

表 神経芽細胞腫マス・スクリーニング (MS) の効果に関する主な報告

報告地域 (報告者, 年度)	施行時期 (カ月)	観察対象月齢 (カ月)	対照群	検査法	罹患率(受診群/ 対照群)10万対	罹患率の比 (95%信頼区間等)	死亡率 (受診群/対照群)	死亡率の比 (95%信頼区間等)
ドイツ (Shilling, 2002)	12	12~60	未実施地域	定量	14.3/7.3	1.94	1.4/1.2	1.17
ケベック (Woods, 2002)	3週と6	0~71	未実施地域	定性	不明	2.85(1.79~2.57)	4.78/3.33~5.29	0.90~1.40
25都道府県 (久繁, 2001)	6	6~84	未受検者	定量	20.02/11.63	1.72	1.855/3.403	0.55
全国(林, 2005)	6	6~72	未受検者	定量	—	—	1.54/4.31	0.281
九州(Suita, 2002)	6	0~60	未受検者	定量	16.9/11.8	1.43	1.4/0	—
7県 (Yamamoto, 2002)	6	0~59	実施前	定性	14.18/9.82	1.44(p=0.01)	2.98/4.21	0.71(p=0.21)
				定量	25.98/9.82	2.65(p<0.0001)	2.18/4.21	0.52(p=0.07)
札幌市 (Nishi, 1997)	6	0~48	実施前	定性	24.41/11.97	2.04	4.88/6.21	0.79(p>0.5)
				定量	19.98/11.97	1.66	1.05/6.21	0.17(p<0.5)
新潟県 (Asami, 1995)	6	0~60	実施前	定性	18.6/10.5	1.77	4.5/5.9	0.76
				定量	22.1/10.5	2.10	0/5.9	0
7府県市 (Ajiki, 1998)	6	1~48	実施前	定性	12.0/8.20	1.5(1.2~1.7)	2.6/3.5	0.8(0.5~1.0)
				定量	20.8/8.20	2.5(2.3~2.8)	1.4/3.5	0.4(0.3~0.6)
九州(Suita, 2002)	6	0~60	実施前	定量	16.9/6.1	2.77	1.4/2.1	0.67(p=0.419)
大阪府 (Honiyo, 2003)	6	0~168	実施前	定性	15.2/7.4	2.05(p<0.05)	5.4/4.3	1.26
				定量	23.5~26.8/7.4	3.18~3.62	4.0~4.1/4.3	0.93~0.95(p>0.05)
大阪府 (Ajiki, 2008)	6	0~180	実施前	定性/ 定量	20.5/7.5	2.8(1.3~5.7)	4.3/4.3	1.0(0.3~2.9)

時期にデータを得ることができなかつたために、カナダのケベックとドイツで行われたスタディがよく引用され、これらは対照地域の選択、施行時期の問題などもあるが、有意な死亡率が得られていないことが報告され<sup>2)3)</sup>、今回のこの事業の休止の大きな根拠になったことは否めない。これらのスタディに幾つかの問題点が指摘され、この結果の評価も一定せず、果たして神経芽マスが有効であるのかどうかを多くの人に納得させるエビデンスが乏しいというのが現実である。

### III. 神経芽細胞腫マス・スクリーニングの特殊性と問題点

新生児マス・スクリーニングにおいて発見される代謝異常の患者は、無症状あるいは症状が軽い時期に早期発見して治療を開始することで通常の発達に期待され、発見例の受ける利益は大きなものがあり、通常1回のスクリーニングで相応の効果が期待される。一方、腫瘍である神経芽マスは、確かに無症状あるいは症状が軽い早期に発見して治療を開始することで予後が改善し恩恵を被る児は存在するのであろうが、この腫瘍の発生形態が明確でないことから、神経芽マスを行う時期によって効果は異なり、また、一回の検査で十分な効果が得られるという科学的根拠もなく、効果を上げるためには複数回行うことも必要かもしれない<sup>3)</sup>。従来のスクリーニングは、科学的根拠なしに施行時期が決定されたことから、効果もそれなりのものであった可能性もある。

もう一つの大きな問題は、過剰診断と過剰治療である。生後6カ月で行われた神経芽細胞腫検査事業の成果とも言うべきかもしれないが、従来、1歳未満発見のこの腫瘍が予後良好であったとの臨床経験は、その多くが自然退縮あるいは分化する腫瘍であったことによる。すなわち、神経芽マスによって罹患率が2倍以上に上昇したことから、従来、発見

されずに退縮あるいは分化していた腫瘍が乳児期に数多く存在していたことが明らかになったのである<sup>12)13)</sup>。従来、自然に退縮あるいは分化する腫瘍が神経芽細胞腫の中に存在することは知られた事実であった<sup>14)</sup>が、神経芽細胞腫検査事業はこの腫瘍の自然歴解明に大きなエビデンスを与えたことに違いはない。さらに、実際に自然に退縮あるいは分化していることが明らかになったころ、第2の過ちを犯してしまったのである。再び何も明らかなスタディがなく、倫理性も十分討議されないうまま、経験論から、各施設判定基準も異なった形で無治療経過観察を始めたのである<sup>12)13)</sup>。自然歴が明らかでないまま、大きさ、部位、年齢などの因子から判定し、無治療経過観察となった患者の長期経過観察、家族への負担、医療費などコストベネフィット、分化した腫瘍は増大しないのかなどの諸問題を棚上げし、いきなり無治療経過観察が開始されたのである。代謝性疾患の疑陽性とは、全く異なることで、再検査により健常と診断されれば代謝性疾患では健常児であるが、この場合は、実際に腫瘍が体内に存在している。軽症で治療対象にならないものとも考えることもできるが、これらの保証はなく、転移したり、進行例になってから治療することは果たして倫理的にも正しいのかどうかの議論も必要であった。無治療経過観察が間違った治療法であると言っているのではなく、この治療方針の選択の方法に疑問を投げかけているのである。神経芽マスが始まる前は、こうした患者は臨床上発見されれば無論のこと治療されてきたわけであり、これらは過剰診断、過剰治療といわれてはいない。マス・スクリーニングが休止になれば、こうした患者は出てこないのかということ、そんなはずはなく、欧米でも incidental neuroblastoma として報告されている<sup>15)</sup>ように、臨床上発見される。マス・スクリーニングでないから治療してよいのか？マス・スクリーニングの休

止後であるから、無治療経過観察はしないのか？無治療経過観察の選択肢を患者に提示してきた医療側の選択基準を今こそ明確にすべきかもしれない。そのためにも、神経芽マス施行中のこれらの腫瘍の特性を正確かつ緻密に解析し、自然歴を把握した後に、無治療経過観察が治療選択の一つとして成り立つ根拠を提示し、患者側にその選択肢を示すことが必要ではないのかと考えている。

#### IV. 新たなマス・スクリーニングに向けて

有効性に関して曖昧なまま平成15年に休止したことから、この神経芽マスを休止するにあたり、三つの課題が提示された。

(1) 神経芽細胞腫の罹患と死亡の正確な把握

(2) 神経芽マスの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価

(3) 神経芽細胞腫による死亡の減少を目指した、臨床診断と治療の向上のための研究の推進と実施体制の確立

これらは、神経芽細胞腫検査事業休止の影響の確認や、神経芽細胞腫の治療成績の改善を図るための取り組みを評価するには、神経

芽細胞腫の罹患と死亡を正確に把握することが必要となること、神経芽マスの実施時期については、現在の生後6カ月よりも遅い時期に変更することによって、過剰診断例を減少させながら、早期発見が有益な症例の発見を増加させる可能性があるとの指摘があること、この他、神経芽マスの有効性向上が期待される新たな方法について、今後十分検討し、これらの新たな方法の神経芽マスの死亡率減少効果について、介入研究などを行う可能性を検討するためである。

これらの研究を行うことが、まず、休止の後に中止にするのか、再開にするのかを決定する大きなエビデンスとなってくる。

6カ月時に施行された神経芽細胞腫検査事業は、死亡率低下があったもののその過剰診断の多さから、その施行時期を変更して行うことが現在検討されている。すでに、札幌市では生後14カ月、大阪府、京都府では生後18カ月での神経芽マスが開始され、陽性で本症と診断された児も報告されてきている。

新たな臨床研究に向けて我々の研究班にて検討され、18カ月で行う臨床研究を提案している。18カ月に設定した根拠を中心に述べる。これらの評価には、日本における神経芽

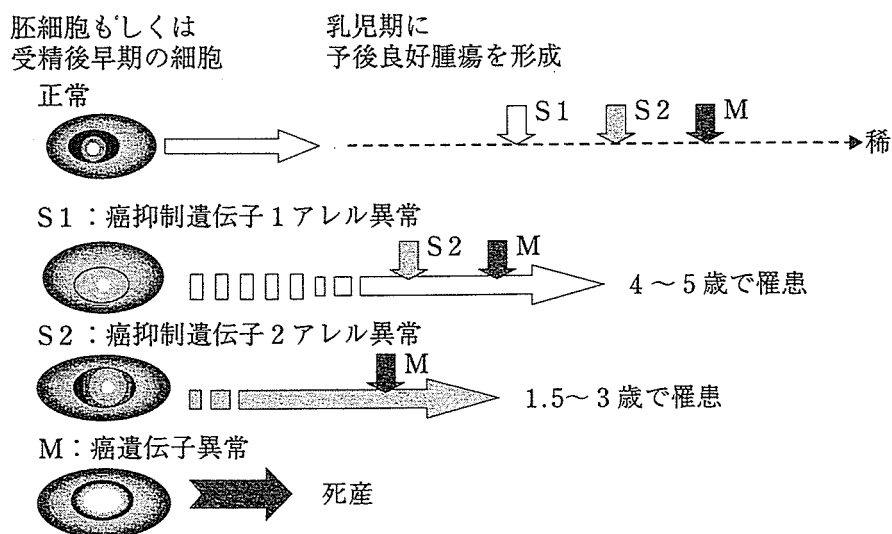


図 モンテカルロ数理モデルからの罹患パターン

胚細胞もしくは受精後早期の神経芽細胞に何らかの異常がある個体が神経芽細胞腫を発症することとなる

腫の罹患状況を把握することが先決であり、1981～1998年の診断症例で5年後の追跡調査が完了した約3,600例の検討を開始した。その分布状況から、神経芽細胞腫の罹患年齢とその統計解析（モンテカルロ数理モデルの応用）を行った。胚細胞もしくは受精後早期に癌遺伝子異常（M）、癌抑制遺伝子の1アレル異常（S1）、2アレル異常（S2）が生じた場合の罹患モデルを策定した（図）。このモデルにおいて、予後良好な腫瘍は、生後1歳くらいで消退し、予後不良な腫瘍は生直後に一部発生するが、1.5～2.5歳、3～4歳にあり発症し、後者の群についての有効性は少ないかもしれないが、1.5～2.5歳の予後不良群の早期発見は、18カ月の神経芽マスで可能となる。

次に病理組織分類（INPC国際分類）での136例の検討がある<sup>16)</sup>。これは、分担研究者の浜崎らによって行われたものであるが、その分布から予後良好型が乳児期に多く、18カ月ごろに少なくなり、逆に予後不良型が1.5～3歳、5歳の二峰性を示し、死亡例もその中に多く含まれることが示された。

さらに、分担研究者の中山らの検討で、無治療経過観察した6カ月神経芽マス発見例の尿中VMA、HVAの変動があげられる。これらの観察例の尿中カテコラミンの変動は、生後1歳ごろに低下し、1歳半ではほとんどが正常域に達する。よって1歳半のスクリーニングでは、こうした自然退縮例は見いだされにくくなるとの結果であった<sup>13)</sup>。

しかし、18カ月では、時期として遅すぎで、それまでに進行例が発症してしまう可能性が危惧されてくる。この可能性は、否定できないが、札幌市の14カ月のデータが極めて貴重な示唆を与えてくれている。1991年からの二次スクリーニングとして行われた14カ月神経芽マスは、6カ月で受診した症例が多いのにもかかわらず約5,800例に1例と高率に発症し、そのほとんどが予後良好型であっ

た。この発生率からみて、14カ月でもかなり過剰診断症例が含まれていることを示す結果となっている。

これに対し、京都府・大阪府における神経芽マスでは、まだ、受診例が少ないが、発症率は7,000人に1人程度で、明らかな過剰診断症例は見出されていない。

さらに、昨年あたりから、神経芽細胞腫の国際リスク分類が進むなかで、多くの国で、診断時年齢のリスク因子とするデータが提示された<sup>17)</sup>。ここでは、全く独立した研究グループとして、ドイツ、イタリア、COG（北米、オーストラリア、ニュージーランド、スイス、オランダ）の各グループでそれぞれ行われた。全体として、年齢因子が予後へ関与していることを支持する結果となり、ドイツとCOGの結果では、年齢のカットオフの値を15～18カ月に引き上げることを強く支持する結果となった。しかし、イタリアでは、4期の12～17カ月の患者の予後が年長児と変わりないとの結果がでており、本邦の結果とあわせてさらなる検討が必要であるが、くしくも18カ月時期を支持する結果となっている。

今、求められているのはこうした時期に行う神経芽マスが果たして有効であるかどうかを正確な臨床研究として行い、評価することである。ヘルシンキ宣言を遵守し、倫理的問題から、まず神経芽マスを受ける児の親に正しい説明と理解を求め、臨床研究であることのインフォームドコンセントを得ておくことが前提となる。そして、有意な結果が得られる人口を対象として、神経芽マスの前向き研究を行うことである。こうした結果を評価し、神経芽マスを施行すべきか否かを判定すべきである。現在、上記の地方公共団体を中心に、これと同等の発生率の地域を対照として、前向き研究を行うことが計画されつつある。この研究の妥当性を社会にアピールし、十分な理解のうえに、臨床研究を行い、新たなスクリーニング事業のあり方を行政とともに

に検討し構築することが必要であると考えている。

最後になったが、本邦の6カ月神経芽マスは、この腫瘍のもつ多くの側面を明らかにしてくれたことも事実である。これを非難するだけでなく、得られるエビデンスを十分に把握し、次世代のこの腫瘍への戦略を考えることが最も重要であり、それこそが今までに行ってきた神経芽マスを有効と評価できる実績となる。リスク分類にくわえ、これらの期間に蓄えられた多くの臨床検体の有効活用による研究の推進（このために、現在、本邦の神経芽細胞腫の腫瘍検体のバンキングを開始している）が重要である。こうした研究は本邦でのみ可能な研究であり、世界に多くのエビデンスを発信できるものである。また、新たな腫瘍マーカー、特に予後不良例に特異的なマーカーが見出せれば、新たなスクリーニングのブレイクスルーとなる。これには、最近のプロテオミクスの技術の進歩が大きな武器であり、尿や血清を用いた研究を進行している。このように、6カ月神経芽マスを試行した本邦では、その事業のあり方を反省するとともに、次世代に向けて発展させるべく研究が進行しており、新たなスクリーニングだけでなく、診断・治療戦略を見出すことが、本症の治療成績向上に直結する成果となる。こうした成果を提示して、初めて6カ月神経芽マス事業について国民に開示したことになる。

## 結 語

神経芽マスは平成15年にいったん休止され、その後のこの疾患の動向は極めて興味深いところである。死亡率が有意に低下したとの事実もあり、過剰診断を最小にしたスクリーニング事業に向けた検討が必要な時期であると考えられ、解決すべき問題点も数多く存在し、今後の慎重かつ迅速な対応が求められている領域である。

本研究は、厚生労働科学研究補助金（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・スクリーニング事業の効果判定と医療体制の確立（H16-子ども-012）において行われた成果である。

## 文 献

- 1) Sawada T et al: Neuroblastoma. Mass screening for early detection and its prognosis. *Cancer* 53: 2731~2735, 1984
- 2) Schilling FH et al: Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 346: 1047~1053, 2002
- 3) Woods WG et al: Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 346: 1041~1046, 2002
- 4) Suita S Stephen L: Gans overseas lecture. Mass screening for neuroblastoma in Japan: lessons learned and future directions. *J Pediatr Surg* 37: 949~954, 2002
- 5) Suita S et al: Mass screening for neuroblastoma at 6 months of age: difficult to justify. *J Pediatr Surg*, 33: 1674~1678, 1998
- 6) Ohtori S et al: Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma protein modulates inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Neuroscience* 110: 579~586, 2002
- 7) Ajiki W et al: Effects of mass screening for neuroblastoma on incidence, mortality, and survival rates in Osaka, Japan. *Cancer Causes Control* 9: 631~636, 1998
- 8) Asami T et al: Screening for neuroblastoma: a 9-year birth cohort-based study in Niigata, Japan. *Acta Paediatr* 84: 1173~1176, 1995
- 9) Honjo S et al: Neuroblastoma trends in Osaka, Japan, and Great Britain 1970-1994, in relation to screening. *Int J Cancer* 103: 538~543, 2003
- 10) Nishi M et al: Mass screening for neuroblastoma and mortality in birth cohorts. *Int J Cancer* 71: 552~555, 1997
- 11) 林 邦彦: 平成15年度厚生労働科学研究費補助金報告書: マスクリーニングの効率的実施及び開発に関する研究 (主任研究者: 黒田泰弘), 分担研究: 神経芽腫マスクリーニング・プログラムの疫学評価, 2004
- 12) Yamamoto K et al: Spontaneous regression of localized neuroblastoma detected by mass screening. *J Clin Oncol* 16: 1265~1269, 1998
- 13) Oue T et al: Profile of neuroblastoma detected by mass screening, resected after observation without treatment: results of the Wait

- and See pilot study. J Pediatr Surg 40 : 359~363, 2005
- 14) Sawada T et al : Incidental neuroblastoma. Lancet 1 (8581) : 364, 1988
- 15) Caiulo VA et al : Incidental detection of neuroblastoma and "wait and see" strategy. Pediatr Blood Cancer 44 : 686, 2005
- 16) Shimada H et al : The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). Cancer 86 : 364~372, 1999
- 17) London WB et al : The role of age in neuroblastoma risk stratification : the German, Italian, and children's oncology group perspectives. Cancer letters 228 : 257~266, 2005

## 学会案内

### 第9回 日本脳低温療法学会

会 期：平成18年7月7日～8日（金，土）  
会 場：京王プラザホテル八王子（東京都八王子市旭町14-1 TEL：0426-56-3111）  
会 長：池田幸穂（東京医科大学八王子医療センター脳神経外科）

テ ー マ：「脳低温療法の有用性と新たな展開」

シンポ・主題：1. 頭部外傷の脳低温療法  
2. 脳血管障害の脳低温療法  
3. 蘇生後脳症の脳低温療法  
4. 脳低温療法の看護  
5. 脳低温に関する基礎的研究  
6. 新生児・小児の脳低温療法

特 別 講 演：京都府立医科大学大学院生体機能制御学 吉川敏一教授

招待講演(予定)：Stefan Schwab 教授 (Heidelberg University, Germany)

M. Ross Bullock 教授 (Medical College of Virginia, USA)

連 絡 先：〒193-0998 東京都八王子市館町1163  
東京医科大学八王子医療センター 脳神経外科  
TEL：0426-65-5611 FAX：0426-65-1796

## 小児固形腫瘍における分子病態：最近の知見

栞原 康通 / 杉本 徹\*

Yasumichi Kuwahara Tohru Sugimoto

京都府立医科大学大学院医学研究科小児発達医学 / 教授\*

現 市立福知山市民病院小児科医長

### はじめに

RAS 遺伝子が、がん遺伝子として報告されて以来、次々とがん遺伝子、がん抑制遺伝子が発見され、がんは遺伝子異常が関与し発生すると認識されるようになった<sup>1)</sup>。小児に好発する網膜芽細胞腫において発見された RB 遺伝子は、その後がん抑制遺伝子の概念を確立するに至った。そのほかにも、さまざまな小児がんにおいて、遺伝子の増幅、欠失、染色体転座とそのキメラ遺伝子などの解析が行われてきた。その成果は、小児がんの分子病態を断片的ではあっても解明し、遺伝子診断、リスクによる治療の層別化など臨床に応用され、確実に治療成績の向上に貢献してきた。しかし、小児がんの分子病態においてすべてが解明されたわけではなく、今後も解明しなければならない課題は多く残されているのが現状である。

1990年より開始されたヒトゲノムプロジェクトは2003年4月に終了宣言がなされた。このプロジェクトはヒトゲノムの遺伝情報を明らかにするとともに、DNAチップ、マイクロアレイ、comparative genomic hybridization (CGH) 法<sup>2)</sup>などの遺伝子診断技術を確立していくことにもつながった。小児科領域でも、これらの技術を駆使して、小児がんの分子病態の解明が急速に進行した。本稿では、われわれの研究室が長年取り組んでいる神経芽腫の分野での、最近の研究の動向を中心に概説する。

### 神経芽腫について

神経芽腫は造血器腫瘍、脳腫瘍に次いで多くみられる小児期特有の胎児性腫瘍で、副腎髄質と交感神経細胞に好発する。腫瘍組織はさまざまな分化・成熟度からなる腫瘍組織と Schwann 細胞様の間質が混在し、複雑である。神経芽腫は神経堤細胞が遊走し、交感神経細胞とさらに副腎髄質に分化・発生していく過程に関与する遺伝子異常が関わっていると考えられている。主な遺伝子としては *bone morphogenetic protein 2/4 (BMP2/4)*、*MASH1*、*MYCN* などが知られている<sup>3)</sup>。Shimada らは診断時の年齢と mitosis-karyorrhexis index (MKI) を加味し、病理組織学的に予後判定ができることを示し、現在、International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC 分類) に利用されている<sup>4)</sup>。

また、1985年より実施された乳児神経芽腫マスキリーニングで発症が発見された乳児例の中には、自然退縮を起こす神経芽腫が存在することがわかった。自然退縮腫瘍には腫瘍細胞の交感神経細胞への分化や細胞死(アポトーシス)に関する遺伝子である Caspase を介した機序の関与が考えられているが、近年、それとは別に Caspase を介さない細胞死<sup>5)</sup>の報告もされ、注目されている。さらに、交感神経細胞への最終分化に必要なとされる受容体型チロシンキナーゼである TRA 受容体の遺伝子 *TRKA* は予後良好群で高発現、一方 TRB 受容体の遺伝子 *TRKB* は予後不良群に高

発現である。このように、神経芽腫は遺伝子異常やゲノム異常によって予後良好群と予後不良群に分けることができる(表1)<sup>6)</sup>。なかでも予後不良群でみられる *MYCN* の増幅、染色体1pの欠失、17q増加は強力な予後不良因子であり、治療の層別化に使用されている。これまで、報告されている神経芽腫におけるゲノム異常と遺伝子異常の一部を表2に示す<sup>6)</sup>。

表1 神経芽腫の予後因子

		予後良好群	予後不良群
ゲノム	1p LOH	なし	あり
	<i>MYCN</i> 増幅	なし	あり
	17q 増加	なし	あり
	11q23 LOH	なし	あり
DNA ploidy (特に1歳未満の症例)		hyperploidy near-triploid	diploidy
	遺伝子発現		
	<i>TRKA</i>	高発現	低発現
	<i>TRKB</i>	低発現	高発現
病理組織型		favorable	unfavorable
	Shimada分類		
発症年齢		<1歳	>1歳

LOH: loss of heterozygosity

## 遺伝子解析技術と神経芽腫研究

個々の染色体の変化や遺伝子異常の有無を検討することは、非常に時間のかかる作業であり効率はよくない。ヒトのゲノム配列(1次構造)がすべて解明されたため、腫瘍組織や細胞株に発現する多数の遺伝子について、網羅的に解析を進めたほうが効率的である。これまで開発されてきたゲノム解析の技術を表3に示す<sup>7)</sup>。

### 1. 遺伝子発現プロファイル解析

遺伝子の発現プロファイル解析に大きな影響を与えたのは、Affymetrix社が開発したDNAチップ(GeneChip<sup>TM</sup>)とスタンフォード大学が開発したDNAマイクロアレイの技術である。これらの技術により、腫瘍細胞と正常細胞の遺伝子の発現プロファイルを比較し、腫瘍の病態に関与する可能性がある遺伝子の候補が明らかになる。候補遺伝子が病態に関与しているかを詳細に検討することで、予後因子などに臨床応用できるかが判明する。神経芽腫では予後良好群と予後不良群での遺伝子発現プロファイル解析が行われた。その結果、既知の予後因子のほかに、新規に *SMARCD*

表2 神経芽腫のゲノム異常と発現が変化する遺伝子

ゲノム異常	発現が変化する遺伝子		
欠失	受容体型チロシンキナーゼ	<i>TRKA</i>	
	2q33	<i>TRKB</i>	
	4p16	非受容体型チロシンキナーゼ	<i>Fyn</i>
	9q21.1, 9q34-qter	がん遺伝子	<i>H-RAS</i>
	11q23		<i>delta p73</i>
	14q32	がん抑制遺伝子	<i>p73</i>
	16p12-p13		<i>RASSF1A</i>
	18q21.1, 18pter-q12.3	細胞死関連	<i>Survivin</i>
	19q13.3		<i>Caspase 8</i>
	2p24	細胞周期関連	<i>CDKN2A/p16</i>
増幅		<i>MYCN</i>	
	1q21-q25(1q23)		
増加		細胞接着	<i>E-cadherin</i>
	17q23.1		
転座			
t(1;17)(p36.31-36.13; q11.2-12)			



表3 ゲノム解析技術

染色体変化と遺伝子コピー数解析	遺伝子発現異常解析
カリオタイプング	マイクロアレイ
SKY法	cDNA マイクロアレイ
SCAN法	RT-PCR法
FISH法	SAGE法
CGH法	
アレイCGH法	

SKY: spectral karyotyping, SCAN: spectral color banding, FISH: fluorescence *in situ* hybridization, CGH: comparative genomic hybridization, SAGE: serial analysis of gene expression

3 gene が予後不良因子である可能性が示唆される研究<sup>8)</sup>などが多数報告された。DNA マイクロアレイの課題は、解析する腫瘍組織の質にある。小児固形腫瘍では前述のように、正常細胞の混入があるため腫瘍組織が複雑であり、克服すべき問題とされてきたが、最近腫瘍細胞と周囲の微少環境も相互に影響し合っているという考えもあるため、腫瘍組織全体で評価する報告もみられ、今後の検討が必要である。

## 2. 染色体変化と遺伝子のコピー数の解析

腫瘍の染色体の変化(転座, 欠失など)による異常は、遺伝子の増幅や減少と関係しており、分子病態の解析に有用である。網羅的に解析する方法としてCGH法がある<sup>9)</sup>。CGH法を用いることにより、1回のハイブリダイゼーションで全染色体領域における腫瘍の遺伝子のコピー数の増減を検討できる。

神経芽腫では、17q増加が強力な予後不良因子であることは前述したが、その詳細は不明であった。CGH法とFISH法を用いた解析を行い、神経芽腫の細胞株で17q23領域の増加があること、さらにその領域にある *PPM1D* 遺伝子が標的遺伝子である可能性が報告された<sup>9)</sup>。しかし、CGH法は、正常細胞の中期細胞分裂像を用いることから、その欠失は5~10Mb程度、増幅なら2Mb程度の異常がなければ、それらの変化を検出することは難しいと考えられている。そこで、cDNA マイクロアレイを用いたCGH法が開発され、array-based CGH法などさまざまな工夫が実用化され

た<sup>10)</sup>。その結果、増幅遺伝子のマッピングやホモ欠失が可能で、100kb以下の微細な異常を検出できるようになった。脳腫瘍の上皮腫では組織型が同じでも発生部位別に遺伝子の発現が異なることがアレイCGH法を用いてはじめて示された<sup>11)</sup>。今後は、がんの遺伝子異常の解析に中心的な役割を果たし、臨床面では、がんの診断、予後予測などに実用化されることが期待される。



遺伝子の発現異常に関する研究が盛んに行われているが、近年、遺伝子のエピジェネティックな情報の異常と腫瘍化の関係が注目されている。エピジェネティックな情報には塩基配列の情報とそれ以外の情報があるが、細胞分裂を経ても安定して伝達されていく。塩基配列以外の情報の中でDNAのメチル化異常は重要な情報と位置付けられ、成人のがんでは近年盛んに研究されている<sup>12)</sup>。

## 1. DNAのメチル化異常

遺伝子中にはCpG部位が集まったCpG islandと呼ばれる領域があり、メチル化、またはメチル化されていない状態で保存されている。遺伝子プロモーター領域のCpG islandは、通常はメチル化されておらず、CpG islandのCがメチル化されると、下流の遺伝子の発現を阻害する。CpG islandでのメチル化はDNA複製時にも安定して保存される。正常細胞では遺伝子プロモーター領域のCpG islandがメチル化されていない状態であり、99.85~99.92%/CpG island 部位/細胞分裂と非常に安定である<sup>13)</sup>。しかし、腫瘍細胞では異常なメチル化が認められ、異常メチル化されたCpG islandが、がん抑制遺伝子のプロモーター領域であれば、がん抑制遺伝子が機能しなくなり(サイレンシング)、その情報は保持され腫瘍化に関与すると考えられる<sup>12)</sup>。

## 2. 神経芽腫でのDNAのメチル化異常の解析

神経芽腫においても遺伝子プロモーター領域のメチ

ル化異常の検討が行われた。Alaminos らは① *TMS-1*, *CCND2* のプロモーター領域のメチル化が stage 4 の神経芽腫で有意に認められたが, stage 4S では認められなかったこと, ② 1 歳以上で *MYCN* 非増幅例での *HOXA9* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が生存率の悪化に関係することを報告した<sup>14)</sup>。また, Yang らは *RASSF1A* 遺伝子, *TSP-1* 遺伝子, *Caspase 8* のメチル化を確認し, 臨床検体での解析で *RASSF1A* 遺伝子のメチル化は予後不良因子であると報告した。しかし, Teitz らが過去に報告した *Caspase 8* のメチル化と *MYCN* 増幅例との関係については否定的な結果を報告した<sup>15)</sup>。さらに, Misawa らは BAMCA 法を用いて神経芽腫での DNA メチル化異常を検索し, *nuclear receptor 1I2 (NR1I2)* 遺伝子の CpG island でのメチル化異常をはじめて同定した<sup>16)</sup> (Close Up 参照)。

### 3. CGI メチル化形質 (CIMP)

Toyota らにより CpG island のメチル化を多数もつた大腸がんが存在することが報告された<sup>17)</sup>。その意義は明確ではない点もあるが, 神経芽腫では CIMP は予後が悪いことが報告され<sup>18)</sup>, 最近, *MYCN* 増幅例 23 例は CIMP をもっていたが, *MYCN* 非増幅例の中にも CIMP 陽性例がみられ, *MYCN* とは独立した予後因子と考えられている<sup>19)</sup>。今後の CIMP と神経芽腫の病態との関係の解析に注目したい。

### 分子病態解明から 分子標的療法へ向けて

1991 年, *TRK* 遺伝子が高親和性神経成長因子の受容体遺伝子であることが明らかになった。近年, *TRK* 受容体を標的にした治療薬が開発された。*TRKA* 受容体を介するシグナルは細胞分化とアポトーシスな

## Close Up

### 進行神経芽腫において *nuclear receptor 1I2* 遺伝子のメチル化による不活化を BAMCA 法で同定した

Misawa A, Inoue J, Sugino Y, et al: Methylation-associated silencing of the *nuclear receptor 1I2* gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 65: 10233-10242, 2005

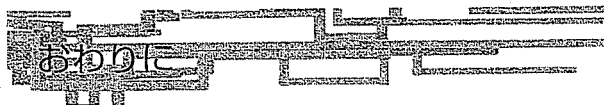
DNA のメチレーションで発現パターンが変化した遺伝子を同定するために, メチル化 DNA 塩基配列をもつヒト遺伝子を解析する方法として, bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification (BAMCA) 法を確立した。神経芽腫の細胞株を用いて BAMCA 法により DNA メチル化異常を検索した結果, *nuclear receptor 1I2 (NR1I2)* 遺伝子が CpG island のメチル化異常によって不活化されていた。*NR1I2* の mRNA は検索した細胞株のうち 73% で発現し, 脱メチル化剤を添加すると, *NR1I2* の mRNA は発現した。*NR1I2* のどの部位に CpG island が位置しているのか検討したところエクソン 3 であり, エクソン 3 の下流にプロモーター領域があることが明らかとなった。さらに, 神経芽腫の腫瘍組織 51 検体で *NR1I2* のメチル化がみられるかを検討した。9/51 で *NR1I2* のメチレーションがみられ, メチレーションのみられた 5/9 は *MYCN* の増幅がみられ, 7/9 は stage III, IVa の進行神経芽腫であり, 統計学的に有意差をもって *NR1I2* のメチル化は進行神経芽腫と関係していると考えられた。

*NR1I2* の既知の遺伝子産物の中で細胞増殖に関する機能をもつものは知られていないが, 今回の検討では *NR1I2* の発現を抑制すると細胞増殖が抑制された。また, *NR1I2* 遺伝子は 3q13.33 にあり過去の検討 (LOH など) では異常は指摘されておらず, 今後の重要な課題であるとともに, *NR1I2* は神経芽腫における診断と予後予測の因子になると考えられる。

ど、神経芽腫の予後良好因子であることが判明し、一方、TRKB 受容体を介するシグナルは細胞増殖<sup>20)</sup>や化学療法に対する抵抗性など、神経芽腫の予後不良因子であることが判明した。そこで TRK 受容体のチロシンキナーゼの阻害剤である CEP-751 の効果が検討され、*in vitro* と *in vivo* において抗腫瘍効果を示すことが確認された<sup>21)</sup>。現在、CEP-751 を経口剤にした CEP-701 を用いて、再発や治療抵抗性の進行神経芽腫の症例に対する臨床試験が行われている。

われわれの施設では、乳幼児に好発する非常に予後の悪い腫瘍である、悪性横紋筋肉腫様腫瘍 (malignant rhabdoid tumor; MRT) に対するチロシンキナーゼを阻害するゲフィチニブ (イレッサ<sup>®</sup>) の効果を検討した<sup>22)</sup>。EGFR の発現する MRT 細胞に対して、ゲフィチニブは *in vitro* と *in vivo* において抗腫瘍効果を示したことから、ゲフィチニブが EGFR の発現する MRT の患者の予後改善のために有用な分子標的治療薬になりうると考えられる。しかし、EGFR の発現と MRT の悪性度との関係の分子病態については未知の点も多く残されており、今後の解明が必要である。

既存の化学療法、外科治療、放射線治療によっても予後の改善しない進行神経芽腫を代表とした難治性小児がんの治療成績の向上は急務である。このためには、①小児がんの分子病態をさらに明らかにすること、②希少疾患である小児腫瘍のため、全国で小児腫瘍に携わる医師・研究者の連携、特に臨床試験などのトランスレーショナルリサーチの基盤整備が必要とされる。そしてさらに、個々の患児の腫瘍の分子病態に適合したテーラーメイド治療の開発につながることを期待される。



小児がんとその分子病態について最近の知見をまとめた。網羅的解析により、遺伝子発現や遺伝子コピー数を解析し、効率よく腫瘍の原因遺伝子を特定できるようになった。さらに原因遺伝子の機能、コードする蛋白質、細胞内シグナル伝達の解析により得られた新たな知識は、今後ますます蓄積すると考えられる。こ

れらの新しい知見によって、個々の腫瘍の病態が解明され、さらに患児の個性にあった治療法が解明されれば、有効性が高く有害事象の少ない治療法が確立されると期待される。

## 文 献

- 1) Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, et al : Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297 (5866) : 479-483, 1982
- 2) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al : Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258 (5083) : 818-821, 1992
- 3) 中川原章 : 神経芽腫の発生とその分子機構. *小児内科* 30 (2) : 143-148, 1998
- 4) Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL : Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist* 8 : 278-292, 2003
- 5) Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, et al : Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma regression. *J Natl Cancer Inst* 94 : 358-368, 2002
- 6) 大平美紀, 中川原章 : 小児固形腫瘍病因解明のための基礎的研究. *小児診療* 67 (4) : 529-536, 2004
- 7) 越川知行, 内田和彦 : 遺伝子診断技術の進歩. *小児診療* 64 (10) : 1461-1469, 2001
- 8) Takita J, Ishii M, Tsutsumi S, et al : Gene expression profiling and identification of novel prognostic marker genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 40 : 120-132, 2004
- 9) Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, et al : PPM 1 D is potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res* 63 : 1876-1883, 2003
- 10) Inazawa J, Inoue J, Imoto I : Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci* 95 : 559-563, 2004
- 11) Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, et al : Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell* 8 : 323-335, 2005
- 12) 宮本和明, 牛嶋俊和 : DNA メチル化と癌—化学療法の標的として—. *癌と化療* 30 (13) : 2021-2029, 2003
- 13) Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, et al : Fidelity of the methylation pattern and its variation in the

- genome. *Genome Res* 13 : 868-874, 2003
- 14) Alaminos M, Davalos V, Cheung NK, et al : Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 96 : 1208-1219, 2004
  - 15) Yang Q, Zage P, Kagan D, et al : Association of epigenetic inactivation of RASSF 1 A with poor outcome in human neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 10 : 8493-8500, 2004
  - 16) Misawa A, Inoue J, Sugino Y, et al : Methylation-associated silencing of the *nuclear receptor112* gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 65 : 10233-10242, 2005
  - 17) Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al : CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 : 8681-8686, 1999
  - 18) Abe M, Ohira M, Kaneda A, et al : CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res* 65 : 828-834, 2005
  - 19) Abe M, Westermann F, Nakagawara A, et al : Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett* (Epub ahead of print)
  - 20) Sugimoto T, Kuroda H, Horii Y, et al : Signal transduction pathways through TRK-A and TRK-B receptors in human neuroblastoma. *Jpn J Cancer Res* 92 : 152-160, 2001
  - 21) Evans AE, Kisselbach KD, Yamashiro DJ, et al : Antitumor activity of CEP-751 (KT-6587) on human neuroblastoma and medulloblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* 5 : 3594-3602, 1999
  - 22) Kuwahara Y, Hosoi H, Osone S, et al : Antitumor activity of gefitinib in malignant rhabdoid tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res* 10 : 5940-5948, 2004

## および厚生労働科学研究檜山班の実施要綱

(財)静岡県予防医学協会○石山洋 久保田倫子 中山泰行 石黒満 三間屋純一(5) 檜山英三(6)

【要旨】【目的】神経芽細胞腫(以下NB)は小児固形がんの中で最も高い発症率を示す。しかし、尿中腫瘍マーカー、VMA およびHVA を測定することで早期発見が可能である。この原理に基づき昭和54年から6~9ヶ月の新生児マスキングが開始された。しかし平成15年、厚生労働省は、「スクリーニング発見により増加した治療不要の予後良好例に対して過剰な診断と治療が行われたこと」、「予後不良例の早期発見による死亡率減少に一定の見解が得られていなかったこと」を理由にこのスクリーニングを公費で行うことを休止した。これに対し当協会の集計によれば、6~9ヶ月スクリーニングを受検しなかった群において、1~3.5歳の年齢で、臨床的にNBが発症確認される割合は、スクリーニングを受検、「異常なし」群で確認されるものの2倍以上もあることがわかった。私共は、このことはNBスクリーニングの有効性を示唆するものと考えた。そこで良性腫瘍を発見するリスクを回避したうえでNBを早期発見できるよう、検査時期を1歳6ヶ月の年齢とし、希望者に対するNBスクリーニング継続を決定した。また、精密検査については、今までどおりに受けられることになった。

【方法】平成元年4月~平成13年6月の期間に6~9ヶ月スクリーニング受検対象月齢であった児を対象として、臨床的に発見されたNB数を下記の2群に分類して集計した。

- ①受検しなかった群 81,699人
- ②受検して「異常なし」だった群 364,677人

ここで、この期間の最後に受検した児が3.5歳になるまでの臨床例を調査した。検査法は全て高精度の高速液体クロマトグラフ法(以下HPLC法)を使用、小さな腫瘍の早期発見が可能である。また、臨床データは1つの精密検査医療機関のものであるが、静岡県において神経芽細胞腫が臨床的に発見された場合、ほとんどがこの機関を受診するため、集計結果の信頼性は高いものと考えた。

【結果】受検の有無による「臨床で発症が確認されたNB」発見率比較

- ①平成元年4月~平成13年6月の期間で受検しなかった児は1~3.5歳で **12,000人に1人発症**
- ②平成元年4月~平成13年6月の期間で受検して「異常なし」は1~3.5歳で **26,000人に1人発症**

①、②の結果より、スクリーニングを受検しなかった群では1~3.5歳で、NB発症が臨床的に確認される割合が、スクリーニングを受検、「異常なし」であった群の割合に対して2倍以上であることがわかった。また、表1に①、②のNB患児発見年齢と、発見時の腫瘍マーカー測定値を示した。

この表から、NBスクリーニング年齢を1歳6ヶ月に設定すれば、1歳7ヶ月~2歳6ヶ月程度までのNBを臨床例より早期発見できる可能性があると考えられた。当協会としては、これらのことから、希望する保護者に対して、1歳6ヶ月児に対してのNBスクリーニングを継続することとした。

【考察】静岡県では精密検査医療機関の医師(5)および当協会検査担当者が厚生労働省科学研究費「登録症例に基づく神経芽細胞腫マスキングの効果判定と医療体制の確立に関する研究班」(以下檜山班)の研究協力者として参加している。そこで当協会では檜山班の「生後18ヶ月幼児に対する神経芽腫マスキング実施要綱」に基づいて平成17年度から1歳6ヶ月児に対してのNBスクリーニングを継続することとした。現在のシステムでスクリーニングを受ける場合、各市町村の1歳児検診等で保健センターからの検査紹介(パンフレット等)を受け、希望した保護者が協会に連絡、検査セットが郵送される。また検査にご理解をいただいた小児科医師によるセット配布も行われている。17年度からの検査年齢変更の影響で受検者数が減少、平成18年度9月までで687件となっている。

静岡県では県内全体を30数個所の保健センターが管轄している。このうち、25以上の保健センターに属する地区の保護者から検体が送られてきていることがわかった。このことで保健センターにおける検査ご紹介を続けていただいていることがよく理解できる。保健師さんによるたゆまぬご協力に深謝したい。当協会としては、今後も1人でも多くのNB患児を発症以前の早期に発見、患児および保護者の

QOLを少しでも改善することを第一の目的としてこの事業を続けていく所存である。

表1 6~9ヶ月で受検しなかった群、受検した群について、臨床的にNBが発見された年齢と、発見時の腫瘍マーカー測定値

(VMA 測定値/HVA 測定値)

□ Stage2    ▨ Stage3    ■ Stage4

No	6~9ヶ月結果	発見した年齢				
		1歳	1歳	2歳	2歳	3歳
		1ヶ月~6ヶ月	7ヶ月~2歳	1ヶ月~6ヶ月	7ヶ月~3歳	1ヶ月~6ヶ月
1	受検しなかった			17/16		
2		23/37				
3			発見			
4						6/90
5		発見				
6						18/280
7					20/190	
8	12/23		18/37			
9	9.5/18	22/18				
10	正常				11/94	
11	9.8/15				260/170	
12	正常				130/83	
13	7.9/11			47/200		
14	13/20			24/390		
15	10/25				33/95	
16	12/14					420/410
17	11/23	130/160				
18	12/15		260/200			
19	7/15	8/13				
20	11/16			3.4/39		
21	10/20			65/88		

6~9ヶ月児カットオフ値:VMA/HVA=15/27 6~9ヶ月検査ではすべて正常

1歳6ヶ月児カットオフ値:VMA/HVA=14/23

単位:μg/mg クレアチニン

県外からの転入児のNBは0

転出した児の発症例は未確認

検査を受けなかった児の総数は静岡県内の年間出生数を用い、(出生数) - (受検者数) = (受検しなかった数) を算出

【参考文献】厚生労働省科学研究費「登録症例に基づく神経芽細胞腫マスキリーニングの効果判定と医療体制の確立に関する研究班」

檜山班による「生後 18 ヶ月幼児に対する神経芽マスキリーニング実施要綱」の要旨抜粋  
澤田淳<sup>1)</sup>中山雅弘<sup>2)</sup>赤澤宏平<sup>3)</sup>藤田晃三<sup>4)</sup>三間屋純一<sup>5)</sup>檜山英三<sup>6)</sup>

1)京都市子ども保健医療相談・事故防止センター

2)大阪府母子保健総合医療センター

3)新潟大学医歯学総合病院医療情報部

4)札幌市衛生研究所

5)静岡県立こども病院

6)厚生労働省科学研究費「登録症例に基づく神経芽細胞腫マスキリーニングの効果判定と医療体制の確立に関する研究班」研究代表 広島大学自然科学研究支援開発センター

平成 16 年度に開始された「檜山班」にて現在以下の結果を得ております。

**(1)神経芽細胞腫の罹患と死亡の正確な把握について:**

神経芽腫は大きく 3 つのサブグループに分かれる。

1 型(自然退縮型 60%) 2A 型(進行型 30%) 2B 型(高度悪性 10%)

**(2)神経芽細胞腫マスキリーニング(以下マス)の実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価:**

過剰診断がなく、予後不良例を早期発見するスクリーニングとしての実施時期は生後 18 ヶ月が適切である。

**(3) 神経芽細胞腫による死亡の減少を目指した、臨床診断と治療の向上のための研究の推進と実施体制の確立:腫瘍のゲノム異常から、自然退縮・分化する腫瘍が選別可能である。**

そこで現時点で得られているエビデンスをまとめると以下ようになります。

①現在でも、年長児特に 2 歳以降の神経芽腫 2A 型の治療成績は不良である。

②6 ヶ月マスで 2 歳以降の神経芽腫の発症数と神経芽腫全体の死亡率が低下した。

③6 ヶ月マスで簡便診断される腫瘍(1 型腫瘍)は生後 18 ヶ月までに検出できなくなる。

④18 ヶ月マスを無料で施行している自治体札幌、大阪、京都等が現在成果をあげている。

▽ 図 1

以上の結果から、2 歳以降に多い予後不良な神経芽腫(2A 型腫瘍)を早期発見し、本症の治療成績を向上させるためのスクリーニングの実施時期としては生後 18 ヶ月が有効と考えられ、その有効性を実証するためには十分な対象(約 60 万人出生対象)による前向き研究が必要である。

(中略)

少子化の時代に、小児の病死の第一位である小児がんでの死亡をできるだけ少なくすることは、われわれ小児医療に取り組んでいるものの大きな目標であり、その一方で、多数の母集団を必要とする研究には多くの自治体の研究へのご理解とご参加が必至であります。

(中略)

ひとりの神経芽腫の子どもを合併症なく助けることは、ただ、1 人の命を助けるだけでなく、未来への子孫をも救う極めて重要な意義があります。小児がんでなくなる子どもを早期発見し救命することの意義は、計り知れないものがあり、笑顔で退院している小児がんの子どもを少しでも増やすことは、小児がんの子どもだけでなくその家族の幸せにつながると信じています。

厚生労働省科学研究費「登録症例に基づく神経芽細胞腫マスキリーニングの効果判定と医療体制の確立に関する研究班」研究代表 檜山英三

〈備考〉

1 歳 6 ヶ月スクリーニングによる発見例

大阪府 46,449 件検査 6 例発見 京都府 8,014 件検査 1 例発見 札幌市 約 3,500 件検査 1 例発見

## LETTER TO THE EDITOR

## Neuroblastomas That Might Benefit From Mass Screening at 6 Months of Age in Japan

To the Editor: Dr. William Woods wrote a commentary in our article "Biology of Neuroblastomas That Were Found by Mass Screening at 6 Months of Age in Japan" in the March issue of *Pediatric Blood & Cancer*, and raised three questions; (1) the incidence of screened infants in our study was much lower than that of Japanese infants nationwide; (2) difference in socio-economic status or medical reasons between screened and unscreened infants may have led to different outcomes; and (3) details of three infants in the intermediate group who died were not described [1,2]. We would like to respond to the questions.

The study was based on the availability of tumor samples sent from various institutions throughout Japan. Data on the mass screening (MS) status were available from 128 of the 166 patients diagnosed clinically; 63 were unscreened, and 65 were screened with negative results and later developed neuroblastoma. Thus, the incidence of screened patients was 85% (352/415), being comparable to the incidence nationwide. Japanese studies compared mortality rates between screened and unscreened populations [3,4]. The local government of Ishikawa prefecture in Japan studied the socio-economic status of families that participated in the MS compared to that of families that did not [5]. They found no differences in the economic status or family structure between the screened and unscreened children. These findings together with the Japanese health care system that covers all cancer-related medical expenses in children do not seem to support the statements made by Dr. Woods.

Three infants in the intermediate risk group diagnosed clinically and subsequently died were unscreened: a 10 days old with stage 4S died of cardiovascular dysfunction without receiving chemotherapy, and a 2 months old with stage 4S died of progressive disease 8 months after receiving chemotherapy. Another infant developed a stage 3 tumor at 10 months of age, and died of progressive disease 62 months after receiving chemotherapy. The MS status was known in 40 of the 47 children  $\geq 12$  months of age in the intermediate-risk group diagnosed clinically. Overall, survival at 6 years was  $55.8\% \pm 12.6\%$  for 17 unscreened children, and  $39.1\% \pm 10.2\%$  for 23 screened children ( $P = 0.141$  by log-rank). Intermediate risk tumors occupied 10.5% of MS-positive tumors, and these tumors would have developed and been found clinically at a later age in the children without screening. Furthermore, we consider that the early diagnosis and treatment would have saved half of these infants from dying.

We suggest that surgical mortality of MS-positive infants decreased in the last 15 years in Japan because surgeons with experience and knowledge of benign biological characteristics of MS-positive neuroblastomas tried to avoid aggressive surgical procedures. In addition, the Japanese program detected about 2,500 infants with neuroblastoma over 20 years, which is 10 times higher than the numbers detected by other programs [6-8]. We assume that epidemiological studies on a larger number of infants combined with the low surgical mortality in Japan may result in a significant reduction in mortality. Recently, *MYCN* amplification in neuroblastomas was detected using serum DNA [9]. When we become able to identify intermediate-risk neuroblastomas using blood samples, we hope to say "let us try it one more, once."

Yasuhiko Kaneko, MD\*  
Division of Cancer Diagnosis  
Research Institute for Clinical Oncology  
Saitama Cancer Center  
Saitama, Japan

## REFERENCES

1. Woods WG. Let's try it one more, once. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46:271-272.
2. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, et al. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:285-291.
3. Yamamoto K, Ohta S, Ito E, et al. Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: Cohort study in seven prefectures in Japan. *J Clin Oncol* 2002;20:1209-1214.
4. Hayashi K, Fujita T, Katanoda K, et al. Effectiveness of mass-screening program on neuroblastoma mortality in 1995-2000 birth cohort of Japan: Nationwide neuroblastoma mortality study. Presented at 11th conference on advances in neuroblastoma research, Genoa, Italy. In abstract p93. 2004.
5. Department of Health and Welfare, the Ishikawa Prefecture Government. An attitude survey of families having screened or unscreened

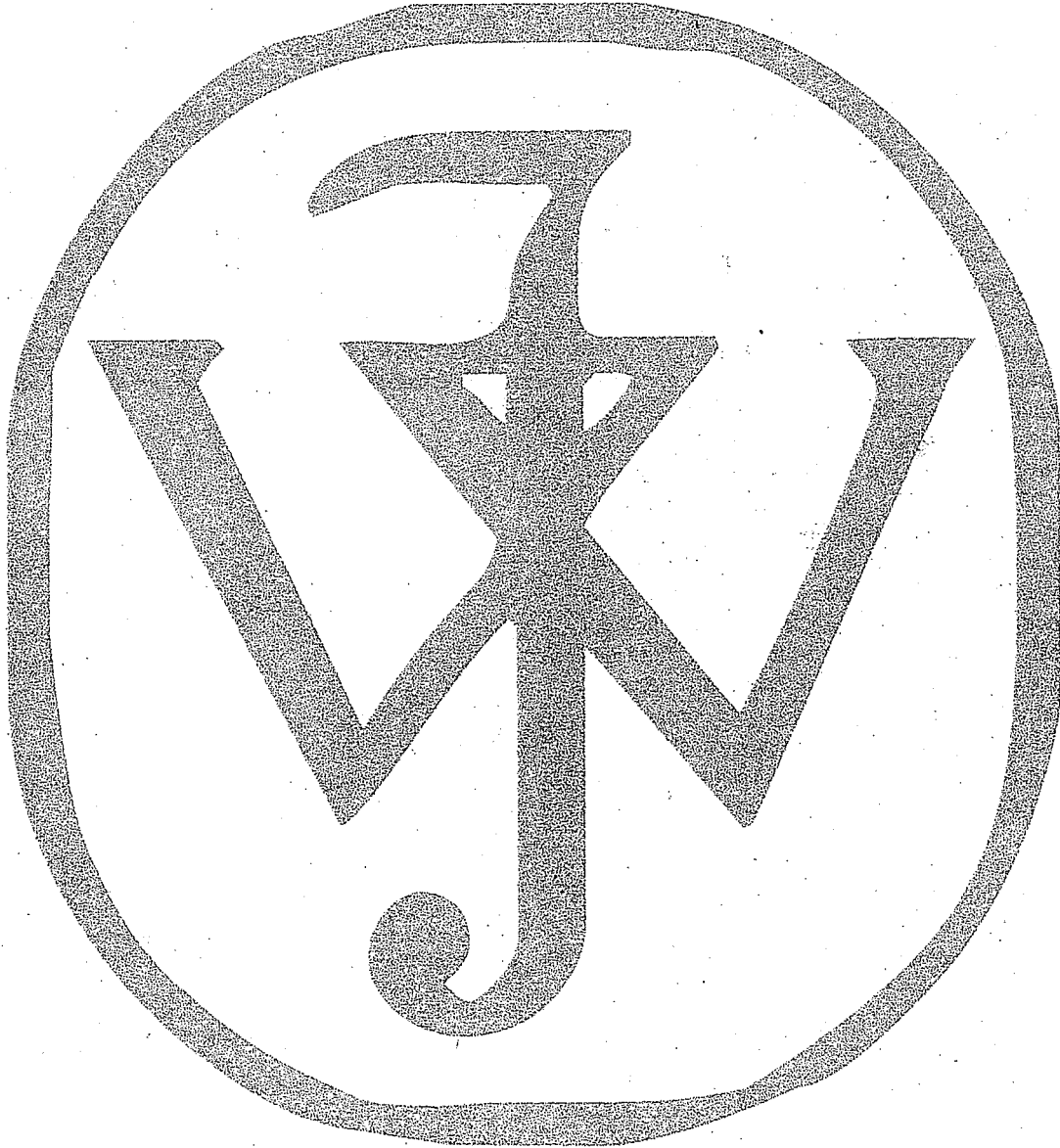
\*Correspondence to: Yasuhiko Kaneko, Division of Cancer Diagnosis, Research Institute for Clinical Oncology, Saitama Cancer Center, 818 Komuro, Ina, Saitama 362-0806, Japan.  
E-mail: kaneko@cancer-c.pref.saitama.jp

Received 13 March 2006; Accepted 24 March 2006



children. Report on the mass screening program in Ishikawa prefecture. March, 1999 [in Japanese].

6. Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 2002;346:1041–1046.
7. Schilling FH, Spix C, Berthold F, et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002;346:1047–1053.
8. Report of the committee on mass screening program for neuroblastoma in Japan. *Jpn J Pediatr Oncol* 2003;403:286–298 [in Japanese].
9. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, et al. Prediction of *MYCN* amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 2005;23:5205–5210.



## Relationship of *DDXI* and *NAG* gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with *MYCN*-amplified neuroblastoma

Setsuko Kaneko · Miki Ohira · Yohko Nakamura ·  
Eriko Isogai · Akira Nakagawara · Michio Kaneko

Received: 14 June 2006 / Accepted: 28 August 2006  
© Springer-Verlag 2006

### Abstract

**Purpose** Amplification of the *MYCN* gene strongly correlates with advanced stage, rapid tumor progression and poor prognosis in neuroblastoma (NB). Several genes in the *MYCN* amplicon, including the DEAD box polypeptide 1 (*DDXI*) gene, and neuroblastoma-amplified gene (*NAG* gene), have been found to be frequently co-amplified with *MYCN* in NB. The aim of this study was to clarify the prognostic significance of the co-amplification or overexpression of *DDXI* and *NAG* with *MYCN*.

**Procedure** The gene copy numbers and mRNA expression levels of *MYCN*, *DDXI*, and *NAG* in 113 primary NBs were determined by the real-time quantitative polymerase chain reaction or quantitative reverse transcriptase/polymerase chain reaction assay. The relationships between gene co-amplification/overexpression status and stage, age at diagnosis, and overall survival were analyzed.

**Results** For evaluating the frequency of *DDXI* and *NAG* co-amplification, it proved appropriate to discriminate NBs with <40 copies of *MYCN* amplification from those with  $\geq 40$  copies of *MYCN* (*DDXI*,  $p = 0.00058$ ; *NAG*,  $p = 0.0242$ ,  $\chi^2$  for independence test). In patients with *MYCN*-amplified NB aged  $\geq 18$  months, those with

tumor with enhanced *DDXI* expression and low-*NAG* expression showed a significantly better outcome than those with low-*DDXI* expression or enhanced *NAG* expression ( $p = 0.0245$ , log-rank test). None of the gene expression statuses had a significant relation to disease stage or survival for patients <18 months old. No relationship between any gene co-amplification status and disease stage, age at diagnosis, or overall survival was found.

**Conclusions** Our findings suggest that there may be a subset of NB in which enhanced *DDXI* and low-*NAG* expression consequent to *DDXI* co-amplification without *NAG* amplification contributes to susceptibility to intensive therapy. A larger study using an age cut-off of 18 months will be required.

**Keywords** Neuroblastoma · *MYCN* · *DDXI* · *NAG*

### Abbreviations

NB	Neuroblastoma
<i>DDXI</i>	DEAD box polypeptide 1 gene
<i>NAG</i>	Neuroblastoma-amplified gene
hnRNP K	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
q-RT-PCR	Quantitative reverse transcriptase/polymerase chain reaction
<i>BCM</i>	B-cell maturation factor gene
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

### Introduction

Neuroblastoma (NB) is one of the most common malignant solid tumors in childhood. It presents with

S. Kaneko (✉) · M. Kaneko  
Department of Pediatric Surgery,  
Institute of Clinical Medicine,  
University of Tsukuba,  
Ibaraki 305-8575, Japan  
e-mail: mkaneko@md.tsukuba.ac.jp

M. Ohira · Y. Nakamura · E. Isogai · A. Nakagawara  
Division of Biochemistry,  
Chiba Cancer Center Research Institute,  
Chiba 260-8717, Japan

wide aggression from spontaneous regression or tumor maturation to rapid progression and fatality in most metastatic tumors diagnosed in children more than 1 year old. *MYCN* amplification occurs in about 25% of NB and is one of the most important markers in determining the aggressiveness of NB. Amplification of *MYCN* strongly correlates with advanced disease stage, rapid tumor progression and poor prognosis (Brodeur et al. 1984; Seeger et al. 1985; Brodeur and Seeger 1986). The size of the *MYCN* amplicon can span from 100 to 1,500 kb (Amler and Schwab 1989). Consequently, it is possible to suggest that additional genes being present in the amplicon and co-amplified with *MYCN* may contribute to the tumor phenotype. So far, several genes including the *DDXI* (DEAD box polypeptide 1) gene and *NAG* (NB-amplified gene) gene have been found to be frequently co-amplified with *MYCN* in NB (Beheshti et al. 2003; Scott et al. 2003a).

The *DDXI* is one of a family of genes that encode DEAD (asp-glu-ala-asp) box proteins. This gene maps to chromosome band 2p24 and 340 kb 5' of *MYCN* (Godbout and Squire 1993; Kuroda et al. 1996). Proteins with the DEAD box motif are putative ATP-dependent RNA helicases and more than 30 proteins have been identified from bacteria to humans (De Valoir et al. 1991; Kitajima et al. 1994). By altering the RNA secondary structure, they are implicated in diverse cellular processes such as RNA splicing, ribosome assembly, and translation initiation (Tanner and Linder 2001). Some members of the family are differentially expressed during embryogenesis, cellular growth, and division (Schmid and Linder 1992; Iost and Dreyfus 1994; Godbout et al. 2002). The biological function of DDX1 remains unknown. In recent studies, DDX1 was found to associate with factors involved in 3'-end cleavage and polyadenylation of pre-mRNAs (Bleoo et al. 2001). DDX1 was also shown to have protein-protein interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K), and to have poly(A) RNA binding activity (Chen et al. 2002).

The *DDXI* gene has been known to be co-amplified with *MYCN* in 40–70% of NBs. There are reports showing a trend toward a worse clinical outcome with *MYCN* and *DDXI* co-amplification (Squire et al. 1995; George et al. 1997). Others have reported no significant difference in the clinical outcome or survival between patients with or without *DDXI* co-amplification (Manohar et al. 1995; De Preter et al. 2002). In a recent study of 98 *MYCN*-amplified NBs, a significant correlation of *DDXI* co-amplification with a better prognosis and improved patient survival was

shown by using semiquantitative multiplex PCR (Weber et al. 2004). In contrast to the observations by Weber et al., De Preter et al. have concluded that *DDXI* co-amplification had no significant prognostic value in *MYCN*-amplified tumors by re-evaluating their data (De Preter et al. 2005). The prognostic significance of *MYCN* and *DDXI* co-amplification has not been determined.

Recently, Scott et al. reported that the 5' end of *NAG* is located 30 kb telomeric to *DDXI*, with the two genes lying in opposite orientations (Scott et al. 2003b). They found a significant association between low-disease stage in *MYCN*-amplified tumors and *NAG* co-amplification. The function of *NAG* is as yet unclear.

To date, there have been no reports of measuring and analyzing accurate copy numbers and precise mRNA expression levels of *MYCN*, *DDXI*, and *NAG* genes in NB. In order to clarify the prognostic significance of the co-amplification or gene expression of *DDXI* and *NAG* with *MYCN*, we determined gene copy numbers and mRNA expression levels of *MYCN*, *DDXI*, and *NAG* genes in 113 primary NBs using the real-time quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) or quantitative reverse transcriptase/polymerase chain reaction (q-RT-PCR) assay. The results were analyzed in relation to stage, age at diagnosis and overall survival.

## Materials and methods

### Tumor samples

One hundred and thirteen primary NBs were obtained from the Department of Pediatric Surgery, University of Tsukuba, and the Division of Biochemistry, Chiba Cancer Center Research Institute, Japan. Tumors detected by mass screening were excluded. Patients were aged between 0 months and 14 years at diagnosis (median 18 months). All 52 nonsurvivors died of progressive disease, while 59 of 61 survivors are free of the disease.

Tumors with the haploid *MYCN* gene copy number of more than five and less than two by the q-PCR assay were considered as *MYCN* amplified and unamplified, respectively.

### DNA or RNA extraction

Tumor DNA was isolated by proteinase K/SDS digestion followed by phenol-chloroform extraction according to the standard protocol. DNA from human

placenta and a NB cell line CHP 134 were used as templates for the reference B-cell maturation factor (*BCM*) gene and test genes, respectively. The CHP 134 cell was found to have multiple copies of *MYCN*, *DDXI*, and *NAG* genes by preliminary q-PCR.

Total RNA was prepared from frozen tumor tissue according to the Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform method (Chomczynski and Sacchi 1987). One microgram of each RNA was incubated with random primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to yield cDNA.

#### Real-time q-PCR

Real-time q-PCR was carried out using the ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by De Preter et al. with modification (De Preter et al. 2002). For quantification of the gene copy number, TaqMan probe assay was performed. The nucleotide sequences of the primers used are *MYCN*-f 5'-CGCAAAGCCACCTTCATTA-3' and *MYCN*-r 5'-TCCAGCAGATGCCACATAAGG-3', *DDXI*-f 5'-TAGGAGGAGGTGATGTACTTATGGTAA-3' and *DDXI*-r 5'-AGCCTATGCAATTCTTAGAGTGTGT-3', *NAG*-f 5'-GACCAAGAACTTCTTTCCCTGC-3' and *NAG*-r 5'-GGTCAACAATACGTGGATAGAAGG-3', and *BCM*-f 5'-CGACTCTGACCATTGCTTTCC-3' and *BCM*-r 5'-AAGCAGCTGGCAGGCTCTT-3'.

The sequences of the TaqMan probes are *MYCN* 5'-FAM-TTCTGTAAATACCATTGACACATCCGCTT-TAMRA-3', *DDXI* 5'-FAM-CCCAGCTACC AATCACCTCACAAATT-TAMRA-3', *NAG* 5'-FAM-CAAGCTGCTGGTGAAGTGTGTCTCCA-TAMRA-3' and *BCM* 5'-FAM-CAACCATTCTTGTCACCACGAAAACGAA-TAMRA-3'. Twenty microliter of PCR reaction mixture for copy number determination consisted of template DNA, 1× q-PCR Mastermix (EUROGENTEC, Liège, Belgium), 300 nM of each primer and 200 nM of TaqMan probe. *MYCN*, *DDXI* or *NAG* gene assay was performed containing no-template control, standard CHP 134 DNA of five serial tenfold dilutions ranging from 100 ng to 10 pg, 10 ng of human placental DNA as a calibrator and ~10 ng of tumor DNA. The reference *BCM* gene assay included no-template control, standard human placental DNA of four serial tenfold dilutions ranging from 200 to 0.2 ng, 10 ng of human placental DNA as a calibrator and ~10 ng of tumor DNA. *BCM* gene is mapped to 16p13.1 and is located in a chromosomal region that rarely shows genetic abnormality (Vandesompele et al. 2001). Experiments were carried out in triplicate. The thermal cycling conditions for q-PCR

and q-RT-PCR were: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

#### Real-time q-RT-PCR

Expression levels of *MYCN*, *DDXI*, and *NAG* genes were measured in cDNA by the ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was used as an internal control gene. cDNA from one of the 113 samples examined was used as the standard template because of its appropriate expression levels of *MYCN*, *DDXI*, *NAG*, and *GAPDH* mRNA by preliminary q-RT-PCR. The specific primers used are *MYCN*-f 5'-CACAAGGCCCTCAGTACCTC-3' and *MYCN*-r 5'-CAGTGACCACGTCGATTTCTT-3', *DDXI*-f 5'-TGGAAGAGATGGATTGGCTC-3' and *DDXI*-r 5'-CCTGTTTCTGCAGCCATAAGTAC-3', *NAG*-f 5'-CAAATCACGGCAGTCACTACG-3' and *NAG*-r 5'-ACACACTTCACCA GCAGCTTG-3', and *GAPDH*-f 5'-GAAGGTGAA GGTCCGAGTC-3' and *GAPDH*-r 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'. The sequences of the TaqMan probes are *MYCN* 5'-FAM-AGAGGACACCCTGAGCGATTTCAGATG-TAMRA-3', *DDXI* 5'-FAM-CAACTGATATCCAGGCTGAATCTATCCCA-TAMRA-3', *NAG* 5'-FAM-TGTGACCAAGAACTTCTTTCCCTGCTCCT-TAMRA-3' and *GAPDH* 5'-FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA-3'. The primers and probes were designed to be located on exons 2–3 for *MYCN* mRNA, exons 2–4 for *DDXI* mRNA, exons 51–52 for *NAG* mRNA, and exons 4–6 for *GAPDH* mRNA.

Twenty microliter of the PCR reaction mixture for quantification contained template cDNA, 1× qPCR Mastermix (EUROGENTEC), 300 nM of each primer and 200 nM of TaqMan probe. Each assay consisted of no-template control, standard cDNA of five serial tenfold dilutions ranging from 1 µg to 0.1 ng, and ~5 ng of tumor cDNA.

#### Statistical analysis

The relation of *DDXI* or *NAG* gene amplification to *MYCN* gene copy number was tested using  $\chi^2$  for an independence test. Correlations between the gene amplification/expression status and disease stage or age at diagnosis were compared by  $\chi^2$  for an independence test or Fisher's exact probability test. Mann-Whitney's *U*-test was used to evaluate the relationship between the gene expression level in tumors with or without gene amplification. Survival analysis was performed according to the Kaplan-Meier method and the log-rank test.