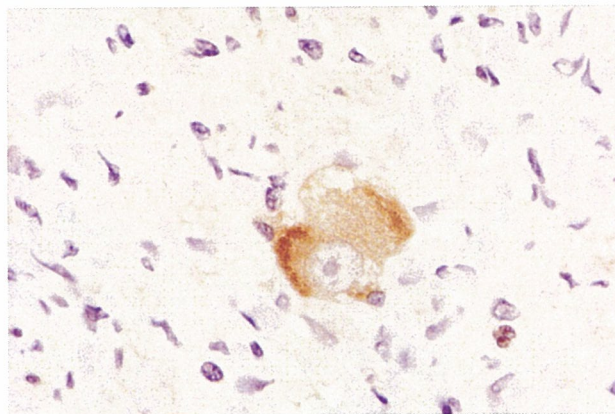
(h) NB p70S6K (-)



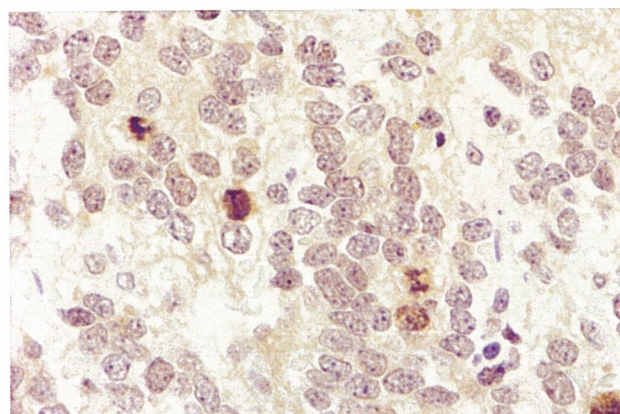
GN p70S6K (-)



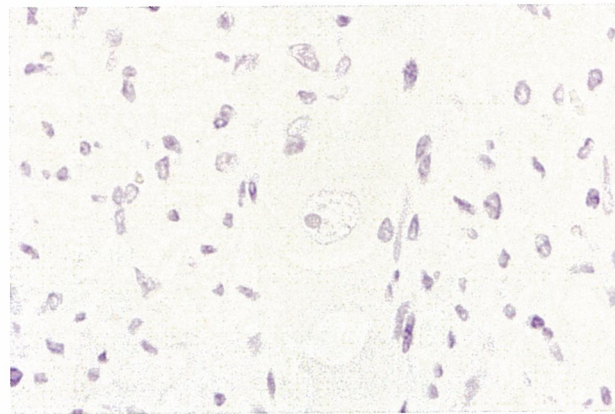
(i) NB S6RP (3+)



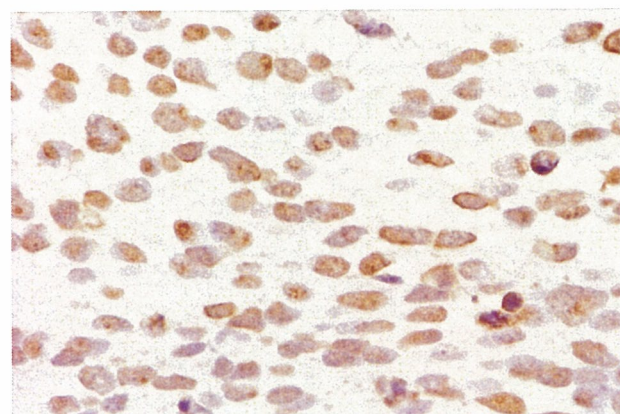
GN S6RP (1+)



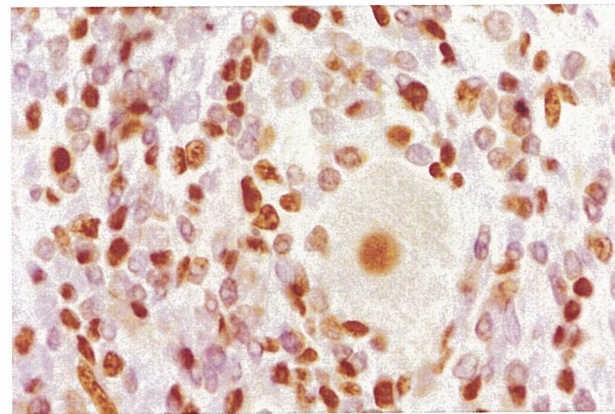
(j) NB 4EBP (5+)



NB 4EBP (-)

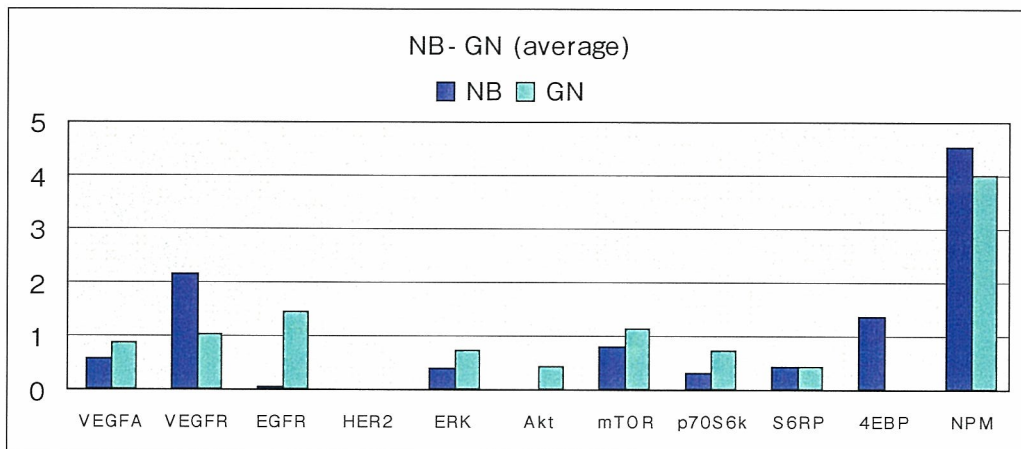


(k) NB NPM (4+)

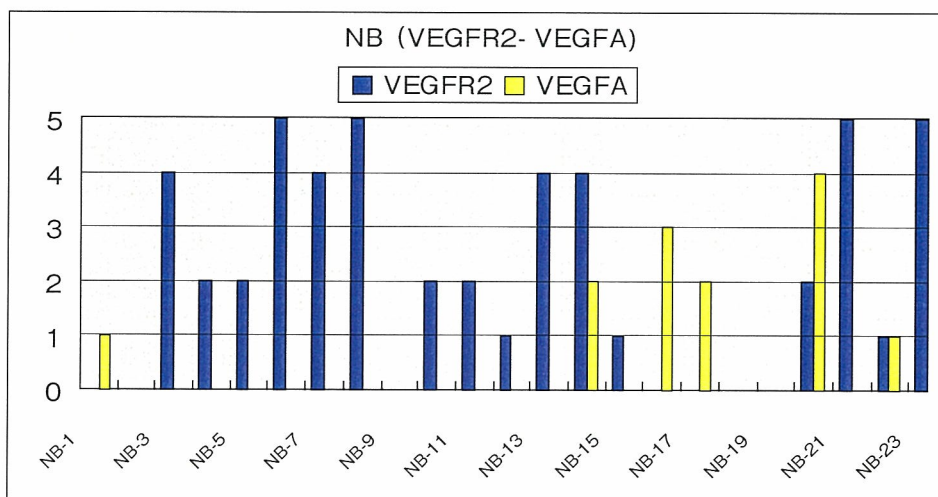


GN NPM (4+)

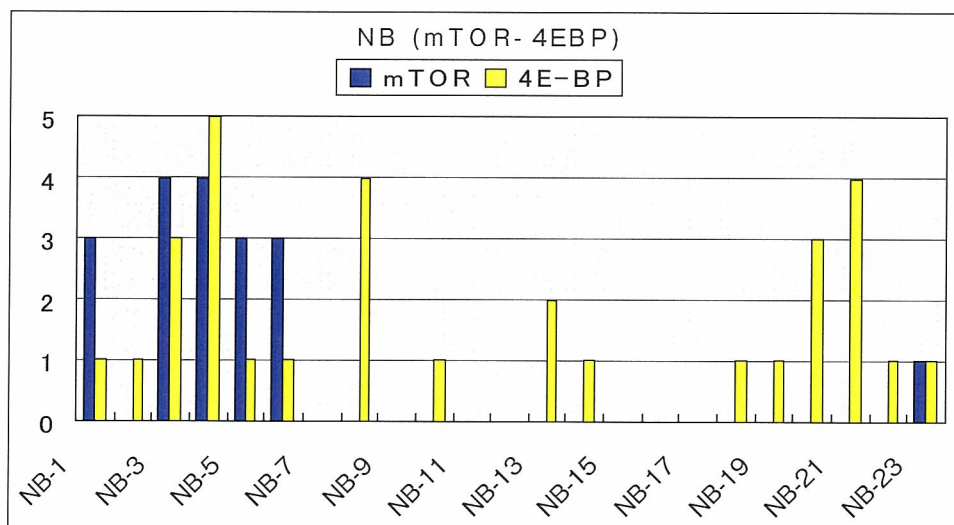
(Fig. 2) 免疫組織化学 (40x) : (a) VEGFA、(b) VEGFR2、(c) EGFR は細胞膜と細胞質に発現を認めた。(d) HER2/neu は発現を認めなかった。(e) p-ERK1/2は細胞質と核に発現を認めた。(f) p-Akt はほとんど発現を認めなかった。(g) mTOR は細胞質と核に発現を認めた。(h) p-p70S6K はほとんど発現を認めなかった。(i) p-S6RP は細胞質に発現を認めた。(j)4EBP は特に分裂中の細胞で細胞質に強く発現を認めた。(k) NPM は核に発現を認めた。



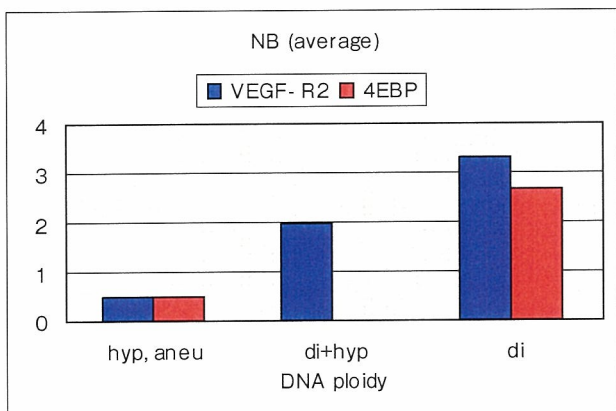
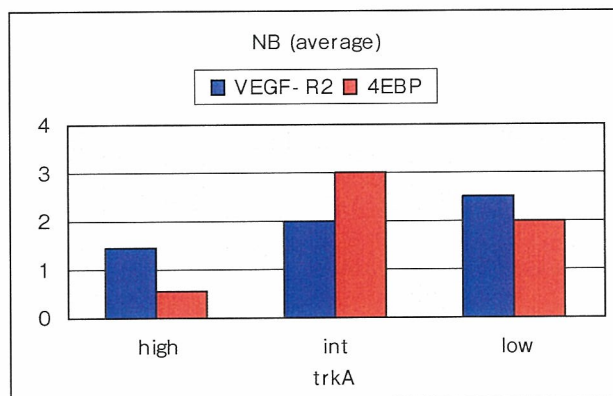
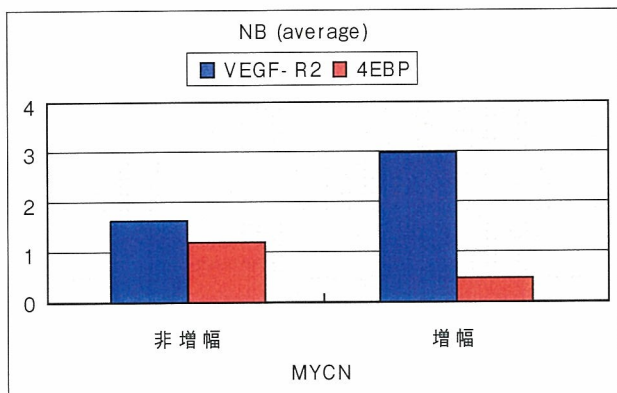
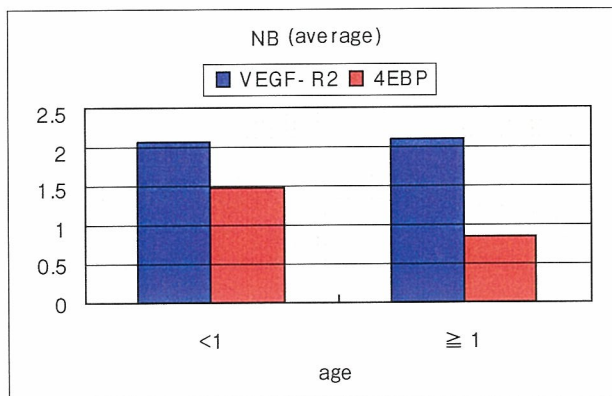
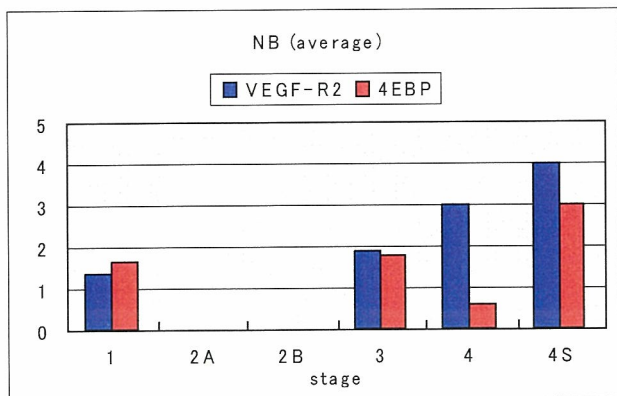
(Fig. 3) 平均値の差の検定



(Fig. 4) 神経芽腫症例における VEGFR2 と VEGFA の発現



(Fig. 5) 神経芽腫症例における mTOR と 4EBP の発現



(Fig. 6) 予後因子ごとの VEGFR2 と 4EBP の発現

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

# 神経芽腫マスキリング発見症例の生物学的特性と予後に関する研究

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究局 局長

## 研究要旨

神経芽腫マスキリング（MS）により発見された症例の分子生物学的性状を明確にし、自然退縮する腫瘍と再発する腫瘍の違いを明らかにすることを目的とし、平成18年度は112例の散発性神経芽腫と124例のマスキリング発見神経芽腫を対象に microarray comparative genomic hybridization（アレイ CGH）解析を行い、ゲノム異常の違いから、マスキリング発見神経芽腫の臨床的意義について考察した。その結果、神経芽腫のゲノム異常は(1) silent group（GGS）、(2) partial chromosomal gains/losses group（GGP）、(3) whole chromosomal gains/losses group（GGW）の3群に分けられた。累積5年生存率は、散発性神経芽腫では、GGS 68%（n=23）、GGP 43%（n=53）、GGW 80%（n=36）であったのに対し、マスキリング発見神経芽腫では、GGS 100%（n=6）、GGP 96%（n=24）、GGW 100%（n=94）であった。したがって、マスキリング発見神経芽腫であっても、予後の悪い GGP パターンの腫瘍が約20%に見られたにもかかわらず、それらの予後は著しく良好であった。

## A. 研究目的

乳児の尿中カテコラミン代謝産物の検査（マスキリング）による神経芽細胞腫の早期発見システムの効果判定は、今後の難治性神経芽細胞腫の治療戦略決定に重要である。そこで、本年度の分担研究では、散発性神経芽腫とマスキリング（MS）発見神経芽腫のゲノム異常パターンの解析から、神経芽腫マスキリングの有効性に関し考察することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 解析の対象とした神経芽腫症例の内訳

平成7年から平成13年までに千葉県がんセンター研究所へ登録され、MYCNコピー数、DNA ploidy、TrkA発現の検査を受けた神経芽腫症例の中から、TrkA発現解析結果を有する236例を対象とした。このうち、MS発見神経芽腫症例は124例、散発性神経芽腫症例は112例であった。

### 2) Microarray comparative genomic hybridization（アレイ CGH）解析

アレイ CGH解析には、カリフォルニア大学サン

フランシスコ校がんセンターで開発された BAC アレイ（2,464 BAC クローンを搭載）を用いた。凍結腫瘍組織より DNA を抽出し、その500ng を Cy3-dCTP、レファレンス DNA を Cy5-dCTP でラベルし、BAC アレイにハイブリダイズした。

### 3) 統計学的解析手法

アレイ CGH の各スポットの蛍光強度をノーマライズし、石井・大羽らが開発した comb-fit 法を用いてクローンのコピー数を算出した。

倫理面の配慮としては、本研究に用いるサンプルは、全て組織供与施設において文書によるインフォームドコンセントを得、匿名化された後に当研究室に供与されたものを用いた。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って行い、研究実施内容について千葉県がんセンター倫理審査委員会に諮り承認を得た。

## C. 研究結果

### 1) 神経芽腫におけるゲノム異常のパターン

散発性および MS 発見による全236例の神経芽腫アレイ CGH に基づくゲノム異常は、Chr.17

コピー数異常なし、Chr.17長腕のみの増加、全Chr.17の増加、により大きく以下の3群に分けられた。(1) silent group (GGS、n=29)、(2) partial chromosomal gains/losses group (GGP、n=77)、(3) whole chromosomal gains/losses group (GGW、n=130)。GGS腫瘍はアレイCGHによるゲノム異常がほとんど見られない群であったが、MYCNのみが増幅している例が5例に見られた。GGPはChr.17q gainが存在する群で、これは、さらに、MYCN増幅、1p欠失、11q欠失の有無によりサブグループに分けられた。このなかで頻度の高かったものはGGP1a (n=23)で、MYCN増幅、1p欠失、17q gainが存在した。また、GGP3腫瘍は27例と2番目に多く、11q lossと17q gainが特徴的であったが、MYCN増幅例は1例しか見られなかった。一方、GGW腫瘍は染色体全体のgainまたはlossのグループで、130例のうち94例がMS発見例であった。この94例中77例(82%)はDNA ploidyがhyperdiploidyであった。ちなみに、MYCN増幅は、GGSで22%、GGPで53%に見られた。

#### 2) マスキリーニング発見神経芽腫におけるゲノム異常のパターン

散発性神経芽腫におけるゲノム異常パターンは、112例中GGS 23例(21%)、GGP 53例(47%)、GGW 36例(32%)であったのに対し、MS発見神経芽腫では、124例中GGS 6例(5%)、GGP 24例(19%)、GGW 94例(76%)で、後者ではGGW腫瘍が圧倒的に多かった。しかし、GGS、GGP腫瘍も存在していた。

#### 3) マスキリーニング発見神経芽腫におけるゲノム異常と予後

累積5年生存率は、散発性神経芽腫では、GGS 68% (n=23)、GGP 43% (n=53)、GGW 80% (n=36)であったのに対し、MS発見神経芽腫では、GGS 100% (n=6)、GGP 96% (n=24)、GGW 100% (n=94)であった。次に、MS発見神経芽腫は大半が1歳未満でMYCN増幅がほとんど無いため、MYCN single copyで散発性神経芽腫のうち1歳未満で発症した症例との比較を行った。その結果、1歳未満散発性神経芽腫でMYCN増幅が無い症例では、GGWs 88% (n=24)、GGSs 86% (n=7)、GGPs 67% (n=3)であった。

## D. 考察

今回の解析結果から、MS発見神経芽腫も散発性神経芽腫と同様にGGS、GGP、GGWの3種のゲノム異常パターンを示すことが明らかになった。このことは、MS発見神経芽腫も発がんの機構は散発性神経芽腫と同じであることを示している。しかし、それらの発生頻度は明らかに異なっており、MS発見神経芽腫ではGGWが圧倒的に多かった。散発性神経芽腫でもGGWの予後は良いことから、そのことがMS発見神経芽腫の予後が良いことの一因をなしているものと思われた。しかしながら、興味深いことに、MS発見神経芽腫においても約20%にGGPパターンが見られた。散発性神経芽腫のGGPは必ずしも予後が良くないことから考えると、1歳未満で発見されるMS発見神経芽腫のGGPは年齢因子が強く関係する予後良好な生物学的特性を有する腫瘍であることが推察された。また、神経芽腫全体をとおして、GGSおよびGGP腫瘍には高頻度にMYCN増幅が見られたが、MS発見神経芽腫のGGSおよびGGP腫瘍にはMYCN増幅はまず見られなかった。したがって、自然退縮傾向の強いMS発見神経芽腫のゲノムに生じるイベントは必ずしも散発性神経芽腫に起こるそれとは異なるものであることが示唆された。以上より、MS発見神経芽腫のゲノム異常は、基本的には散発性神経芽腫の異常と本質的に異なるものでは無かったが、そのサブセットの頻度が異なっていること、MYCN増幅が起こっていないこと、また、1歳未満という年齢因子がその生物学的特性に加わっていることなどにより、大部分が自然に退縮する腫瘍であることが伺われた。

## E. 結論

今回の研究から、散発性神経芽腫とMS発見神経芽腫は、発がんに伴うゲノム異常は基本的には類似していたが、サブセットの構成頻度および生物学的特性に大きな違いがあり、なんらかのエピジェネティックな制御機構が異なっていることが示唆された。

## F. 健康危機情報

特になし。

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

1. 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*, 25: 917-928, 2006.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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*, 25: 1931-1942, 2006.
6. 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*, 25: 5046-5055, 2006.
7. 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*, 15: 1281-1285, 2006.
8. Sang M, Li Y, Ozaki T, Ono S, Ando K, Yamamoto H, Koda T, Geng C, Nakagawara A. p73-dependent induction of 14-3-3<sub>σ</sub> increases the chemo-sensitivity of drug-resistant human breast cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 347: 327-333, 2006.
9. Hayashi S, Ozaki T, Yoshida K, Hosoda M, Todo S, Akiyama S, Nakagawara A. p73 and MDM2 confer the resistance of epidermoid carcinoma to cisplatin by blocking p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 347: 60-66, 2006.
10. Abe M, Westermann F, Nakagawara A, Takato T, Schwab M, Ushijima T. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett*, 247(2): 253-258, 2007.
11. Ozaki T, Li Y, Kikuchi H, Tomita T, Iwatsubo T, Nakagawara A. The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 351: 57-63, 2006.
12. Kikuchi H, Ozaki T, Furuya K, Hanamoto T, Nakanishi M, Yamamoto H, Yoshida K, Todo S, Nakagawara A. NF-κB regulates the stability and activity of p73 by inducing its proteolytic degradation through a ubiquitin-dependent proteasome pathway. *Oncogene*, 25: 7608-7617, 2006.
13. Okahara F, Itoh K, Nakagawara A, Murakami M, Kanaho Y, Maehara T. Critical role of PICT1, a tumor suppressor candidate, in phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate signals and tumorigenic transformation. *Mol. Biol. Cell*, 17: 4888-4895, 2006.
14. Tomizawa M, Horie H, Yamamoto H, Matsunaga T, Sasaki F, Hashizume K, Hiyama E, Kaneko M, Suita S, Ando H, Hayashi Y, Ohnuma N, Nakagawara A. Reciprocal expression of CCAAT/enhancer binding proteins  $\beta$  and  $\delta$  in hepatoblastomas and its prognostic significance. *Oncol. Rep*, 17: 341-344, 2007.



15. Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, Nakagawara A, Kaneko M. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with *MYCN*-amplified neuroblastoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*, 133: 185-192, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）

分担研究報告書

# SNPアレイによる神経芽細胞腫の網羅的ゲノム異常解析

檜山 英三<sup>1,2</sup>、山岡 裕明<sup>2</sup>、鬼武 美幸<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1p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、マスによって発見された腫瘍と臨床症状で発見された腫瘍を用いて、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た。昨年度に引き続き検討を行い、あわせてマス発見例76例を含む198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 chromosome gain/loss型）、染色体の一部の増減があるもの（Partial chromosome 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39例は5例を除き予後不良であった。Silent型49例、Partial Gain/Loss型52例は予後良好、不良がほぼ半数であった。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。とくに、Whole chromosome gain/loss型は、予後良好で、現在の治療に十分反応し、過度な治療を軽減することが可能であると考えられた。一方、他の3型には現行の治療では不十分な症例があると考えられた。以上から、ゲノム解析は神経芽腫の特性を反映した有用なツールと考えられ、スクリーニングがもたらした功罪として今後の治療に有効に生かすことが重要と考えられた。

## Summary

Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients.

Neuroblastoma (NB) is a heterogeneous tumor and demonstrates favorable or unfavorable outcomes. In Japan, a nation-wide NB mass-screening (MS) had been performed on 6-month-old babies for approximately 20 years that might have detected almost all NB including regressing/maturing tumors. To clarify the heterogeneity of this tumor, we examined genetic alterations in the representative cases using genome-wide microarrays. Genomic DNA was extracted from 198 NB tissue samples and paired blood samples including 76 MS detected cases and analyzed by single nucleotide polymorphism (SNP) arrays. The SNP array classified the genetic aberrations into four types: whole gain/loss type, partial gain/loss type, MYCN amplified type, and silent type. Most MS detecting cases belonged to the whole gain/loss type, while unfavorable cases who died of disease showed partial gain/loss, MYCN amplified or silent types. Genome-

wide genetic analysis is useful to predict the outcome of patients. The cases whose tumors showed whole gain/loss may respond well to contemporary therapy, and intensive surgery could be spared. While, current therapeutic strategy may be insufficient for the subgroups with partial gain/loss, *MYCN* amplified or silent type. Validation of these results would provide new tools to predict clinical outcome of children with NB. And these findings, obtained by the results of Japanese MS project, should be utilized in the improvement of the prognosis of neuroblastoma patients.

## A. 研究目的

神経芽腫の予後は、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、一昨年度から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ている。特に、本邦では生後6ヶ月児の神経芽細胞腫マスキリーニング(以下マス)を行なう神経芽細胞腫検査事業によって、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、罹患率が倍増した。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に分化退縮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、11q異常、17q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が、予後不良のマーカーともされている。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事実であった。その検査法は、*MYCN*遺伝子増幅に関しては、サザンプロテイング法、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、FISH法など様々な検討方法が行なわれてきた<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相互の関連性やその重み付けを行うべき時代となった。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SNP (single nucleotide polymorphism) アレイが開発された。この方法を用いることで、神経芽腫の遺伝子異常を網羅的に解析可能となり、本研究班で検討を行なった<sup>3)</sup>。

## 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のうち、ゲノム解析の同意が得られている198例を対象とした。INSS病期分類(括弧内はマスキリーニング発見例76例)はINSS分類で、1:40例(30例)、2A:15例(8例)、2B:23例(10例)、3:51例(15例)、4:54例(5例)、4S:15例(8例)、病理分類(嶋田分類)はfavorable:95例(70例)、unfavorable:103例(6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・クロロフォルム・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 250ng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のアレルシグナルとコピー数を算出した。

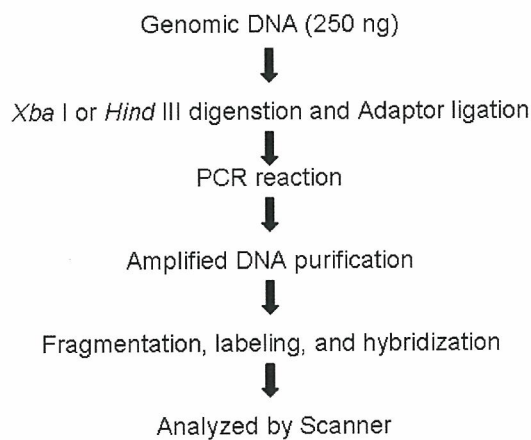


図1：GeneChip(r)を用いた検索法

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

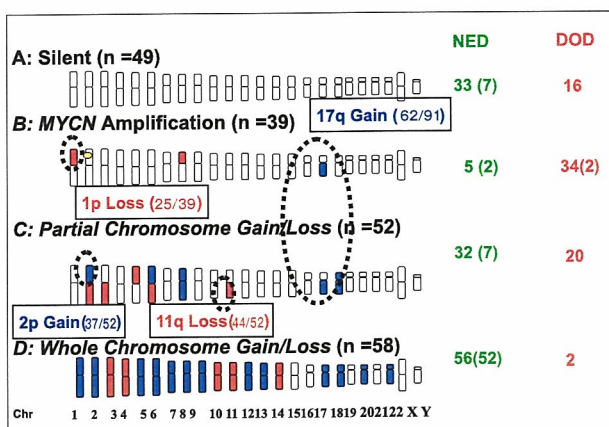


図2：SNPsでのゲノム異常パターン

対象とした198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 chromosome gain/loss型：染色体の部分的な増減をみとめるもの。
- D：Whole chromosome gain/loss型：染色体全体として増減をみとめるもの。

予後との関連を検討すると、MYCN増幅型の39例中34例が死亡し、一方、Whole chromosome gain/loss型の58例中56例が無病生存しており、相反する結果であった。残りのPartial chromosome deletion/loss型では52例中20例が腫瘍死し、Silent型でも49例中16例が腫瘍死で、予後良好なものと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 chromosome 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 chromosome deletion/loss型を少し細かく観察すると、1番染色体単腕 (1p) 領域に小さな欠失を認めるもの、17番染色体長腕 (17q) 領域の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、これらの症例には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、複数存在することが明らかとなった。

Partial chromosome 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101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65例が不良例35例に対して2倍以上に発現上昇した遺伝子が734個、発現低下した遺伝子が972個、クラスタリング解析にて同定された。これらから、これらの中間型の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