

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
研究報告書

札幌市における神経芽腫スクリーニング － 1才2ヶ月の成績と1才6ヶ月スクリーニングへの移行－

研究協力者 花井 潤師¹ 福士 勝¹ 藤田 晃三¹ 西 基²
飯塚 進³ 内藤 春彦⁴
¹札幌市衛生研究所
²北海道医療大学看護学部
³北海道がんセンター小児科
⁴北海道がんセンター外科

研究要旨

札幌市では、6MS陰性後に発病する神経芽腫の早期発見を目的に1991年から14MSを開始した。14MS受検群が非受検群に比べ、神経芽腫の発生率の相対危険度が4分の1になること、14MSを受検することで2才前後の患者の発生を防止することなど、一定の効果が確認されたが、一方で、発見頻度は5,430人に1人と高頻度であり、発見例の腫瘍性状は6MSと同様、予後良好な腫瘍が多数を占め、自然退縮する可能性のある腫瘍について、過剰な治療をしている可能性は否定できなかった。

このことから、檜山班の前向き介入研究が開始されたことに伴い、札幌市の14MSについても、対象を1才6ヶ月に変更し、2006年4月から18MSを開始した。これまで、2例の神経芽腫患児を発見したが、今後、症例を重ね、18MS発見例とともに18ヶ月以前の発病例など腫瘍の性状を検討し、18MSの有効性を検証したいと考える。

A. 研究目的

札幌市では、1981年から生後6ヶ月（以下6MS）を、1991年からは生後1才2ヶ月（以下14MS）を対象に神経芽腫スクリーニングを実施してきたが、6MS休止に伴い、2004年度からは14MSだけを実施してきた。その後、檜山班「前向き介入研究」が実施されることに伴い、2006年4月から、1才6ヶ月（以下18MS）に移行して実施することとした。今回、札幌市の14MSの成績と問題点、18MSへの移行とスクリーニング結果について報告する。

B. 研究方法

14MSの疫学的検討の対象は、札幌市の1990～2000年の出生コホート180,959人で、2001年末まで

の観察期間において、14MS陰性後発病した例（以下陰性例）3人、14MS未受検で発病した例（以下未受検例）5人であった。

C. 研究結果

1. 14MSの成績：1991年から2006年3月までの受検者数は173,4523人で、発見例は32人で、発見頻度は5,430人に1人であった。
2. 14MSの効果
 - 1) 14MS導入後、3例の陰性例の発病時期は31、35、60ヶ月で、その他の発病例はいずれも14MSを受検していない症例で、14MS導入以前に6MS陰性例として発病していた2才前後の発病例はほぼ消失した（図1）。
 - 2) 札幌市の出生コホートのうち、6MS陰性群につ

いて、14MS受検群（691,348人年）と14MS未受検群（277,346人年）での発病例はそれぞれ3人、5人であり、発生率の相対危険度は0.241（95%信頼区間：0.058-1.007）であった。

3. 14MSの問題点

6MS発見例46例と14MS発見例26例について、MYCN増幅、嶋田分類、Trk-A発現などの予後因子を比較すると、両者の腫瘍の生物学的性状はきわめて類似し、14MSにおいても自然退縮する可能性のある予後良好な腫瘍が多いことが示唆された（図2）。

4. 18MSへの移行

1) 検査セットの配布

保健センターで実施する1才6ヶ月健康診査の案内を配布する際、検査セットを同封し、1才6ヶ月までに検査を受けるよう勧奨した。その結果、受検した児の年齢は生後18ヶ月以前が全体の約75%を占めていた（図3）。

2) 検査説明書

インフォームドコンセント取得の観点から、病気の説明、スクリーニング検査の目的、Q & Aなどの内容をより充実させ、検査の意義を理解した

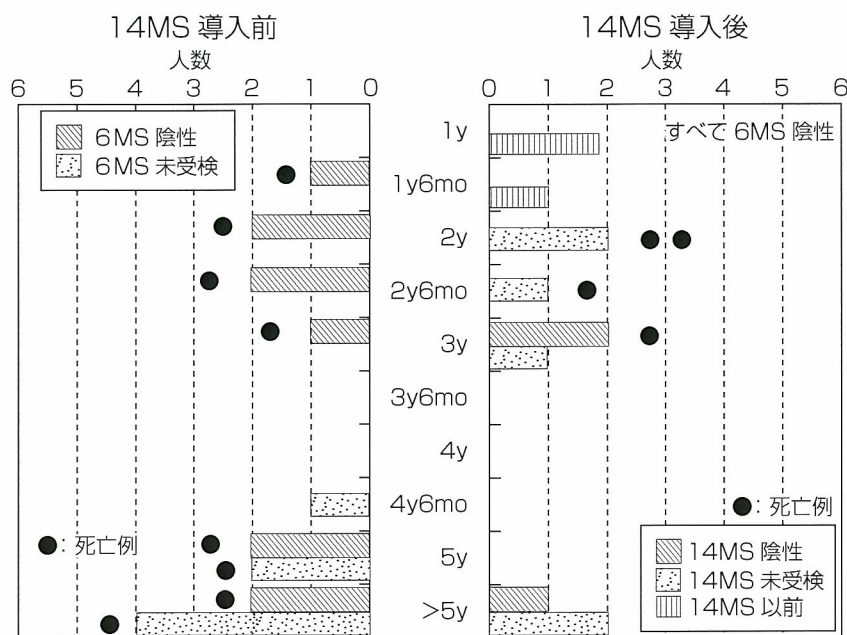


図1. 神経芽腫患者の発病年齢分布

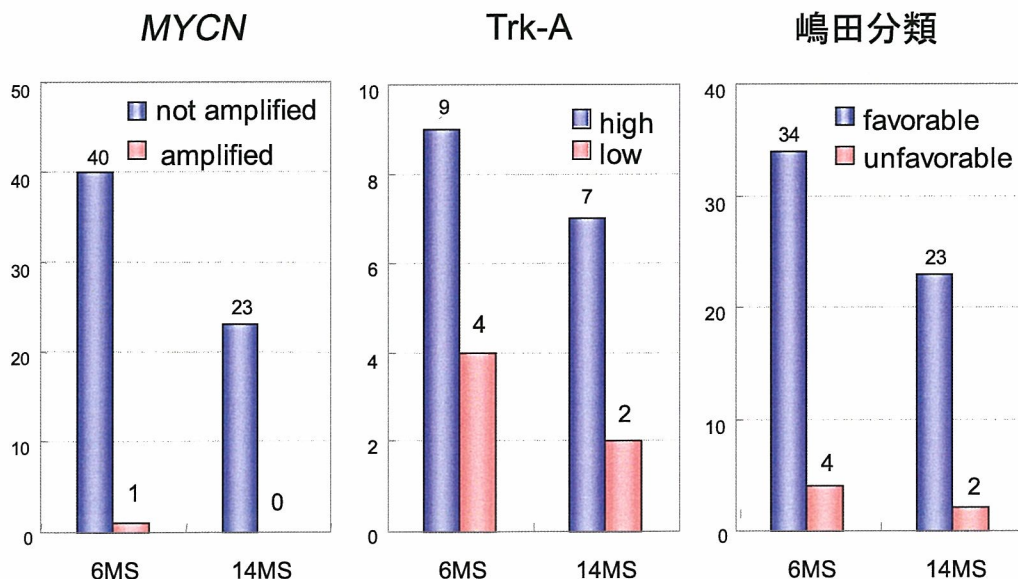


図2. 6MS と 14MS 発見例の腫瘍の生物学的性状

上で受検してもらうよう申込書の改訂をした。

3)尿中 VMA,HVA のカットオフ値

VMA 13 $\mu\text{g} / \text{mg creatinine}$ 、HVA 27 $\mu\text{g} / \text{mg creatinine}$ とした。

5. 18MS の結果

2006年4月から10月末までに4387人が受検し、2例の神経芽腫患児を発見した。受検率は74.2%で14MSと同程度であった。

発見患児の手術時年齢はいずれも1才6ヶ月を超えており、後腹膜原発で正中発生 of 神経芽腫と診断された。いずれも Stage III で、嶋田分類は、Unfavorable であった。

症例1は、周囲血管との関係から生検のみとなっており、現在、化学療法を施行している。予後因子については、MYCN増幅なし、Diploidy,尿中 VMA, HVA はやや高値であった。

症例2については、尿中 VMA, HVA は軽微な上昇程度で原発腫瘍は部分切除にとどまり、現在、化学療法を施行している (表1)。

D. 考 察

札幌市では、6MS陰性後に発病する神経芽腫の早期発見を目的に1991年から14MSを開始した。14MSを受検することで、14MS受検群が非受検群に比べ、神経芽腫の発生率の相対危険度が4分の1になること、14MSを受検することで2才前後の患

表1. 18MS発見症例

	症例 1	症例 2
手術時年齢	1才6ヶ月	1才6ヶ月
病 期	Stage III	Stage III
原発部位	後腹膜 (生検)	後腹膜 (部分切除)
嶋田分類	Unfavorable	Unfavorable
MYCN	増幅なし	-
Ploidy	diploidy	-
LDH	355 IU	289 IU
NSE	68.4 ng/ml	28.7 ng/ml
VMA	41.2 $\mu\text{g} / \text{mg cre}$	17.3 $\mu\text{g} / \text{mg cre}$
HVA	44.2 $\mu\text{g} / \text{mg cre}$	33.2 $\mu\text{g} / \text{mg cre}$

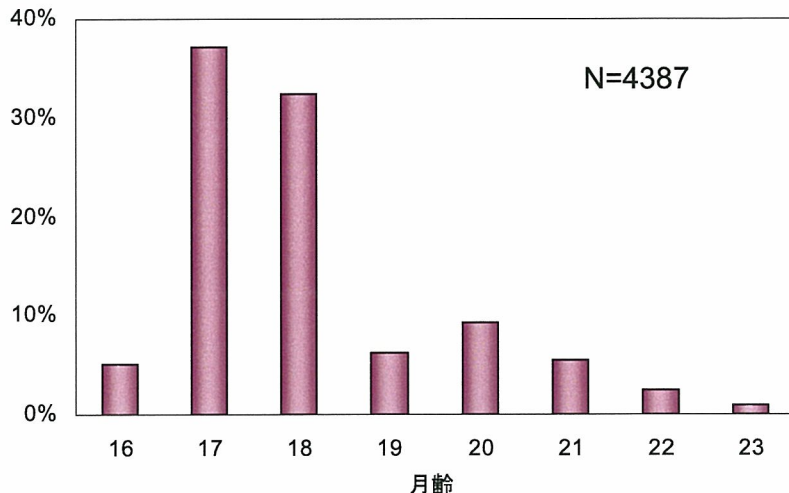


図3. 18MS 受検者の年齢分布

者の発生を防止することなど、14MSによる患者発生防止の一定の効果が確認された。

一方で、発見頻度は6MSを受検した群にもかかわらず、5,430人に1人と高頻度であり、発見例の腫瘍性状は、6MSと同様、予後良好な腫瘍が多数を占め、自然退縮する可能性のある腫瘍について、過剰な治療をしている可能性は否定できなかった。

このような結果を踏まえ、檜山班の前向き介入研究が開始されたことに伴い、札幌市の14MSについても、対象を1才6ヶ月に変更し、2006年4月から18MSを開始した。受検した児の年齢分布は、生後18ヶ月以内が約75%であり、発病年齢18ヶ月をリスクファクターと考えると、適切な時期にスクリーニングが行われていると考えられた。

発見例2例はいずれも後腹膜原発の Stage III であり、正中発生のため周囲血管との関係から、1例は生検のみ、1例は部分切除であったが、今後、症例を重ね、18MS発見例とともに、18ヶ月以前の発病例など腫瘍の性状を検討し、18MSの有効性を検証したいと考える。

E. 結 論

18MSへの移行により、予後良好な腫瘍の発見が減少し、予後不良な患者の早期発見が期待されることから、檜山班での「前向き介入研究」を推進する上からも、多くの自治体や病院等で研究班に参加するよう各方面に働きかけるべきと考える。

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

研究報告書

次世代生産の視点から見た神経芽腫マスキリーニング

研究協力者 西 基 北海道医療大学生命基礎科学講座

研究要旨

神経芽腫マスキリーニング（NBMS）につき、次世代生産の観点から検討を試みた。現在のわが国の状況では、100万人の出生児全員がNBMSを受検した場合、全員が受検しない場合に比べ、約30人の生命が救われ、かつこれら30人から生ずる次世代が約33人救われると推定された。MSを実施したときと非実施で治療によって救命したときとで、生存率・致命率・死亡率などの表面的な数字は同じであった場合でも、後者は強力な治療によって次世代生産が阻害される危険があり、次世代生産という観点からは、両者は全く違うと考えられた。肺癌などの成人癌検診は、「一代限りの延命」であるのに対し、NBMSは次世代まで救命するため、同一の観点から評価することは避けるべきであると考えられた。

Summary

We speculated the number of the next generation saved by the mass screening for neuroblastoma. When one million newborns are screened, 30 ones and 33 lives of the next generation are saved, in comparison with the case when no screening is performed. Even if the survival rate, fatality rate, or mortality rate are all the same between the case when the screening is performed and the case no screening is performed, these two cases are totally different from the viewpoint of producing the next generation, since in the latter case patients must go through strong therapy which may hinder the production of their next generation. The mass screening for adulthood cancers is performed for the purpose of prolonging the life of the examinee only. But the mass screening for neuroblastoma can prolong not only the life expectancy of the examinee for 80 years but also save the lives of the next generation. When we evaluate the mass screening for neuroblastoma, we should not employ the measures evaluating for the screening for adulthood cancers.

A. 研究目的

全国レベルでの6ヶ月神経芽腫マスキリーニング（NBMS）が事実上中止されてから2年以上が経過した。NBMSを実施しない場合、死亡例が増加したり¹⁾、臨床症状が出た後に発見され、強力な治療の結果、生存しても次世代を残すことができないなど、何らかの影響を被る例が増加する可能性がある。今回は、NBMS中止後に発生するであろう状態のうち、次世代生産という観点から見た場合の問題点につき検討する。

B. 研究方法

本稿では、NBMSにおける次世代影響を、NBによる死亡例については子孫を残さずに死亡すること、生存例については骨髄移植により生殖能力を喪失したり抗癌剤による二次発癌などにより子孫を残せないこと、にそれぞれ限定し、QOLの低下などについては扱わない。

1年当たりの出生数を100万人、合計特殊出生率を1.30、真陽性例発生率をNBMS受検100万対200（死亡は0）、偽陰性例発生率を受検100万対50（う

ち15才の誕生日の前日までの死亡30)、自然発生率を出生100万対100(うち15才の誕生日の前日までの死亡60)とした²⁾。

C. 研究結果

1. 死亡例に関する計算

わが国における出生者100万人の全員がNBMSを受検した場合、真陽性例200人と偽陰性例50人が発生し、後者から30人の死亡例が出る。全員非受検の場合、100人が自然発生し、ここから60人の死亡例が出る。従って、MS実施の場合、出生100万対30人(60-30)の死亡を回避することになる。また、これらの例は真陽性例であって、大部分は軽度の治療で済むため、次世代生産への影響はほぼ無視できる。この30例の半分が女兒として、この集団から将来生まれる子供の数は $15 \times 1.3 = 19.5$ であるから、約20人の次世代が失われずに残ることになる。

2. 生存例に関する計算

MS実施の場合は50人の偽陰性例のうち20人が、非実施の場合は100人の自然発生例のうち40人が、それぞれ強力な治療により救命される。両者の差に当たる20人において、強力な治療が回避され、次世代生産が保証される。この20人のうち、半数に当たる10人が女兒として、 $10 \times 1.3 = 13$ 人の次世代が失われずに残ることになる。

以上、死亡例と生存例の結果をあわせると、 $20 + 13$ 、つまり33人の次世代が残ることになる。これはMSが直接救命した30人とほぼ同じ数字である。

D. 考 察

1979-1981年の日本のNB死亡率(小児人口10万対0.43)から計算すると、1997-1999年の3年間で244人が死亡することになるが、実際の死亡は146人(死亡率0.26)で、これは1年当たり32.7人の死亡を回避したことになり、今回のモデルと大きな矛盾はない³⁾。

肺癌などの成人癌の検診の評価の際には、次世代への影響は全く考慮されない。肺癌検診ではヘリカルCTなどにより微小な腫瘍も発見して摘出している⁴⁾。過剰治療をしているという批判(半分は良性

と考えられている)はあるものの、中止すべきであるとする意見は強くない。例えば肺癌検診で70才代の男性を発見して治療させたとしても、それは子供を作り終わった年齢の成人を救命することを意味している。つまり、やがては他の病気で死ぬから「一代限りの延命措置」という意味であって、次世代を救うという意味はない。寿命の延伸は本人だけに限定され、かつせいぜい数年である。

これに対し、NBMSでは乳児を救うので本人だけで80年前後の寿命の延伸が期待できる。真陽性例の多くは、過剰診断例をその中に含むとしても、比較的軽度の治療で済むことから、白血病などと異なり、次世代生産への影響は軽微なものに留まる。これに孫の生命が加わる。さらに孫も子孫を作るから、1人の子供を救命することは、成人1人の救命よりはるかに大きな効果を持つ。ところが、MS非実施の場合は、多くの例において、生命を救うために強力な治療が必要となるから、生存したとしても生殖能力に影響が出る恐れがあり、今回は扱わなかったが、自身に何らかの後遺症が出る場合や、さらに、生まれてきた次世代に影響が出る場合も懸念される。

MS実施の場合と非実施の場合とで生存率・致命率・死亡率などが同じなら、MSをしないで、MSにかかる金を治療に回すべきであるとする意見がある。確かにNBMSではなく、臨床症状出現後に強力な治療を実施して同じ例数を救ったとして、生存率・致命率・死亡率などの表面的な数字は同じである。しかし同じ例数を救命したとしても、次世代生産という観点からは、NBMS実施と非実施の場合とでは意味が全く違う。

費用対効果の分析にも、この観点は必要である。肺癌検診で発見された患者の治療のための医療費は、延命は数年であるから、延命1年当たりになると高い。また、このためにかかった医療費の、次世代への寄与はない。これに対し、NBMSでは、80年の余命延伸、それに次世代の寿命が加わるから、延命1年当たりの医療費はきわめて安くなる。さらにこの見方を極限まで推し進めると、成人の癌検診は「税金を払わず、年金をもらう」人口を増やすのに対し、NBMSは「税金を払い、年金保険料も払う」人口を増やすから、目下の国家財政にはプラスになる、という結論にさえなるであろう。

リーニング学会誌, 15 : 21 - 25, 2005.

E. 結 論

NBMS は、その対象が次世代を残す乳児であるにも拘わらず、一代限りの延命措置である成人癌検診と同じ方法で評価されてきた。NBMS の費用効果分析を試みる際、成人癌検診の手法をそのまま適用することは避けるべきであって、次世代生産の観点からの検討が是非必要である。

F. 参考文献

1. 西 基, 花井潤師, 藤田晃三, 一宮久恵, 田中稔泰, 畑江芳郎, 武田武夫. マスキリーニング中止後の神経芽腫死亡率の推定. 日本マスキリーニング学会誌, 14 : 15 - 21, 2004.
2. 西 基. 神経芽腫マスキリーニングに関する最近の話題と今後の方向. 小児科, 44 : 977 - 983, 2003.
3. 西 基, 武田武夫. マスキリーニングが神経芽腫の治療成績に与えたインパクト—ありの立場から—. 小児外科, 36 : 63 - 69, 2004.
4. 吉村明修. 肺癌検診の進歩, 日本医師会雑誌, 128 : 382 - 386, 2002.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishi M, Hanai J, Fujita K, Ichimiya H, Tanaka T, Hatae Y, Takeda T. Is the mass screening for neuroblastoma ineffective? *J Exp Clin Cancer Res*, 22 : 673-676, 2003.
- 2) 西 基. 神経芽腫マスキリーニングに関する最近の話題と今後の方向. 小児科, 44 : 977 - 983, 2003.
- 3) 西 基, 花井潤師, 藤田晃三, 一宮久恵, 田中稔泰, 畑江芳郎, 武田武夫. マスキリーニング中止後の神経芽腫死亡率の推定. 日本マスキリーニング学会誌, 14 : 15 - 21, 2004.
- 4) 西 基, 武田武夫. マスキリーニングが神経芽腫の治療成績に与えたインパクト—ありの立場から—. 小児外科, 36 : 63 - 69, 2004.
- 5) 西 基, 飯塚 進, 花井潤師, 藤田晃三, 一宮久恵, 田中稔泰. 北海道における出生コホート別にみた神経芽腫死亡率の推移. 日本マスキ

2. 学会発表

- 1) Nishi M, Satgé D, Haupt R. Mortality of neuroblastoma in Japan, France and Italy. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, Hyogo & Tokushima, Japan September 16-19, 2006.

IV. 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, Yamaoka H, Sueda T, Reynolds C. P, Yokoyama T	Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas	Pediatric Surgery International	20(1)	33-38	2004
Hiyama E, Hiyama K	Telomerase detection in the diagnosis and prognosis of cancer	Cytotechnology	45	61-74	2004
Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A, Ohnuma N, Yokoyama T	High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma	British Journal of Cancer	91(5)	972-979	2004
Kumazaki T, Hiyama K, Takahashi T, Omatsu H, Tanimoto K, Noguchi T, Hiyama E, Mitsui Y, Nishiyama M	Differential gene expressions during immortalization of normal human fibroblasts and endothelial cells transfected with human telomerase reverse transcriptase gene	International Journal of Oncology	24(6)	1435-1442	2004
Satoh K, Ohtaki M	A note on multiple regression for single index model	Communications in statistics	33(10)	2409-2422	2004
Izumi S, Ohtaki M	Incorporation of inter-individual heterogeneity into the multi-stage carcinogenesis model: Approach to the analysis of cancer incidence data	Biometrical Journal	46(1)	1-13	2004
Satoh K, Ohtani K, Ushijima M, Isomura M, Matsuura M, Miki T, Ohtaki M	Genotyping of single nucleotide polymorphisms based on a mathematical model for two-dimensional data	Japanese Journal of Biometrics	25(2)	61-67	2004
Satoh K, Yanagihara H, Ohtaki M	Clustering method by connected neighborhoods and its application	Advances & Applications in Statistics	4(2)	223-231	2004
Lu L, Suzuki T, Yoshikawa Y, Murakami O, Miki Y, Moriya T, Bassett MH, Rainey WE, Hayashi Y, Sasano H	Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders	The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	89(8)	4113-4118	2004
Morimoto K, Wakayama A, Yoshimine T, Nakayama M	High-grade spinal cord tumor with cerebellar and retroperitoneal extension	Pediatric Neurosurgery	40(3)	149-150	2004
Osone S, Hosoi H, Kuwahara Y, Matsumoto Y, Iehara T, Sugimoto T	Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells	International Journal of Cancer	112(2)	219-224	2004
Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A	Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis	International Journal of Cancer	112(3)	365-375	2004
Takahashi M, Ozaki T, Todo S, Nakagawara A	Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene ING 1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas	Oncology Reports	12(4)	811-816	2004
Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A	Polo-like kinase 1 (Plk 1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation	The Journal of Biological Chemistry	279(24)	25549-25561	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohtori S, Isogai E, Hasue F, Ozaki T, Nakamura Y, Nakagawara A, Koseki H, Yuasa S, Hanaoka E, Shinbo J, Yamamoto T, Chiba H, Yamazaki M, Moriya H, Sakiyama S	Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma	Molecular and Cellular Neuroscience	25(3)	504-514	2004
Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A	Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLR) family genes and inverse association of expression of Nbla10449/hNLR-1 and Nbla10677/hNLR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas	International Journal of Oncology	24(6)	1457-1466	2004
Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A	NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1	The Journal of Biological Chemistry	279(12)	11327-11335	2004
Nakagawara A, Ohira M	Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model	Cancer Letters	204(2)	213-224	2004
Yamakawa T, Toyabe S, Cao P, Akazawa K	Web-based delivery of medical multimedia contents using an (MPEG-4 system)	Computer Methods and Programs in Biomedicine	75(3)	259-264	2004
西 基, 花井潤師, 藤田晃三, 一宮久恵, 田中稔泰, 畑江芳郎, 武田武夫	マスキリーニング中止後の神経芽腫死亡率の推定	日本マスキリーニング学会誌	14(3)	15-21	2004
西 基, 武田武夫	マスキリーニングが神経芽腫の治療成績に与えたインパクト - ありの立場から -	小児外科	36(1)	63-70	2004
家原知子	乳児神経芽腫統一治療プロトコルのこれまでと今後	小児がん	41(1)	35-38	2004
田中丈夫, 家原知子, 細井 創, 杉本 徹, 水田祥代, 澤田 淳, 金子道夫, 土田嘉昭	神経芽腫進展リスク評価の特異性と感度 - 臨床診断神経芽腫での検討 -	小児がん	41(1)	71-75	2004
澤田 淳, 家原知子, 松本良文, 細井 創, 杉本 徹	神経芽腫マスキリーニング - 過去と現在 - 日本のマスキリーニングが示したもの -	小児内科	36(12)	1928-1932	2004
細井 創, 家原知子, 松本良文, 杉本 徹, 澤田 淳	神経芽細胞腫マスキリーニングの成果と問題点 - マス休止にあたり、文献的考察 -	日本がん検診・診断学会誌	11(2)	65-70	2004
井上雅美, 大植孝治, 澤田明久, 安井昌博, 坂田尚己, 窪田昭男, 西川正則, 森本静夫, 桑江優子, 中山雅弘, 河 敬世	難治性神経芽腫に対する造血幹細胞移植への工夫: 移植1回法から2回法 (自家-自家、自家-同種) へ	小児がん	41(2)	231-237	2004
田中丈夫, 家原知子, 細井 創, 杉本 徹, 水田祥代, 澤田 淳	生物学的指標によるマスキリーニング発見 神経芽腫の腫瘍進展リスクの評価	小児がん	41(1)	76-80	2004
杉本 徹, 家原知子, 細井 創, 澤田 淳	神経芽腫の早期発見・治療と子どものQOL: 休止となった神経芽腫マスキリーニングの成果と問題点	京母衛誌	12(25)	9-12	2004
福澤正洋	小児悪性腫瘍の治療戦略	外科	66(4)	428-435	2004
Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang JH, Simonds WF, Nakagawara A, Koseki H	Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage	Oncogene	24(21)	3385-3396	2005
Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A	Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells	Oncogene	24(5)	938-944	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiyama K, Otani K, Ohtaki M, Satoh K, Kumazaki T, Takahashi T, Mitsui Y, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Omatsu H, Noguchi T, Tanimoto K, Nishiyama M	Differentially expressed genes throughout the cellular immortalization processes are quite different between normal human fibroblasts and endothelial cells	International Journal of Oncology	27(1)	87-95	2005
Hiyama E, Hiyama K	Molecular and biological heterogeneity in neuroblastoma	Current Genomics	6(5)	319-332	2005
Okabe-Kado J, Kauskabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y	Clinical significance of serum NM23-H1 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 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, Kaneko 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	24(48)	7156-7169	2005
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, Ohira M, Nakagawara A, Kuroda H, Sugimoto T	Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative Polymerase Chain Reaction	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 β as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function	The Journal of Biological Chemistry	280(17)	16665-16675	2005
Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A	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, Nakagawara A	Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate risk neuroblastomas	Cancer Cell	7(4)	337-350	2005
Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R	Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma	American Journal of Pathology	167(1)	213-222	2005
Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A	Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death	Cancer Letters	228(1-2)	29-35	2005
Ozaki T, Nakagawara A	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, Nakayama M, 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
Soh H, Wasa M, Wang HS, Fukuzawa M	Glutamine regulates amino acid transport and glutathione levels in a human neuroblastoma cell line	Pediatric Surgery International	21(1)	29-33	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Arcana IM, Ohtaki M	Multi-target models and their application to data analysis of cellular mortality due to radiation exposure	Hiroshima Journal of Medical Science	54(1)	9-20	2005
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
Kuroda Y, Sakai A, Okikawa Y, Munemasa S, Katayama Y, Hyodo H, Imagawa J, Takimoto Y, Okita H, Ohtaki M, Kimura A	The maturation of myeloma cells correlates with sensitivity of chemotherapeutic agents	International Journal of Hematology	81(4)	335-341	2005
Hirakawa Y, Hasegawa T, Masujima T, Tokunaga M, Tsuyama N, Kawano M	Single-molecule imaging of protein in living cells by pin-fiber video-microscopy	Bioluminescence and hemiluminescence	1	215-218	2005
Yanagihara H, Ohtaki M	A family of regression models having partially additive and multiplicative covariate structure	Bulletin of Informatics and Cybernetics	37	49-64	2005
Bernardi BD, Balwierz W, Bejent J, Cohn SL, Garre ML, Iehara T, Plantaz D, Simon T, Angelini P, Cama A, London WB, Kramer K, Katzenstein HM, Tortori-Donati P, Rossi A, D'Angio GJ, Evans AE	Epidural compression in neuroblastoma: Diagnostic and therapeutic aspects	Cancer Letters	228(1-2)	283-299	2005
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	神経芽細胞腫のマスキリーニングの展望と問題点	周産期医学	35(9)	1278-1282	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
大曾根真也, 細井創, 家原知子, 土屋邦彦, 杉本 徹	神経芽腫統一プロトコールにおけるシスプラチンの腎障害 - 実験例における検討	小児がん	42(2)	207-211	2005
西 基, 飯塚 進, 花井潤師, 藤田晃三, 一宮久恵, 田中稔泰	北海道における出生コホート別にみた神経芽腫死亡率の推移	日本マスキリーニング学会誌	15(3)	21-25	2005
佐藤健一, 早川式彦, 隅田治行, 大瀧 慈	レコードリンケージにおける統計モデルによる個人同定処理の自動化について	応用統計学	34(1)	1-13	2005
大瀧 慈	統計解析で何が得られるか、その可能性と危険性	IVR会誌 Jpn J Intervent Radiol	20	376-384	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	新生時期に発見された悪性固形腫瘍例症例の検討	日本周産期・新生児医学会雑誌	41(4)	714-720	2005
Hiyama E, Yamaoka H, Kamimatsuse A, Onitake Y, Hiyama K, Nishiyama M, Sueda T	Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients	Journal of Pediatric Surgery	41(12)	2032-2036	2006
Iehara T, Hosoi H, Akazawa K, Matsumoto Y, Yamamoto K, Suita S, Tajiri T, Kusafuka T, Hiyama E, Kaneko M, Sasaki F, Sugimoto T, Sawada T	MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma detected by mass screening	British Journal of Cancer	94(10)	1510-1515	2006
Hasegawa T, Hiyama E, Wada K, Masujima T	Pre-treatment and one-shot separating analysis of whole catecholamine metabolites in plasma by using LC/MS	Analytical and Bio-analytical Chemistry	385(5)	814-820	2006
Masujima T, Tsumura N, Hasegawa T	Videovisualization of dynamic cell responses and its molecular analysis for nanomedicine	Nanomedicine	1(3)	331-343	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sangkhathat S, Nara K, Kusafuka T, Yoneda A, Fukuzawa M	Artificially accumulated β -catenin inhibits proliferation and induces neurite extension of neuroblastoma cell line NB-1 via up-regulation of trkA	Oncology Reports	16(6)	1197-1203	2006
Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Nakanishi H, 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(36)	5046-5055	2006
Kikuchi H, Ozaki T, Furuya K, Hanamoto T, Nakanishi M, Yamamoto H, Yoshida K, Todo S, Nakagawara A	NF- κ B regulates the stability and activity of p73 by inducing its proteolytic degradation through a ubiquitin-dependent proteasome pathway	Oncogene	25	7608-7617	2006
Tamura A, Ozawa K, Ohya T, Tsuyama N, Eyring EM, Masujima T	Nanokinetics of drug molecule transport into a single cell	Nanomedicine	1(3)	345-350	2006
Shimokuni T, Tanimoto K, Hiyama K, Otani K, Ohtaki M, Hihara J, Yoshida K, Noguchi T, Kawahara K, Natsugoe S, Aikou T, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Sato Y, Todo S, Hiyama E, Nishiyama M	Chemosensitivity prediction in esophageal squamous cell carcinoma: Novel marker genes and efficacy-prediction formulae using their expression data	International Journal of oncology	28(5)	1153-1162	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	25(6)	917-928	2006
Suita S, Tajiri T, Higashi M, Tanaka S, Kinoshita Y, Takahashi Y, Tatsuta K	Insights into infant neuroblastomas based on an analysis of neuroblastomas detected by mass screening at 6 months of age in Japan	European Journal of Pediatric Surgery	16	1-6	2006
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
Machida T, Fujita T, Ooo ML, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A	Increased expression of proapoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology(BCH)domain, is associated with favorable prognosis human neuroblastomas	Oncogene	25(13)	1931-1942	2006
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
Ishiguro M, Iwasaki H, Takeshita M, Hirose Y, Kaneko Y	A cytogenetic analysis in two cases of malignant peripheral nerve sheath tumor showing hypodiploid karyotype	Oncology Reports	16(2)	225-232	2006
桑原康通, 杉本 徹	EGFR阻害剤(gefitinib/イレッサ)の小児固形腫瘍における臨床応用への可能性	京府医大誌	115(10)	739-748	2006
檜山英三, 家原知子, 米田光宏, 鬼武美幸, 山岡裕明, 澤田 淳, 中山雅弘, 杉本 徹, 林 富, 福澤正洋, 升島 努, 赤澤宏平, 大瀧 慈	神経芽細胞腫—マススクリーニングで得られたエビデンスと今後	日本マススクリーニング学会誌	16(1)	39-47	2006
中山雅弘	1才半神経芽腫マススクリーニングの試み	教育講演集	8	29-32	2006
檜山英三, 山岡裕明	神経芽細胞腫—マススクリーニング休止後の対応と展望—	小児科臨床	59(4)	667-684	2006
桑原康道, 杉本 徹	小児固形腫瘍における分子病態：最近の知見	がん分子標的治療	4(3)	228-233	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
石山 洋, 久保田倫子, 中山泰行, 石黒満, 三間屋純一, 檜山英三	生後1才6ヶ月神経芽細胞腫マスキリーニングに対する検査機関の対応および厚生労働科学研究檜山班の実施要綱	第43回静岡県公衆衛生研究会抄録集	2	16-18	2006
Kaneko Y	Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan	Pediatric Blood Cancer	48	245-246	2007
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	Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	133(3)	185-192	2007
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 Letters	247(2)	253-258	2007
Sirikatitham S, Yamamoto T, Shimizu M, Hasegawa T, Tsuyama N, Masujima T	Resin-packed nanoelectrospray in combination with video and mass spectrometry for the direct and timely molecular analysis of mast cells	Rapid Communications in Mass Spectrometry	21(3)	385-390	2007
Salazar G, Masujima T	Computer simulations of a new three rodion optic (TRIPOLE) with high focusing and mass filtering capabilities	Journal of The American Society for Mass Spectrometry	18(3)	413-421	2007
大瀧 慈	発がんの数理モデル	数学セミナー	46(2)	33-39	2007
浜崎 豊, 岸本宏志, 田中祐吉, 小林庸次, 中山雅弘, 堀江 弘, 横山繁昭, 秦 順一, 家原知子, 杉本 徹	神経芽腫の組織学的、生物学的特性 - 年齢的因子との関連 -	小児がん	43(4)	712-718	2007
Hasegawa T, Hiyama E, Masujima T, et al	Analysis of total catecholamine metabolites by LCMS	Analytical and Bio-analytical Chemistry		in press	
Hiyama E, Hiyama K	Telomere and telomerase in stem cells	British Journal of Cancer		in press	
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	

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nakagawara A	Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link.	Luigi Aloe and Laura Calza	NGF and Related Molecules in Health and Disease, Progress in Brain Research Vol. 146	Elsevier Science Publisher		2004	233-242
鳥谷部真一, 赤澤宏平	医療支援のためのデータ分析・評価	日本医療情報学会	医療情報 (医療情報システム編)	篠原出版社	東京	2004	222-229
宮本正喜, 近藤博史, 河村徹郎, 鳥谷部真一, 赤澤宏平	EBM (Evidence-based medicine)	日本医療情報学会	医療情報 (医療情報システム編)	篠原出版社	東京	2004	243-246
浜崎 豊, 秦 順一, 堀江 弘, 田中祐吉	神経芽腫群腫瘍 - 国際分類 INPC による -	小児腫瘍組織分類委員会	小児腫瘍組織カラーアトラス	金原出版	東京	2004	1-83
Shay JW, Hiyama K, Hiyama E	Telomerase and Lung Cancer	HI Pass, DP Carbone, DH Johnson, JD Minna, AT Turrisi III	Lung Cancer: Principles and Practice. 3rd ed. Vol.1	Lippincott Williams & Wilkins	Philadelphia, PA, USA	2005	160-171
Nakagawara A	Molecular and developmental biology of neuroblastoma	N-K Cheung & S Cohn	Neuroblastoma	Springer-Verlag	Heidelberg	2005	41-53
杉本 徹, 家原知子, 細井 創	神経芽腫	別所文雄, 横森欣司	よく理解できる子どものがん	永井書店	東京	2006	243-257
浜崎 豊	病理診断 (小児のがんの種類、組織診断、鑑別診断)	別所文雄, 横森欣司	よく理解できる子どものがん	永井書店	東京	2006	44-52

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16年度～18年度 総合研究報告書 (2 / 2冊)

主任研究者 檜山 英三

平成19 (2007) 年3月

V. 研究成果の刊行物・別刷

Eiso Hiyama · Keiko Hiyama · Hiroaki Yamaoka
Taijiro Sueda · C. Patrik Reynolds · Takashi Yokoyama

Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas

Published online: 23 December 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract Neuroblastomas show remarkable biological heterogeneity, resulting in favorable or unfavorable outcomes. To survey the differences in gene expression profiles between favorable and unfavorable neuroblastomas, we analyzed ten favorable neuroblastoma samples from patients whose tumors consequently regressed or matured and ten unfavorable tumor samples from patients who consequently died of disease using the microarray technique. In each sample, total RNA was labeled with Cy3 or Cy5 in reverse-transcriptase reaction and hybridized with our original microarray prepared with a cDNA library of human fetal brain. Microarray analysis revealed that 43 genes, including *MYCN*, *hTERT*, *NME1* and cell cycle regulatory protein-coding genes, were highly expressed in unfavorable neuroblastomas, while another 80 genes were detected as highly expressed in favorable tumors, including neuronal differentiating genes and apoptotic inducing genes. Among favorable neuroblastoma samples, highly expressing genes in regressing tumors were different from those in maturing tumors. Expression profiling data revealed the existence of up-regulated and down-

regulated gene clusters in favorable and unfavorable tumors. This cluster analysis is a powerful procedure to distinguish unfavorable tumors from favorable tumors as well as regressing tumors from maturing tumors among favorable tumors. The information obtained from expression profiling would clarify the key genes for cell growth, regression or maturation of neuroblastoma cells, and these genes will become diagnostic and therapeutic targets in human neuroblastoma in the future.

Keywords Neuroblastoma · Microarray · Outcome · Regression · Maturation

Introduction

Neuroblastomas show remarkable biological heterogeneity, resulting in favorable or unfavorable outcomes. Unfavorable tumors often have several genetic aberrations and grow aggressively, while favorable tumors regress or mature. To predict the malignant grade and the biological behavior of the individual tumor, several prognosis-predicting markers such as amplified *MYCN* gene, loss of heterozygosity (LOH) in the short arm of chromosome 1, expression levels of *trk A* and DNA ploidy have been proposed [1, 2]. However, each of these parameters appears to be insufficient to predict the outcome of each patient completely. Thus, massive efforts have been made to elucidate the genes affecting the mechanisms of tumor growth, regression or maturation. Recently, microarray techniques have been developed and extensively applied in the cancer field [3, 4, 5]. These technologies have emerged as indispensable research tools for gene expression profiling and detection of genetic aberrations. In the present study, to survey the differences in gene expression between unfavorable neuroblastomas and maturing/regressing neuroblastomas, we applied microarray techniques.

E. Hiyama (✉) · T. Yokoyama
Department of General Medicine,
Graduate School of Biomedical Sciences,
Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku,
734-8551 Hiroshima, Japan
E-mail: eiso@hiroshima-u.ac.jp
Tel.: +81-82-2575216
Fax: +81-82-2575219

K. Hiyama
Department of Translational Cancer Research,
Research Institute for Radiation Biology and Medicine,
Hiroshima University, Hiroshima, Japan

H. Yamaoka · T. Sueda
Department of Surgery,
Graduate School of Biomedical Sciences,
Hiroshima University, Hiroshima, Japan

C. P. Reynolds
Division of Hematology-Oncology,
Childrens' Hospital, Los Angeles, CA, USA

Table 1 Neuroblastoma cases. *m* month, *Ad* adrenal gland, *Ret* retroperitoneum, *UF* unfavorable type, *F* favorable type, *amp* amplification, *res* resection, *DOD* death of disease, *NED* no evidence of disease

Case	Age at diagnosis	Primary site	Stage ^a (INSS)	Histology ^b	<i>MYCN</i> amp (copy)	Surgical treatments before any other therapies	Outcome (period)
Unfavorable neuroblastoma							
N1	24 m	Ad	4	UF	40	Total res (primary)	DOD (13 m)
N3	72 m	Thorax	4	UF	1	Partial res (primary)	DOD (15 m)
N4	11 m	Ad	3	UF	80	Total res	DOD (9 m)
N7	72 m	Ad	4	UF	1	Total res (primary)	DOD (11 m)
N21	20 m	Ad	4	UF	25	Total res (primary)	DOD (14 m)
N29	9 m	Ad	4	UF	50	Partial res (primary)	DOD (11 m)
N51	31 m	Ad	4	UF	1	Biopsy	DOD (19 m)
N55	15 m	Ad	4	UF	200	Total res (primary)	DOD (2 m)
N66	15 m	Ad	4	UF	80	Biopsy	DOD (6 m)
N67	62 m	Ret	4	UF	1	Biopsy	DOD (27 m)
Favorable (maturing neuroblastoma) ^c							
N36	7 m	Ad	3	F	1	Partial res	NED (5 years)
N45	9 m	Thorax	3	F	1	Partial res	NED (12 years)
N57	10 m	Ret	3	F	1	Partial res	NED (11 years)
N141	13 m	Ret	2A	F	1	Partial res	NED (11 years)
N166	8 m	Thorax	2A	F	1	Partial res	NED (8 years)
N169	9 m	Thorax	3	F	1	Partial res	NED (10 years)
Favorable (regressing neuroblastoma) ^d							
N9	3 m	Ad	4S	F	1	Total res (primary)	NED (14 years)
N11	10 m	Ad	4S	F	1	Total res (primary)	NED (13 years)
N160	2 m	Ad	4S	F	1	Biopsy (liver meta)	NED (10 years)
N172	9 m	Ad	4S	F	1	Biopsy (liver meta)	NED (8 years)

^aThe disease staging was classified using INSS classification.

^bHistology was classified according to Shimada's classification.

^cIn all six cases described as maturing neuroblastoma, maturation was confirmed by the pathological findings of biopsy samples, which were resected later.

^dIn all four cases described as regressing neuroblastoma, liver metastases spontaneously regressed until 5 years after diagnosis

Materials and methods

Tumor samples

During the past 2 decades, a total of 212 neuroblastoma cases whose tumors were obtained before any treatment were diagnosed at the Hiroshima University Medical Hospital or consulted for molecular analysis from other hospitals in Japan. Among these cases, ten were selected as unfavorable cases, with the patients dying of tumor progression (Table 1). In these tumors, six had *MYCN* gene amplification. In addition, we selected ten favorable tumors consisting of four regressing 4S tumor samples in which the remaining tumors consequently diminished and six maturing tumor samples obtained at biopsy or partial resection in which the remaining tumors consequently matured (Table 1). In the present study, we compared the data among these three groups: unfavorable tumors, regressing 4S tumors and maturing tumors.

Microarray analysis

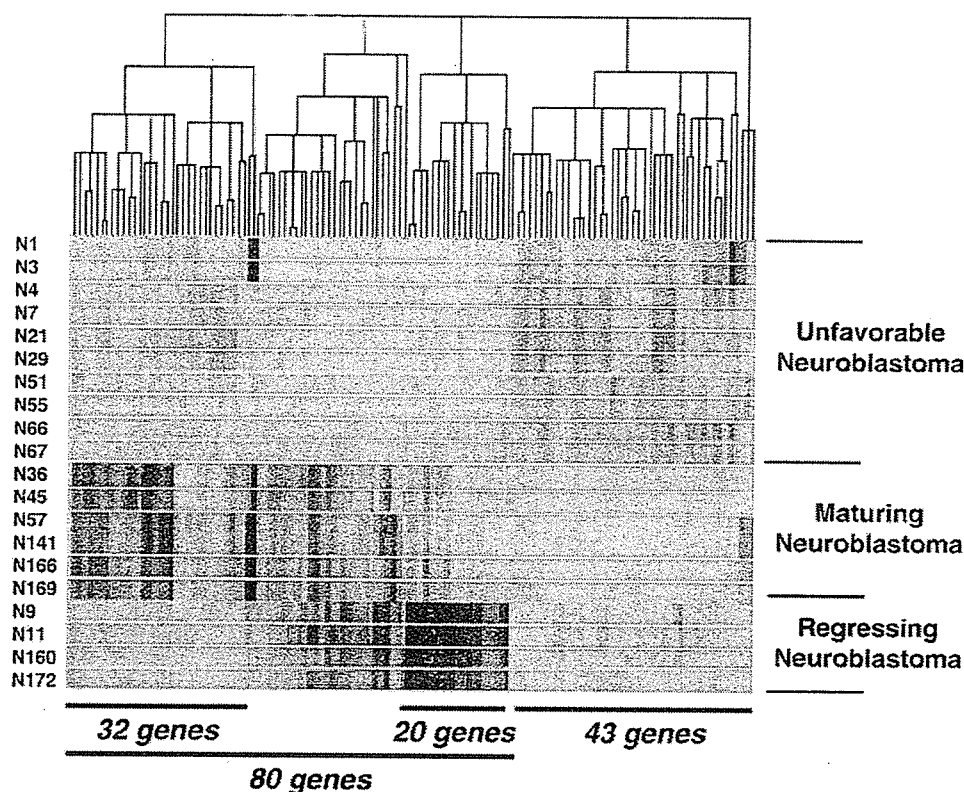
We prepared target cDNA clones from a human fetal brain cDNA library. A set of 6,272 sequence-verified human fetal brain cDNA clones was PCR-amplified using M13 forward and reverse primers and spotted onto 24 poly L-lysine-coated glass slides using a custom robot arrayer (Genex 2000, Kaken Genetics, Chiba, Japan) according to the manufacturer's recommendations. Total cellular RNA was extracted from tumor samples by the acid-guanidinium-phenol chloroform method. Ten micrograms of total RNA of each tumor sample was labeled with Cy3 or Cy5 and hybridized with the slide. Labeling was performed using random primer and oligo d(T)₁₈ primer by Cy 3- or Cy 5-labeled dUTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, N.J.). Hybridization was

performed at 65°C for 10 h and then washed using Hybridization Station (Genomic Solutions, Ann Arbor, Mich.). After hybridization, slides were washed, dried and scanned using laser confocal scanner (Scan Array 5000, GSI Luminics, Ottawa, Ontario). This microarray analysis of the same sample was repeated using different fluorescence for validation of expression changes resulting from fluorescence and hybridization conditions. Hybridization intensity of each spot was normalized by the mean intensity of all non-control spots for each channel. In addition, the intensity of 16 ubiquitously expressed genes as control cDNA elements deposited at multiple locations on the microarray was examined. Quant array software was used for gridding and calculation of signal intensities. The signals were analyzed from scatter plots and clustering using Software Quantarray (GSI Luminics) and GeneSpring (Silicon Genetics, Redwood City, Calif.).

TaqMan analysis

To confirm the difference of expression levels of the genes identified, we used fluorescent-based quantitative real-time RT-PCR using TaqMan probe. Each RT-PCR was performed in a 50- μ l reaction mixture containing 25 μ l of 2X TaqMan Universal RT-PCR master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), 100–400 nM each primer and 200–400 nM TaqMan fluorogenic probe. Amplification reaction was carried out in a 96-well reaction plate (Applied Biosystems) in a spectrofluorimetric thermal cycler (ABI PRISM 7700 Sequence Detector, Applied Biosystems); after reverse transcription (30 min at 48°C) and denaturation (2 min at 95°C) amplification was performed with 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. Each sample was run in duplicate. A threshold cycle (Ct) for each sample was calculated by the point in which the fluorescence exceeded a threshold limit (tenfold the SD of the baseline) and the mean of the duplicate samples was used for calculation of the expression level. To normalize the samples for loading total RNA equivalent, the

Fig. 1 A cluster analysis based on the expression of 123 genes that differ between favorable and unfavorable tumors. Unfavorable neuroblastomas showed overexpression of 43 genes and favorable tumors showed overexpression of another 80 genes. Among these 80 genes detected in favorable tumors, 32 and 20 genes were expressed in maturing tumors and regressing 4S tumors, respectively. The *dendrogram* indicates the degree of similarity of the expression profiles in these genes



second real-time PCR assay was performed targeting 18S ribosomal RNA gene. PCR conditions were the same as those mentioned above. A reference curve was made for each gene using a serial dilution of RNAs extracted from neuroblastoma cell line (SMS-SAN). Appropriate negative controls (distilled water and no probe/primers) were included in each set of experiments.

Statistical analysis

Comparison between the signal intensity of the microarray spot and the data of TaqMan analysis was calculated according to Spearman's rank correlation. A probability of less than 0.05 was accepted as a significant value.

Results

Array data

The total cellular RNA samples were labeled with Cy3 or Cy5, respectively, and two samples labeled by different fluorescence were hybridized onto the same slide. To make cut-offs in the analysis for the cDNA microarray, we calculated the mean intensity of each spot in the following two groups: unfavorable (UF, $n = 10$) and favorable neuroblastoma (F, $n = 10$). The following filter values were used: the value of the ratio (UF/F or F/UF) had to be greater than 2.0 and the signal intensity in at least one dye had to be greater than 10,000. In addition, we also calculated the mean intensity of each spot in regressing neuroblastoma (R, $n = 4$) and maturing

neuroblastoma (M, $n = 6$) and compared with that in unfavorable tumors. If the value of the ratio (R/UF or M/UF) was greater than 2.0, this gene was analyzed further. Using these filters, cut-offs selected the number of clones from 6,727 to 517. The up-regulated clones in unfavorable or favorable tumors were 212 and 305, respectively. Among these 517 clones, we excluded unknown sequences and redundant sequences and obtained 123 previously known genes. Among these genes, 43 genes were overexpressed in the unfavorable tumors, and 80 genes were in the favorable tumors.

To analyze the correlation among the samples and genes, we applied a two-dimensional hierarchical clustering algorithm [6] using the data obtained from the 20 tumors (Fig. 1). Although no single gene could divide these tumors into three groups, we could divide these tumors into three groups using this clustering analysis. In unfavorable tumors, we identified 43 genes in this cluster including *CCND1*, *hTERT*, *NME1*, *MYCN* and other cell cycle regulatory genes (Table 2). In addition, we identified 20 genes including apoptosis-related genes such as *CASP 8* and *CASP 9* in regressing tumors and 32 genes including *MMP9* and neuronal growth-related genes such as *NTRK1* and *BIRC1* in maturing tumors.

To confirm the difference of expression levels of the genes identified by microarray we examined TaqMan quantitative real-time RT-PCR. The quantitative RT-PCR with TaqMan probe for *hTERT* (human telomerase reverse transcriptase) mRNA expression showed

Table 2 Genes overexpressed in each group of tumors

Unfavorable neuroblastoma	Favorable neuroblastoma
Bone morphogenetic protein 6	(Maturing neuroblastoma)
Bone morphogenetic protein 7	Aldolase A, fructose-bisphosphate
P-cadherin	Ankyrin 1 (<i>ANK1</i>)
Caveolin 2	BCL2-antagonist/killer 1
CD22 antigen	CD44 antigen
CD8 antigen polypeptide (p32)	CD27-binding (Siva) protein
Collagen, type IV	CD8 antigen, beta polypeptide 1 (p37)
Cyclin D1 (<i>CCND1</i>)	Cell division cycle 25A
Cyclin E1 (<i>CCNE1</i>)	Chorionic gonadotropin, beta polypeptide
Cyclin-dependent kinase 4	Cytochrome P450, subfamily IIIA
Deoxythymidylate kinase	Early growth response 1
Developmentally regulated GTP-general transcription factor IIB	Fas-activated serine/threonine kinase
High-mobility group protein 1	FGF receptor 1
Apoptosis inhibitor 4 (<i>BIRC5</i>)	General transcription factor IIIH
Human telomerase reverse transcriptase (hTERT)	Hexokinase 1
Integrin- β	IGF 2 (somatomedin A)
Interferon- γ	Insulin-like growth factor binding protein 2
Interleukin 1 α	Interferon receptor 1
Interleukin 8	Interleukin 1 receptor antagonist
Keratin 18	Keratin 7
Matrix metalloproteinase 15	Matrix metalloproteinase 9 (<i>MMP9</i>)
Metastasis associated 1	Mitogen-activated protein kinase 7
Mitogen-activated protein kinase 10	NGF receptor (<i>NTRK1</i>)
NM23A (<i>NME1</i>)	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
NM23B (<i>NME2</i>)	NGFI-A binding protein 2
Neuronal apoptosis inhibitory protein (<i>BIRC1</i>)	p53-induced protein
Prefoldin 5	Profilin 1
Protease, inhibitor, serine, clade A	Protein tyrosine kinase 2 beta
Putative chemokine receptor GTP-binding protein	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) α
Ras homolog enriched in brain 2	Rho GTPase activating protein 1
Rho GTPase activating protein 4	Thrombospondin 4
Rho-GEF 1	TNF receptor-associated factor 5
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor	Tubulin, alpha, brain-specific
Signal transducer and activator of transcription 1, 91 kD	Vascular endothelial growth factor
Small inducible cytokine B subfamily member 13	
Superoxide dismutase 1, soluble	(Regressing neuroblastoma)
Transforming growth factor- α	Ancient ubiquitous protein 1
TNF superfamily, member 2	BCL2-antagonist/killer 1
TNF receptor superfamily, member 6	Bone morphogenetic protein receptor; type II (serine/threonine kinase)
Tyrosine kinase with immunoglobulin	Caspase 8 (<i>CASP8</i>)
Epidermal growth factor homology domains	Caspase 9 (<i>CASP9</i>)
Vascular endothelial growth factor C	Collagen, type VII, alpha 1
N-myc (<i>MYCN</i>)	Contactin 2 (axonal)
Ras-related GTP binding protein	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)
	Galactosidase, beta 1
	Growth differentiation factor 10 (<i>GDF10</i>)
	High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 1
	Human DNA sequence from clone RP11-560A15 on chr 20
	Mitogen-activated protein kinase
	NGF- α (<i>NGFA</i>)
	Protease, serine, 22
	Rho GTPase activating protein 4
	TNF-related apoptosis inducing ligand (<i>TNFSF10</i>)
	Transferrin receptor
	Transforming growth factor; beta 1
	Tubulin, alpha, brain-specific

that the levels of *hTERT* mRNA expression were correlated with the signal intensity obtained in the microarray (Fig. 2). We also used TaqMan analysis in 15 genes among the genes that showed different expression levels in the microarray analysis and obtained a good correlation of the expression levels between microarray analysis and TaqMan assay (data not shown).

Discussion

In the present study, we successfully identified 43 genes that were overexpressed in unfavorable tumors and 80 genes specifically overexpressed in favorable tumors (Fig. 1). The feasibility of this approach was shown in