

tige Histologie auf. Von den 76 Neuroblastomen zeigten 13 (17%) einen oder mehrere ungünstige biologische Faktoren (UF). Von den 5 therapieresistenten NB hatte 1 Patient 3 UFs, ein weiterer 2 UFs, 1 Patient 1 UF und 2 Kinder keine UFs. Gesamt gesehen hatten 60% der therapieresistenten NB einen oder mehrere ungünstige Faktoren.

Schlussfolgerungen: Von den beim Massenscreening entdeckten Neuroblastomen wiesen 17% einen oder mehrere ungünstige Faktoren auf und damit ein höheres Rezidivrisiko als Patienten ohne ungünstige biologische Faktoren. Allerdings ist die ungünstige biologische Konstellation therapieresistenter Fälle immer noch unklar, auch wenn die Tatsache auf sehr sensitiven Analysen beruht. Zumindest ein Fünftel der beim Massenscreening entdeckten Fälle waren bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Beim kindlichen Neuroblastom ist es deshalb von größter Bedeutung, die biologischen, prognostisch bedeutsamen Faktoren durch hochsensitive Methoden zu bestimmen, um eine möglichst frühe chirurgische Intervention zu ermöglichen. Seitdem das Screeningprogramm für Neuroblastome in Japan ausgesetzt wurde, ist es notwendig, bei jedem klinisch diagnostizierten NB die Mortalität im Hinblick auf die charakteristischen biologischen Eigenschaften zu überprüfen.

References

- 1 Bessho F, Hashizume K, Nakajo T et al. Mass screening in Japan increased the detection of infants with neuroblastoma without a decrease in cases in older children. *J Pediatr* 1991; 119: 237–241
- 2 Hachitanda Y, Ishimoto K, Hata J, Shimada H. One hundred neuroblastoma detected through a mass screening system in Japan. *Cancer* 1994; 74: 3223–3226
- 3 Matsumura T, Shikata T, Sawada T. Treatment modality for neuroblastoma infants in Japan: Retrospective analysis and future directions. Proceeding of the 31st American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1995; 14: 456
- 4 Oue T, Inoue M, Yoneda A 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* 2005; 40: 359–363
- 5 Sawada T, Kidowaki T, Sakamoto I et al. Neuroblastoma: Mass screening for early detection and its prognosis. *Cancer* 1984; 53: 2731–2735
- 6 Shimada H, Chatten J, Newton Jr WA, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73: 405–416
- 7 Suita S, Zaizen Y, Sera Y et al. Mass screening for neuroblastoma: quo vadis? A 9-year experience from the Pediatric Oncology Study Group of the Kyushu area in Japan. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 555–558
- 8 Suita S, Tajiri T, Akazawa K, Sera Y, Takamatsu H, Mizote H et al. Mass screening for neuroblastoma at 6 months of age: difficult to justify. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1674–1678
- 9 Suita S. Mass screening for neuroblastoma in Japan: lessons learned and future directions. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 949–954
- 10 Suita S, Zaizen Y, Yano H, Akiyama H, Sera Y, Takamatsu H et al. How to deal with advanced cases of neuroblastoma detected by mass screening: a report from the Pediatric Oncology Study Group of the Kyushu area of Japan. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 599–603
- 11 Suita S, Sawada T, Kaneko M, Tajiri T, Naito M, Hayashi Y et al. The report of the committee for neuroblastoma at the Japanese association of Pediatric Oncology at 1998. *Jpn J Pediatr Oncol* 1999; 36: 107–117
- 12 Tanaka S, Tajiri T, Suita S et al. Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 63–68
- 13 Tanaka T, Sugimoto T, Sawada T. Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/Trk A gene expression: a comparison of the profiles of neuroblastomas detected clinically and those detected through mass screening. *Cancer* 1998; 83: 1626–1633
- 14 Tajiri T, Shono K, Tanaka S et al. Evaluation of genetic heterogeneity in neuroblastoma. *Surgery* 2002; 131: 283–287
- 15 Tajiri T, Tanaka S, Shono K et al. Quick quantitative analysis of gene dosages associated with prognosis in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001; 166: 89–94
- 16 Tajiri T, Suita S, Takamatsu H et al. Clinical and biologic characteristics for recurring neuroblastoma at mass screening cases in Japan. *Cancer* 2001; 15: 349–353
- 17 Yamamoto K, Ohata 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
- 18 Yamamoto K, Hanada R, Tanimura M, Aihara T, Hayashi Y. Natural history of neuroblastoma found by mass screening. *Lancet* 1997; 349: 1102



Classification of neuroblastomas based on an analysis of the expression of genes related to prognosis

Tatsuro Tajiri*, Mayumi Higashi, Ryota Souzaki, Kyousuke Tatsuta, Yoshiaki Kinoshita, Tomoaki Taguchi

Department of Pediatric Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

Received 6 August 2007; accepted 8 August 2007

Index words:

Neuroblastoma;
Neuronatin;
TrkA;
BINI;
Quantitative PCR

Abstract

Purpose: To select the optimal treatment according to the grade of malignancy of neuroblastoma (NB), it is essential to accurately and rapidly identify genetic abnormalities associated with the prognosis. We have identified *BINI* and *neuronatin* β as the novel prognosis-related genes for NBs. This study aims to assess the correlation between the combination of the expression level of prognosis-related genes and the outcome of NB.

Methods: In 44 NB samples, the expression levels of *TrkA*, *BINI*, and *neuronatin* β were determined using quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction; furthermore, the correlation between the expression of these genes' expression levels and the clinical progression of NB were assessed.

Results: It was possible to classify 44 NBs into 4 groups regarding the grade of malignancy of NB. These 4 groups were all significantly associated with the clinical stages international NB staging system as well as the outcomes of the patients ($P < .001$, according to the trend test by Kruskal-Wallis exact test).

Conclusion: The combination of the expression levels of these genes using quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction is indicated as the effective method to quickly and accurately evaluate the grade of malignancy of NBs.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Neuroblastoma (NB) is the most common solid tumor in children, and its development is still uncharacterized [1]. The prognosis for those with NB tends to vary greatly, and many studies have demonstrated that both clinical and biologic factors are correlated with the outcome [2]. Some of these prognostic factors are known, such as *MYCN* amplification, DNA ploidy, or *TrkA* expression [1-3]. These factors are

used clinically to predict the patient's prognosis and to select the optimal therapy. It is important to select the optimal therapy according to the property of these tumors. However, the potential for malignancy in NB cannot be accurately predicted by these factors [1-3].

BINI (2q14) encodes multiple tissue-specific isoforms of a myc-interacting adaptor protein that has some characteristics of a tumor suppressor, including the ability to inhibit myc-mediated cell transformation and promote apoptosis [4]. Previous studies hypothesized that *BINI* may function as a suppressor gene in NB because *BINI* is highly expressed in neural tissues and binds myc within a region

Presented at the 40th annual meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, Queenstown, New Zealand, April 15-19, 2007.

* Corresponding author. Tel.: +81 92 642 5573; fax: +81 92 642 5580.

E-mail address: taji@pedisurg.med.kyushu-u.ac.jp (T. Tajiri).

0022-3468/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jpedsurg.2007.08.024

with 100% homology to *MYCN* [4]. Furthermore, other reported data correlate with the reduced expression of *MYCN*-interacting *BIN1* isoforms with unfavorable features in primary NB [5].

The *neuronatin* gene was first identified in 1994, and the expression of that gene was specifically localized in the fetal mouse brain [6,7]. The *neuronatin* gene has 2 expression forms, *neuronatin* α and *neuronatin* β (*Nnat* β). In the mouse, its expression appears on the 8.5th fetal day at the hindbrain and then spreads to the central and peripheral nervous system and thereafter gradually disappears after birth. It is also expressed in the sympathetic nervous system and adrenal gland on the 15th fetal day [8]. Although the specific function of this factor is still not known, it is thought to be a membrane protein based upon its structure [9]. In our previous study, the expression of *neuronatin* was analyzed in a number of NB samples, and the results confirmed the effectiveness of this gene as a prognostic factor by assessing its correlation to the known prognostic factors and outcome [10]. Specifically, the expression levels of *Nnat* β were significantly lower in all groups with unfavorable prognostic factors than in the groups with favorable prognostic factors [10].

In this study, the expression levels of *TrkA*, *BIN1*, and *Nnat* β will be determined using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 44 NB primary samples. Furthermore, the correlation between the combination of these genes' expression levels and the clinical findings of NB will be assessed.

1. Materials and methods

1.1. Clinical data of patients and biologic data of NB samples

Patients with NB evaluated at the Department of Pediatric Surgery, Kyushu University, Fukuoka, Japan, were diagnosed and staged according to the international NB staging system [11]. This study is approved by our institution's institutional review board. Forty-four frozen tumor samples were obtained from untreated patients with NB. The patient population included 26 males and 18 females, and the age at diagnosis ranged from 19 days after birth to 11 years. Of the 44 cases, 19 patients were diagnosed at older than 1 year, whereas the remaining 25 were diagnosed at younger than 1 year. Twenty-three patients were identified using an NB mass screening system. Of the 44 samples, 29 were tumors from patients who were in stage 1, 2 or 4S, whereas 3 were in stage 3, and 12 were in stage 4. Thirty-one patients are still alive, of whom 3 cases are still under treatment, whereas 13 patients have died as a result of the disease. The follow-up period after treatment ranged from 2 to 12 years. In all 44 samples, the status of *MYCN* amplification was previously determined by the Southern blot method. Regarding

the histologic findings, all 44 cases were classified based on the classification by Shimada et al [12]. Thirty-nine cases showed a favorable histology, whereas the remaining 15 cases showed an unfavorable histology.

1.2. RNA extraction and complementary DNA synthesis

Total RNA was extracted from the frozen samples using Isogen (Nippon Gene, Osaka, Japan), and reverse transcription was performed with a first-strand complementary DNA synthesis kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) using random hexanucleotide primers.

1.3. Quantitative RT-PCR

The primers and TaqMan probes for the *TrkA*, *BIN1*, and *Nnat* β were designed using the application-based primer design software Primer Express (Applied Biosystems [ABI], Foster City, Calif). The sequences of the polymerase chain reaction (PCR) primers and TaqMan probes were as follows: *TrkA*—forward primer, 5'-CAT CGT GAA GAG TGG TCT CCG-3'; reverse primer, 5'-GAG AGA GAC TCC AGA GCG TTG-3'; TaqMan probe, 5'-AGG AGT GAA ATG GAA GGC ATC TGG CG-3'; *BIN1*—forward primer, 5'-AAG GCC CAG CCC AGT GAC-3'; reverse primer, 5'-GAG CCA TCT GGA GGC GAA G-3'; TaqMan probe, 5'-CGC GCC TGC AAA AGG GAA CAA GA-3'; *Nnat* β —forward primer, 5'-TCG GCT GAA CTG CTC ATC ATC-3'; reverse primer, 5'-TTC TGC AGG GAG TAC CTG AAC A-3'; TaqMan probe, 5'-ACA TCT TCC GCG TGC TGC TGC AG-3'. *18s* rRNA was used as an internal control gene to analyze the gene expression. Polymerase chain reaction primer and TaqMan probe for *18s* rRNA were purchased from ABI as a kit of TaqMan *18s* rRNA Control Regent. Quantitative PCR was performed in a final volume 25 μ L, and each sample was analyzed in duplicate. Each reaction mixture contained 0.1 pmol/ μ L TaqMan probe, 0.2 pmol/ μ L each primer, 1 \times TaqMan PCR master mix, and 10 to 50 ng DNA. Thermal cycling was initiated with a 2-minute incubation at 50°C followed by the first denaturation step of 10 minutes at 95°C and then 40 cycles of 2-step PCR consisting of 95°C for 5 seconds and 60°C for 1 minute. The quantification of the *MYCN* gene was achieved by means of the ABI Prism 7700 Sequence Detection System (ABI). Genomic DNA from 1 NB with 90 copies of *MYCN*, determined by Southern blotting, was serially diluted to establish the calibration curve.

1.4. Statistical analysis

The expression levels of *TrkA* (*TrkA*/rRNA), *BIN1* (*BIN1*/rRNA), and *Nnat* β (*Nnat* β /rRNA) in the subgroups were represented by percentile (50%). A comparison of the expression in relation to clinical and genetic parameters was made using Mann-Whitney *U* test. Kruskal-Wallis exact

Table 1 Expression of *TrkA*, *BIN1*, and *Nnat β* in relation to clinical and biologic prognostic factors

Category	n	<i>TrkA</i> /rRNA 50th percentile	<i>P</i>	<i>BIN1</i> /rRNA 50th percentile	<i>P</i>	<i>Nnat β</i> /rRNA 50th percentile	<i>P</i>
Age							
<1 y	25	0.12	.28	0.97	.79	2.7	<.001
≥1 y	19	0.02		0.62		0.21	
Stage							
Stage 1, 2, 4S	29	0.08	.34	1.12	.18	1.72	<.01
Stage 3, 4	15	0.02		0.48		0.14	
Shimada							
Favorable	29	0.08	.19	1.13	<.05	2.01	<.001
Unfavorable	15	0.01		0.41		0.14	
<i>MYCN</i> amplification							
(-)	36	0.12	<.01	1.125	<.01	1.24	<.05
(+)	8	0		0.22		0.02	
Survival							
Alive	31	0.08	.58	1.17	<.01	1.72	<.01
Dead	13	0.02		0.34		0.16	

P was determined by Mann-Whitney *U* test.

test was used to test the association between the clinical stage or the patients' outcome and the combination of 3 prognostic factors. These methods of statistical analysis were recommended by the medical statistician.

2. Results

2.1. The expression level of *TrkA*, *BIN1*, and *Nnat β* by the quantitative RT-PCR method

The relationship between the *TrkA*, *BIN1*, and *Nnat β* gene expression levels and prognostic factors are shown in Table 1.

The level of *TrkA* expression slightly decreased in the samples with unfavorable prognostic factors; however, this finding was not statistically significant in relation to any variables except the level of *MYCN* amplification.

The expression level of *BIN1* was significantly associated with 3 of the 5 prognostic factors. Those 3 factors, which did not include the factors of age and stage, indicate that the level of *BIN1* expression in association with unfavorable factors was significantly lower than that in NB with favorable factors.

The expression level of *Nnat β* was significantly lower in all groups expressing each unfavorable factor (older than 1 year, clinical stage 3 or 4, Shimada unfavorable histology, and *MYCN* amplification) and a poor outcome.

Twenty-one of 44 cases were analyzed where the NB was clinically detected but not detected through mass screening. The relationship between the expression levels of *TrkA*, *BIN1*, and *Nnat β* and the known prognostic factors demonstrated the same trends as those observed in the results for all 44 samples.

2.2. Evaluation of the outcome of NBs using the combination of 3 unfavorable prognostic factors

In the each of genetic factors, the patients who expressed these factors below the median level were observed to be those possessing at least 1 of the unfavorable prognostic factors. An evaluation of the incidence of the 3 unfavorable factors demonstrated that the rates of advanced stages (stage 3, 4) were 71% for 7 cases with 3 factors, 41% for 17 cases with 2 factors, 25% for 8 cases with 1 factor, and 8% for 12 cases with null factor ($P < .001$, trend test using Kruskal-Wallis exact test). Fig. 1 shows the survival curves of the 4 groups according to the number of unfavorable prognostic factors. As the number of unfavorable factors increases, the survival ratio decreases. The 5-year survival rates were 16.6% for 7 cases with 3 factors, 73.2% for 17 cases with

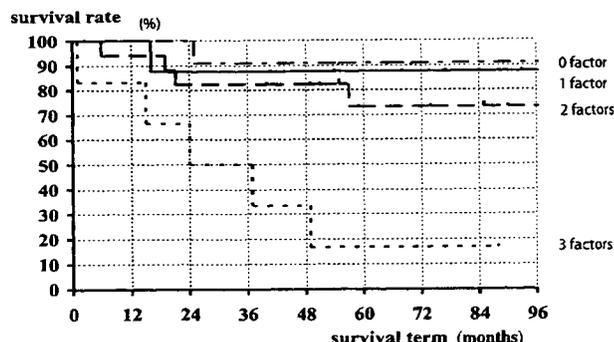


Fig. 1 The correlation of 3 unfavorable factors (low expression of *TrkA*, *BIN1*, and *Nnat β*) and survival curves. The 5-year survival rates were 16.6% for 7 cases with 3 factors, 73.2% for 17 cases with 2 factors, 87.5% for 8 cases with 1 factor, and 90.9% for 12 cases with null factor ($P < .001$, trend test using Kruskal-Wallis exact test).

2 factors, 87.5% for 8 cases with 1 factor, and 90.9% for 12 cases with null factor ($P < .001$, trend test using Kruskal-Wallis exact test).

3. Discussion

Neuroblastomas express a variety of genetic variables that might predict their clinical behavior [2]. To select the optimal treatment according to the grade of malignancy of NB, it is essential to accurately and rapidly identify any genetic heterogeneity associated with the prognosis. Regarding the aberrations in the gene dosages associated with the prognosis, *MYCN* amplification, 1p deletion, 17q gain, and 11q loss have been identified [1-3]. Generally, the gene dosage was analyzed by Southern blots or fluorescence in situ hybridization. We previously reported that the quantitative PCR method may be the most effective method for quickly and accurately evaluating any aberrations in the gene dosages associated with the patients' outcomes [13,14]. Furthermore, the combination of gene dosages of *MYCN* and *survivin* (17q gain) using quantitative PCR method was substantially correlated with the clinical stage and the patients' outcome [15].

Whereas the expression level of the genes was previously assessed by either a Northern blot analysis or a semiquantitative PCR protocol, in this study, the expression levels of *TrkA*, *BINI*, and *Nnat* β were determined using a highly sensitive analysis (the quantitative PCR method) in 44 NB primary samples. Furthermore, the correlation between the combination of these genes' expression levels and the clinical observations of NB were assessed. As a result, the expression levels of *TrkA*, *BINI*, and *Nnat* β determined using quantitative PCR were directly correlated with the clinical stage and the patients' outcome. The determination of the expression levels of these genes using quantitative RT-PCR is therefore indicated as the most effective method for quickly and accurately evaluating the grade of malignancy of NBs.

The protocol for NB therapy has been primarily determined based on the age, clinical stage, and gene dosage of prognostic related genes, such as *MYCN* [16]. In the international NB risk group (INRG) committee of 2006 regarding advanced NB research, the standard criteria for *MYCN* amplification is defined as 4-fold more than the normal *MYCN* signal determined by 2-color fluorescence in situ hybridization method and quantitative PCR. In the present study, the outcome of the group of the cases with 3 unfavorable factors was extremely poor compared with the other 3 groups. The combination of the gene dosages and the expression levels of several prognosis-related genes using quantitative PCR may thus make it possible to classify

neuroblastomas into more accurate groups based on the grade of malignancy. We recommend that the future protocol for NB diagnosis should thus be established based on a combination of the expression levels of prognosis-related genes using a high-sensitive analysis system as the quantitative PCR, in addition to the age, clinical stage, and gene dosage of prognostic-related genes, such as *MYCN*.

References

- [1] Crist WM, Kun LE. Common solid tumors of childhood. *N Engl J Med* 1991;324:461-71.
- [2] Brodeur GM. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995;31:505-10.
- [3] Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, et al. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19:93-101.
- [4] Hogarty MD, Liu X, Thompson PM, et al. *BIN1* inhibits colony formation and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with *MYCN* amplification. *Med Pediatr Oncol* 2000;35:559-62.
- [5] Tajiri T, Tanaka S, Suita S, et al. Expression of a *MYCN*-interacting isoform of the tumor suppressor *BIN1* is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res* 2003;9:3345-55.
- [6] Takita J, Ishii M, Tsutsumi S, et al. Gene expression profiling and identification of novel prognostic marker genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:120-32.
- [7] Joseph R, Dou D, Tsang W. Molecular cloning of a novel mRNA (neuronatin) that is highly expressed in neonatal mammalian brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:1227-34.
- [8] Wijaholds J, Chowdhury K, Wehr R, et al. Segment-specific expression of the neuronatin gene during early hindbrain development. *Dev Biol* 1995;171:73-84.
- [9] Dou D, Joseph R. Cloning of human neuronatin gene and its localization to chromosome-20q 11.2-12: the deduced protein is a novel "proteolipid". *Brain Res* 1996;723:8-22.
- [10] Higashi M, Tajiri T, Yoshiaki K, et al. Analysis of the neuronatin gene as a novel prognostic factor of neuroblastoma detected by microarray system. *Jpn J Pediatr Oncol* 2005;42:835-41.
- [11] Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. Revision of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466-77.
- [12] Shimada H, Chatten J, Newton WA. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:405-16.
- [13] Tajiri T, Tanaka S, Shono K, et al. Quick quantitative analysis of gene dosages associated with prognosis in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001;166:89-94.
- [14] Tanaka S, Tajiri T, Suita S, et al. Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of *MYCN* in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2004;39:63-8.
- [15] Tajiri T, Tanaka S, Higashi M, et al. Biological diagnosis for neuroblastoma using the combination of highly sensitive analysis of prognostic factors. *J Pediatr Surg* 2006;41:560-6.
- [16] Kaneko M, Nishihira H, Mugishima H, et al. Stratification of treatment of stage 4 neuroblastoma patients based on N-myc amplification status. *Med Pediatr Oncol* 1999;31:1-7.

High Expressions of *Neuronatin* Isoforms in Favorable Neuroblastoma

Mayumi Higashi, MD,* Tatsuro Tajiri, PhD,* Yoshiaki Kinoshita, PhD,* Kyosuke Tatsuta, MD,*
Ryota Souzaki, MD,* Yoshihiko Maehara, PhD,† Sachiyo Suita, PhD,*
and Tomoaki Taguchi, PhD*

Summary: Neuroblastoma is a malignant solid tumor of children, which derives from the embryonal sympathoadrenal lineage. Clinical cases can vary widely from a favorable to an unfavorable prognosis according to the presence of genetic aberrations, such as *MYCN* amplification. Our cDNA microarray analysis which compared the gene expressions between favorable and unfavorable neuroblastomas showed a high expression of the *neuronatin* (*Nnat*) gene in favorable neuroblastomas. *Nnat* is highly conserved in mammalian species, and its expression appears in nervous systems from the hindbrain to the peripherals during the prenatal periods. The *Nnat* mRNA expression, investigated in 63 of neuroblastoma samples by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction, was found to be significantly higher in the favorable prognosis groups than in the unfavorable groups. *Nnat* is an imprinted gene, and its expression in IMR32 neuroblastoma cell line was up-regulated by treatment with a demethylating agent. High expressions of *Nnat* isoforms induced in an IMR32 neuroblastoma cell line changed the cell morphology to the extension of the neural processes, which thus indicated the occurrence of cell differentiation. In conclusion, the high expressions of *Nnat* were found to be associated with good prognoses in neuroblastoma, which might indicate tumor differentiation, and its suppressions in unfavorable tumors are considered to be under epigenetic control.

Key Words: neuroblastoma, *neuronatin*, differentiation

(*J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:551–556)

Neuroblastoma is the most frequent extracranial solid tumor of children, mostly found in cases below 5 years of age. It occurs either in an adrenal gland or in a sympathetic ganglia, originates from embryonal sympathoadrenal lineage, which derives from the neural crest. Neuroblastoma can show widely varying courses, such as

a spontaneous regression of the tumor or differentiation into either ganglioneuroma or neuroma, or an aggressive progression and widespread metastases. Clinically, infant patients tend to show a favorable prognosis, slow tumor growth or a spontaneous regression, or a high responsibility to chemotherapies, whereas older patients often show rapid tumor growth, metastasis, and poor outcomes despite the administration of multidisciplinary therapies.^{1–3}

These varied malignant potentials are concerned with several factors, and a number of biologic factors have been found to be important prognostic factors of neuroblastoma, such as either *MYCN* amplification or chromosome 1p deletion as unfavorable prognostic factors, and a high expression of *trkA* as a favorable prognostic factor, and other aberrations of chromosomes or DNA ploidy.^{1–3} Although these prognostic factors clinically contribute to the classification of the patient's prognostic risk and also help in selecting optimal therapies, not all the functions of those prognostic factors in the tumor cells are clear. More analyses are necessary to reveal the mechanisms of tumorigenesis and the widely different malignant potentials in each neuroblastoma.

In this study, we first attempted to compare the gene expressions between tumors with favorable and unfavorable properties, regarding the analysis of the genes concerned with the malignant potentials of neuroblastoma. Among the genes which show a higher expression in favorable tumors, we focused on 1 gene, *neuronatin* (*Nnat*), as a gene which is related to the development of nervous systems. Our analysis revealed the pattern of *Nnat* expression in clinical neuroblastoma tumors with either favorable or unfavorable prognostic factors. We herein show the changes in the *Nnat* expressions in a neuroblastoma cell line after treatment with demethylating drugs, while also demonstrating the morphologic changes of neuroblastoma cells after *Nnat* gene induction. On the basis of these results, we analyzed the function of *Nnat* in neuroblastoma.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Neuroblastoma Samples

Tumor samples were preserved in -80°C either at the primary operation or at the pretreatment biopsy. The consent from the parents of patients was obtained before

Received for publication September 17, 2006; accepted May 21, 2007.
From the Departments of *Pediatric Surgery; and †Surgery and Science,
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka,
Japan.

Reprints: Dr Mayumi Higashi, MD, Department of Pediatric Surgery,
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1
Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan (e-mail: hgsh@
pedsurg.med.kyushu-u.ac.jp).

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

surgery for tumor preservation and the biologic analysis. We analyzed *MYCN* amplification by Southern blotting and DNA ploidy by flow cytometry in these samples on the basis of the methodologies described in previous studies.^{4,5}

RNA Extraction and cDNA Synthesis for Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from tumors by using Isogen (Nippon Gene, Osaka, Japan) and reverse transcription was performed with a First-strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) using random hexanucleotide primers.

cDNA Microarray Analysis

Six neuroblastoma tumors were grouped into 2 types as follows; one is a favorable group composed of 3 samples with favorable prognostic factors (under 1 y of age, *MYCN* single copy, aneuploid, and a Shimada favorable histology), whereas the other is an unfavorable group composed of 3 samples with unfavorable prognostic factors (over 1 y of age, *MYCN* amplified, diploid, and a Shimada unfavorable histology) (Table 1). Seven micrograms of RNA extracted from each of 3 tumors were obtained for a total of 21 μ g in each group. RNA was synthesized to cDNA and labeled with either Cyanine-3 or Cyanine-5 fluorescent dye, and then they were competitively hybridized to the microarray probes (Human 1, 12,814 genes, Agilent Technologies, Inc, Palo Alto, CA). After hybridization, the microarray plate was washed and scanned by a scanner using the Gsi Lumonics Scan Array 4000 (Ontario, Canada). Genes with a significantly high expression in each group were selected by a cut-off threshold when the expression was higher than twice of that of the other group.

Semiquantitative Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction

The *Nnat* primers for the both *Nnat* α and *Nnat* β were as follows: forward primer: 5'-cgg gat ccc gga tct cgg caa acc ctc tt-3'; reverse primer: 5'-ggc gcg gcc gca ctg gcc cct cac tga cct tg-3'; and the primers for β -actin as a control were as follows: forward primer: 5'-acg agg ccc aga gca aga gag-3'; reverse primer: 5'-ctc ctt aat gtc acg cac gat-3'. Polymerase chain reaction (PCR) were denaturing at 94°C for 5 minutes, 35 cycles of 94°C for

30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and thereafter, extension at 72°C for 7 minutes.

Quantitative Reverse-transcription PCR

The *Nnat* expressions in 63 neuroblastoma tumors were analyzed by quantitative real-time reverse-transcription (RT)-PCR. The sequences of primers and probes for both *Nnat* isoforms were determined as follows: *Nnat* α forward primer: 5'-agg gac aca gcc cat tgc-3'; reverse primer: 5'-aca ccg tgt atg cca gct tct-3'; and TaqMan probe, 5'-aga agt gag gtg ttc agg tac tcc ctg-3'; *Nnat* β forward primer: 5'-tcg gct gaa ctg ctc atc atc-3'; reverse primer: 5'-ttc tgc agg gag tac ctg aac a-3'; and TaqMan probe, 5'-aca tct tcc gcg tgc tgc tgc ag-3'. TaqMan probes were labeled by FAM at 5' site and by TAMRA at 3' site. The 18s rRNA primer/probe (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used as an internal control. PCR reactions by ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) were started at 50°C for 2 minutes and denatured at 95°C for 10 minutes, and then were subjected to 40 cycles of 2-step PCR reaction at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minutes. The expressions of *Nnat* isoforms were quantified as a relative value to the internal control.

Statistical Analysis

The correlations between *Nnat* expressions and clinical or biologic factors (patient's age, clinical stage, DNA ploidy, Shimada classification, *MYCN* amplification, or outcome) were examined using the Mann-Whitney *U* test, as this method can evaluate groups of unequal numbers.

Cell Culture and Treatment With Demethylating Agent

The IMR32 neuroblastoma cell line was cultured in RPMI1640 growth medium (SIGMA, St Louis, MO) supplemented with 10% FBS (Gibco BRL, Rockville, MD) and 1XPSG (SIGMA), and incubated in 37°C with 5% CO₂. Next, the cells were incubated in the presence of 2 μ M of 5-aza-2'-deoxycytidine (SIGMA) for 72 and 96 hours. After incubation, the cells were collected and the total RNA was extracted, and thereafter it was synthesized to cDNA.

Transfection of *Nnat* cDNA Into IMR32

The IMR32 neuroblastoma cell line was cultured in a growth medium of RPMI1640 (SIGMA) supplemented

TABLE 1. Neuroblastoma Tumors Used for Microarray Analysis

Sample No.	Age (mo)	INSS	Ploidy	Shimada Classification	<i>MYCN</i> Copy	Outcome	Group
1	23	4	Diploid	Unfavorable histology	48	Dead	Unfavorable
2	48	4	Diploid	Unfavorable histology	32	Dead	
3	24	4	Diploid	Unfavorable histology	19	Dead	
4	8	1	Aneuploid	Favorable histology	1	Alive	Favorable
5	10	1	Aneuploid	Favorable histology	1	Alive	
6	8	1	Aneuploid	Favorable histology	1	Alive	

INSS indicates International Neuroblastoma Staging System.

with 10% FBS (Gibco BRL) and 1XPSG (SIGMA), and incubated in 37°C with 5% CO₂.

Each *Nnat* α or *Nnat* β cDNA was inserted into the plasmid vector pcDNA3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) by BamHI-NotI fragment. The pcDNA3.0-*Nnat* α or pcDNA3.0-*Nnat* β , or pcDNA3.0 as a control, were transfected to IMR32 cells using Lipofectamine plus (Invitrogen). The medium was replaced 24 hours after transfection, and then 500 μ g/mL of G418 (SIGMA) was added to the medium, and thereafter the cells were cultured continuously in 37°C with 5% CO₂.

RESULTS

Either favorable or unfavorable group dominant genes were detected by a microarray, and then their *Nnat* expressions were determined. As a result of the microarray which compared the gene expressions between favorable and unfavorable neuroblastomas, 40 genes were found to show a favorable group dominant expression, whereas 400 demonstrated an unfavorable group dominant expression. Tables 2 and 3 show some of these genes, which are known to be involved in neurogenesis, cell cycle, or other tumor activities. The most significant difference was found in the *MYCN* expression, which was 18-fold higher in the unfavorable group than in the favorable group. The *Nnat* gene expression was 3-fold higher in the favorable group than in the unfavorable group. This microarray method detected the *Nnat* expressions as a sum of 3 samples in each group, and then we detected the *Nnat* expressions of each sample by semiquantitative RT-PCR. As a result, 2 of 3 samples in the favorable group showed a remarkably high expression of *Nnat* β in comparison with other samples. However, 1 of 3 samples in the favorable group showed low expressions of both *Nnat* α and *Nnat* β . In these samples, no apparent differences were found in the *Nnat* α expression between the favorable and unfavorable group (Fig. 1).

TABLE 2. Unfavorable Group Dominant Genes Detected by a Microarray Analysis

Gene	Unfavorable/ Favorable
<i>Homo sapiens N-myc</i>	18.43
Lactate dehydrogenase	7.34
RAN, member RAS oncogene family	6.60
Calcyclin binding protein	6.36
Centrin, EF-hand protein, 2	6.35
Serine/threonine protein 1 phosphatase catalytic subunit	5.10
RAN binding protein 3	4.82
Insulinlike growth factor 2 (somatomedin A)	4.73
Activator of S phase kinase	4.11
CDC28 protein kinase 2	4.11
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	3.99
ATP synthase, H ⁺ transporting	3.36
VGF	3.15
NADH dehydrogenase	3.13
Ribosomal protein	—
Heat shock protein 70, 40, 60, and 90 kd	—

VGF indicates nerve growth factor inducible.

TABLE 3. Favorable Group Dominant Genes Detected by a Microarray Analysis

Gene	Favorable/Unfavorable
Ral guanine nucleotide dissociation stimulator	3.75
<i>Nnat</i>	2.97
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal	2.85
Cyclin D1	2.61
Tubulin, α , brain-specific	2.37
Transcription factor AP-2- β	2.37
Secretory granule, neuroendocrine protein 1	2.35
Growth-associated protein 43	2.34
Neural cell adhesion molecule 1	2.05

***Nnat* Isoforms, *Nnat* α and *Nnat* β Expressions in 63 Neuroblastoma Samples**

On the basis of the detection of the *Nnat* expressions in 63 neuroblastoma tumors by quantitative RT-PCR, the correlations between the *Nnat* gene expressions and the prognostic factors or outcomes were statistically analyzed. All samples were grouped according to their respective prognostic factors (favorable or unfavorable): age (< 1 or \geq 1 y), International Neuroblastoma Staging System stage (1, 2, 4S, or 3,4), DNA ploidy (aneuploid or diploid), Shimada pathologic classification (favorable or unfavorable), *MYCN* amplification (present or absent), and outcomes (alive or dead).

All groups of favorable prognostic factors or a good outcome showed statistically higher expressions in both of the *Nnat* isoforms, namely *Nnat* α and *Nnat* β , than in either those with unfavorable prognostic factors or the tumors of dead patients (Table 4). Although the distributions of the *Nnat* expressions actually varied greatly, a large part of the favorable tumors showed high expressions, while almost all unfavorable tumors showed low expressions. As a result, a remarkable pattern was observed for the *Nnat* β expression and the difference was statistically significant. The *Nnat* α expression showed significant difference without taking International Neuroblastoma Staging System classification and DNA ploidy

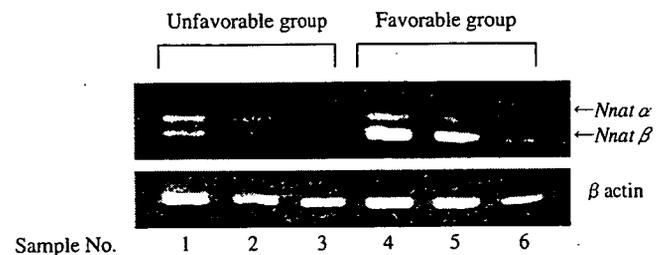


FIGURE 1. Semiquantitative PCR analysis for *Nnat* mRNA expression in neuroblastoma tumors used for the microarray analysis. No. 4 and 5 (favorable group) showed a high expression of *Nnat* β in comparison with other samples. However, No. 6 in the favorable group showed low expressions of both *Nnat* α and *Nnat* β , although β -actin also showed a weak band. No significant differences were found in the *Nnat* α expression between the favorable and unfavorable group.

TABLE 4. Quantitative Analysis for *Nnat* α and *Nnat* β Expressions in Neuroblastoma Tumors

	n	<i>Nnat</i> α		<i>Nnat</i> β	
		<i>Nnat</i> α /18s rRNA %TILE 50%	Mann-Whitney U test P	<i>Nnat</i> β /18s rRNA %TILE 50%	Mann-Whitney U test P
Age					
< 1 y	35	0.18	< 0.01	1.72	< 0.01
\geq 1 y	28	0.14		0.36	
INSS					
1, 2, 4S	36	0.17	0.07	1.35	< 0.01
3, 4	27	0.14		0.37	
DNA ploidy					
Aneuploid	28	0.22	0.19	0.96	< 0.05
Diploid	18	0.14		0.33	
Shimada classification					
Favorable	38	0.20	< 0.05	1.79	< 0.01
Unfavorable	19	0.14		0.29	
<i>MYCN</i> amplification					
(-)	48	0.20	< 0.01	1.01	< 0.01
(+)	14	0.11		0.11	
Outcome					
Alive	44	0.20	< 0.01	1.11	< 0.01
Dead	19	0.10		0.36	

INSS indicates International Neuroblastoma Staging System.

into consideration. We also performed a statistical analysis using an age cutoff of 18 months because some studies have shown an 18-month cutoff to be a more appropriate risk classification than 12 months. These results were also similar to those obtained for a 12-month cutoff, even though the imbalance in the number between the groups was more remarkable than the 12-month cutoff (data not shown). No statistical relationship between either the *Nnat* α or *Nnat* β expression and the *trkA* expression was found (data not shown). Our clinical samples contained many infant patients because Japan conducts mass screening at 6 months of age, and most

of favorable tumors were found by mass screening. However, the statistical results, such as comparing the findings on the basis of the presence or absence of *MYCN* amplification, were similar even when such mass screening patients were excluded (Fig. 2).

Up-regulation of the *Nnat* Expressions in IMR32 Cell After the Administration of a Demethylating Agent

Before treatment, no expression of *Nnat* α or *Nnat* β was found in IMR32 cells by RT-PCR. However, *Nnat* expressions were up-regulated after the 72 and 96-hour treatment by 5-aza-2'-deoxycytidine, whereas control cells showed no change (Fig. 3).

Morphologic Change in IMR32 Cells by *Nnat* Transfection

After *Nnat* transfections and selection by G418, the stable expression of *Nnat* α and *Nnat* β was achieved in

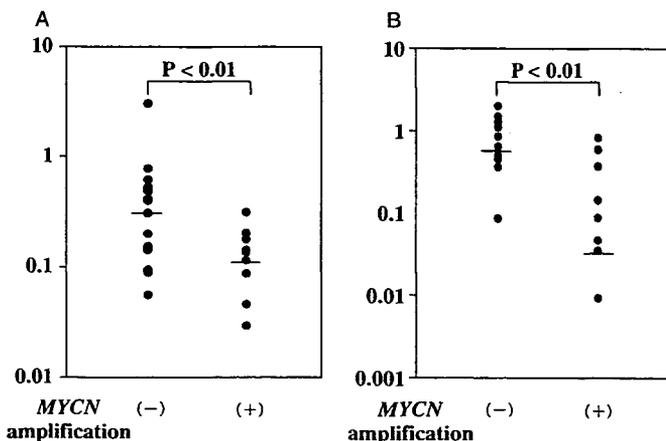


FIGURE 2. Quantitative RT-PCR results of *Nnat* expressions in clinical samples after excluding 33 patients detected by mass screening. *MYCN* were not amplified in 17 tumors and were amplified in 13 tumors. The mRNA expressions were higher in samples without *MYCN* amplification than in those with amplification. A, *Nnat* α mRNA expressions (B), *Nnat* β mRNA expressions. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney U test.

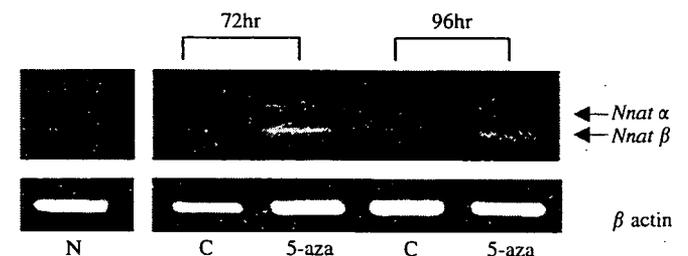


FIGURE 3. A semiquantitative RT-PCR analysis of *Nnat* expressions in IMR32 cell after treatment by the demethylating drug. C indicates control, cultured with solvent; N, no treatment, 5-aza, cultured with 5-aza-2'-deoxycytidine. The *Nnat* expressions were up-regulated during 96 hours of treatment by 5-aza-2'-deoxycytidine, whereas the control cells showed no change.

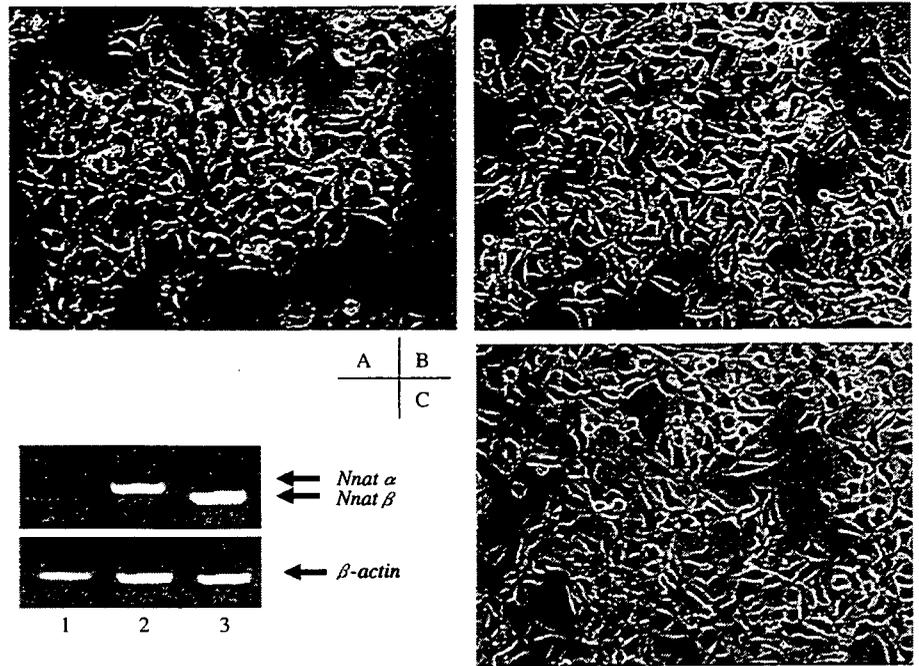


FIGURE 4. IMR32 cells with neuronatin overexpressions: A, Control, pcDNA3.0 plasmid vectors were transfected. B, *Nnat α* were overexpressed. C, *Nnat β* were overexpressed. The expressions of *Nnat α* and *Nnat β* mRNAs were confirmed by RT-PCR. Extensions of the neural processes were found in the cells with *Nnat α* or *Nnat β* expressions.

selected cells in which the mRNA expressions were confirmed by semiquantitative RT-PCR. Morphologic changes of cells were found at 2 weeks after transfection, as the extensions of the neural processes were found in the cells with either *Nnat α* or *Nnat β* expressions (Fig. 4).

DISCUSSION

Nnat was first cloned in 1994 from a neonatal mammalian brain.⁶ It is highly conserved in mammalian species, and is found in the developing mammalian nervous system. In a study of mice, the expression of *Nnat* first appeared in the hindbrain at the 8.5th fetal day, and then spread to the central and peripheral nervous systems, and gradually disappeared after birth. The expression was also found in the sympathetic neurons and adrenal gland on the 15th fetal day of the mouse.⁷ This gene is located at 20q11.2-q12, and is 3973-bp long. It contains 3 exons and 2 introns and has 2 expression forms as a splicing variant, *Nnat α* and *Nnat β*. The α form has all 3 exons, whereas the β form has 2 exons without the middle one of the α form.^{8,9} The function of *Nnat* in the developing nervous system is not clear. However, the structure of *Nnat* was revealed to be a proteolipid, and it also has a homology to 2 other proteolipids, PMP1 and phospholamban, which are transmembrane protein and they function as regulators of ion channels.¹⁰ Therefore, the function of *Nnat* is considered to be a regulator of the ion channel.

In this study, we found, for the first time, a high expression of *Nnat* in favorable neuroblastomas with good prognostic factors based on a preliminary microarray analysis. From the microarray result, we selected *Nnat* among the dozens of candidate genes because it was expected that some genes which contribute to fetal

development may also play some roles in such tumor development, especially in embryogenic tumors like neuroblastoma, which originally derives from neural precursor cells. In recent studies, many genes which function in the embryonic development of normal tissues for cell proliferation or differentiation were also found to play important roles in tumor progression. Regarding neuroblastoma, some prognostic factors, such as *MYCN* or *trkA*, were also found to play an important role in neural development. The high *Nnat* expression in favorable neuroblastoma may thus play a role in differentiation or apoptosis.

A further analysis by quantitative RT-PCR with a large number of samples showed statistically higher expressions of both of *Nnat* isoforms, *Nnat α* and *Nnat β*, in the group with favorable prognostic factors and a good outcome than in those with unfavorable prognostic factors and a poor outcome. In fact, not all *Nnat* expressions were high in the favorable neuroblastomas, however, almost all the unfavorable neuroblastoma tumors showed a low *Nnat* expression, and the difference was statistically significant. Especially, the *Nnat β* expressions were remarkably high in the favorable groups. The differences in the functions between these 2 isoforms have not yet been clarified, only the *Nnat β* expression has been reported to appear in the later phase of embryos than *Nnat α*.⁷ No statistical relationship between either the *Nnat α* or *Nnat β* expression and the *trkA* expression was found in our analysis. We speculate that *Nnat* therefore correlates with the neural development in a different way from the *trkA*. *trkA* is a receptor of nerve growth factor, and we suppose that *Nnat* correlates with the other signal pathway in neural differentiation, like Wnt signaling, as described later. In addition, we also tried to perform a multiple logistic

regression analysis if the *Nnat* expressions indicate a risk of disease beyond *MYCN*, age, or stage. However, this analysis was difficult because the parameters were so different for each factor that we could not perform it in an appropriate manner.

It is also considered important to mention that *Nnat* is a paternal imprinted gene.¹¹ Genomic imprinting means that one of the alleles inherited either paternally or maternally is controlled by a different pattern of methylation. The aberrant epigenetic suppressions of imprinted genes by methylation are sometimes related with cell immaturity or tumorigenesis. One well-known example is a biallelic suppression of H19 gene by CpG island methylation, and the following biallelic expression of IGF2 gene in Wilms tumor.¹² Regarding *Nnat*, Kuerbitz et al¹³ elucidated the *Nnat* expression in hematopoietic progenitor cells, and it was suppressed by hypermethylation in acute leukemia cells. It is supposed that the *Nnat* expression was also regulated by the methylation of genome DNA in neuroblastoma. IMR32 is a cell line of aggressive neuroblastoma with *MYCN* amplification, which thus shows almost no *Nnat* expression. In our analysis, the *Nnat* expressions were up-regulated in IMR32 cells treated by a demethylating agent. Although no methylation analyses of either clinical samples or cell lines were not performed in this study, the suppression of the *Nnat* expression in aggressive neuroblastoma was suggested to be caused by DNA methylation. This result suggested the therapeutic effect of demethylating agent for neuroblastoma differentiation.

In adults, *Nnat* protein was found in adipose tissue from the pancreas and pituitary gland. In a study of adipocytes, *Nnat* was found to be located on the endoplasmic reticulum and regulating intracellular calcium ion, while it is also associated with adipogenesis.¹⁴ In the course of embryogenesis, the intracellular calcium concentration can play a role of the signaling cascade. For example, an Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) up-regulate intracellular calcium concentration through the receptor on the endoplasmic reticulum, and thereafter the protein kinase C is activated, such as one of the Wnt signaling cascades: namely, Wnt5a and the downstream pathway *Nnat* may be a factor concerning such cascades and, as a result, it may thus regulate neurogenesis. In this study, *Nnat* transfected cells showed an extension of the neural processes; however, no further notable changes in differentiation were found. There is a paradoxical report about *Nnat* and neural cell differentiation, which reported the *Nnat* α expression to be down-regulated in PC12 cells treated by nerve growth factor.¹⁵ One more thing puzzled us was that we detected the *Nnat* mRNA expressions in some ganglioneuromas or neuromas: the differentiated neuroblastoma lineage, and which thus showed either moderate or relatively low expressions in comparison with other favorable neuroblastoma samples (data not shown). Therefore, *Nnat* is supposed to play a role in

nervous differentiation, thereby regulating the intracellular calcium concentration, and some more factors are thus needed for complete differentiation. However, a high *Nnat* expression in neuroblastoma cells may tend to indicate differentiation.

In conclusion, we found high expressions of *Nnat* in favorable neuroblastomas after comparing the gene expressions between favorable and unfavorable neuroblastomas. Both *Nnat* isoforms showed higher expressions in the favorable neuroblastoma group than in the unfavorable group, and the difference was remarkable in *Nnat* β expressions. Although no detailed analysis was performed in this study, the expressions of *Nnat* were suggested to be regulated by DNA methylation, and thus were considered to be related to the differentiation of neuroblastoma. Further analyses of other development-related genes, similar to *Nnat* in tumors is thus expected to help elucidate the mechanism of both tumorigenesis and embryogenesis.

REFERENCES

1. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:203–216.
2. Schwab M, Westermann F, Hero B, et al. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol*. 2003;4:472–480.
3. Riley RD, Heney D, Jones DR, et al. A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:4–12.
4. Tajiri T, Shono K, Tanaka S, et al. Evaluation of genetic heterogeneity in neuroblastoma. *Surgery*. 2002;131:S283–S287.
5. Tanaka S, Tajiri T, Noguchi S, et al. Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of *MYCN* in neuroblastoma. *J Pediatr Surg*. 2004;39:63–68.
6. Joseph R, Dou D, Tsang W. Molecular cloning of a novel mRNA (neuronatin) that is highly expressed in neonatal mammalian brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;201:1227–1234.
7. Wijnholds J, Chowdhury K, Wehr R, et al. Segment-specific expression of the neuronatin gene during early hindbrain development. *Dev Biol*. 1995;171:73–84.
8. Joseph R, Dou D, Tsang W. Neuronatin mRNA: alternatively spliced forms of a novel brain-specific mammalian developmental gene. *Brain Res*. 1995;690:92–98.
9. Dou D, Joseph R. Structure and organization of the human neuronatin gene. *Genomics*. 1996;33:292–297.
10. Dou D, Joseph R. Cloning of human neuronatin gene and its localization to chromosome-20q 11.2-12: the deduced protein is a novel “proteolipid”. *Brain Res*. 1996;723:8–22.
11. Kikyo N, Williamson CM, John RM, et al. Genetic and functional analysis of neuronatin in mice with maternal or paternal duplication of distal Chr2. *Dev Biol*. 1997;190:66–77.
12. Steenman J, Rainier S, Dobry J, et al. Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms tumour. *Nature Genet*. 1994;7:433–439.
13. Kuerbitz SJ, Pahys J, Wilson A, et al. Hypermethylation of the imprinted NNAT locus occurs frequently in pediatric acute leukemia. *Carcinogenesis*. 2002;23:559–564.
14. Suh YH, Kim WH, Moon C, et al. Ectopic expression of Neuronatin potentiates adipogenesis through enhanced phosphorylation of cAMP-response element-binding protein in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337:481–489.
15. Joseph R, Tsang W, Dou D, et al. Neuronatin mRNA in PC12 cells: downregulation by nerve growth factor. *Brain Res*. 1996;738:32–38.

神経芽腫

neuroblastoma

Key words: 神経芽腫

定義・概念 神経芽腫の用語は 1910 年に Wright が初めて neuroblastoma という用語を使用したことに始まる。神経芽腫は胎生期の神経堤 (neural crest) を起源とする神経芽細胞が成熟分化せずに腫瘍化したものと考えられ、副腎髄質および交感神経系組織に発生する胎児性腫瘍である。神経芽腫の名称は、組織学的に狭義の神経芽腫 (neuroblastoma) と神経節芽腫 (ganglioneuroblastoma) および神経節腫 (ganglioneuroma) の 3 種類の腫瘍を総称するものであり、神経芽腫群腫瘍 (pNTs: peripheral neuroblastic tumors) と呼称する場合もある。

発生頻度は小児悪性固形腫瘍の中で脳腫瘍に次いで多い。アメリカでは 7,000 人出生に対し 1 人の割合で発生し、年間約 600~650 人の発生頻度がある。日本の小児癌登録事業は整備中であり神経芽腫の正確な発生頻度は把握されていないが、(財)がんと子供を守る会小児がん全国登録委員会の小児悪性新生物・全国登録委員会報告事業によると年間約 200 人弱の登録がある。これらは神経芽腫マスキング事業によって無症候性に発見された症例を含むため、症候性に発見される症例の発生頻度は不明である。神経芽腫の発生は 1 歳以下のピークと 3~4 歳のピークの 2 峰が存在する。

病態生理 神経芽腫の好発部位は副腎が 65% で最も多く、その他は頸部、後縦隔、後腹膜、骨盤腔などの交感神経節である。左右差は 3:2 の割合で左に多い。転移は骨、骨髄、肝、リンパ節、皮膚、眼窩などに認められる。脳あるいは肺転移の報告もある。神経芽腫の多くでは血清カテコラミン (ドパミン、エピネフリン、ノルエピネフリン) を産生し、その尿中代謝産物であるバニルマンデル酸 (VMA) とホモバニリン酸 (HVA) などが上昇する。狭義の神経芽腫はクロマチンに富む核と乏しい細胞質からなる小円形腫瘍細胞と、わずかな神経線維とからなり、その間に間質細胞が存在する。神経節芽腫は未分化な神経芽細胞と分化した神経節細胞が混在するものである。Beckwith らの研究から胎生期には多数の *in situ* neuroblastoma が存在し、その大多数が自然に成熟または消退し、残りのごく一部が神経芽腫になるものと推定されている。マスキング症例の検討から、

神経芽腫のうちあるものは自然退縮や分化成熟し予後良好であることが判明した。しかし 1 歳以上で診断される症例は病期が進行し、また生物学的予後因子も不良なものをもつことが多く、治療抵抗性で予後不良な例が多い (進行例)。両者を明確に区別する指標ははまだ明らかではない。これまでの研究から、年齢、stage、病理組織学的分類、MYCN、DNA ploidy、*trkA* などが予後と関連していると考えられている。

臨床症状 臨床症状には原発部位の腫瘍による症状と転移による症状があり、年齢と原発部位、病期により異なる。乳児期早期の症例は多くが 4S 期で、びまん性肝転移による腹部膨満症状とそれによる胸部圧迫のための呼吸器症状を認めることが多い。乳児期のマスキング発見例は一般的に無症状である。進行例には腹部膨満、食欲不振、発熱などのほかに遠隔転移の症状としての顔面蒼白、貧血、眼球突出、眼瞼出血、骨痛、関節痛、跛行などが認められることが多いが、発熱のみの場合や偶然の腹部腫瘍触知による発見まで無症状のこともある。特殊な症状として、Horner 症候群や opsomyoclonus、小脳性運動失調あるいは脊椎管内への腫瘍進展による神経麻痺、腫瘍から産生されるカテコラミンによる異常な発汗や高血圧、血管作動性腸ペプチド産生による水様性下痢などがみられることがある。

診断 診断は原発腫瘍または転移巣の開創生検を行い光学顕微鏡検査により病理組織学的に確定診断する。あるいは、骨髄検査で腫瘍細胞の転移が確認され、かつ尿中 VMA、HVA が明らかに高値である場合は、原発腫瘍の組織学的検討を行わずに神経芽腫と診断してよい。しかしながら原則として原発腫瘍の開創生検を行い病理組織学的な診断を行うべきである。針生検による病理診断は正確な診断に至ることが困難な場合があり、また治療方針決定に必要な生物学的予後因子の検索ができないことがあり、神経芽腫以外の固形腫瘍の場合も含め勧められない。MYCN コピー数や DNA ploidy などの分子生物学的予後因子の検索を行うことがリスク分類による治療方針の決定には必要である。病理組織学的分類は International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) が国際的に一般的である。これは神経芽腫細胞の形態に、診断時年齢、Schwann 細胞の発達 (stroma)、神経細胞の分化程度 (differentiation)、Mitosis-karyorrhexis index (MKI) を加味し、組織型としては neuroblastoma, ganglioneuroblastoma: intermixed, ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma: nodular の 4 型に分類し、さらに予後のグループとして favorable histology group と unfavorable histology group に分類するものである。

七野浩之 Hiroyuki Shichino

日本大学医学部小児科

〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1 TEL 03-3972-8111 FAX 03-3957-6186 E-mail: hshichino@med.nihon-u.ac.jp

表 1 神経芽細胞腫国際病期分類 (International Neuroblastoma Staging System/INSS)

病期	定義
1	限局性腫瘍で、肉眼的に完全切除。組織学的な腫瘍残存は不問。同側のリンパ節に組織学的な転移を認めない(原発腫瘍に接し、一緒に切除されたリンパ節転移はあってもよい)。
2A	限局性腫瘍で、肉眼的に不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認めない。
2B	限局性腫瘍で、肉眼的に完全または不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認める。対側のリンパ節に転移を認めない。
3	切除不能の片側性腫瘍で、正中線(対側椎体縁)を越えて浸潤。同側の局所リンパ節の転移は不問。または、片側発生の限局性腫瘍で対側リンパ節転移を認める。または、正中発生の腫瘍で椎体縁を越えた両側浸潤(切除不能)か、両側リンパ節転移を認める。
4	いかなる原発腫瘍であるかにかかわらず、遠隔リンパ節、および/または、骨、骨髄、肝、皮膚、ほかの臓器に播種している(4Sは除く)。
4S	限局性腫瘍(病期1, 2A, 2B)で、播種は皮膚、および/または、肝、骨髄に限られる(1歳未満の患者のみ)。骨髄中の腫瘍細胞は有核細胞の10%未満で、それ以上は病期4である。MIBGシンチが行われるならば骨髄への集積は陰性。

(Brodeur GM, et al: J Clin Oncol 11 (8): 1466-1477, 1993)

表 2 効果判定規準 (International Neuroblastoma Response Criteria/INRC)

評価	原発巣	転移巣
CR (complete response)	腫瘍なし	腫瘍なし カテコールアミン代謝産物正常化
VGPR (very good partial response)	90~99%縮小	腫瘍なし カテコールアミン代謝産物正常化 骨シンチでの集積は残存していてもよい (MIBGシンチは陰性化していなければならない)
PR (partial response)	50%以上縮小	測定可能病変が50%以上縮小 骨転移の病変数が50%以上減少 骨髄転移の病変数は0~1か所 (MIBGシンチでの集積は残存していてもよい)
MR (mixed response)	新病変の出現なし 原発巣および転移巣の測定可能病変において50%以上縮小する病変を認める 同時にほかの病変は50%未満の縮小や25%未満の増大を示す	
NR (no response)	新病変の出現なし 原発巣および転移巣の測定可能病変は、50%未満の縮小や25%未満の増大を示す	
PD (progressive disease)	新病変の出現 あるいは原発巣および転移巣の測定可能病変において25%以上の増大を示す病変を認める もしくは骨髄の転移病変の新たな出現	

CR, VGPR, PR, MR, NRについては定義に述べられたすべての要件を満たしていることが必要である。

PDに関しては定義に述べられたいずれかの要件を満たした状態である。

(Brodeur GM, et al: J Clin Oncol 11 (8): 1466-1477, 1993)

病期分類 これまで病期分類は日本小児外科学会悪性腫瘍分類, Evans system, St. Jude Children's Research Hospital and POG classificationなどが使用されてきたが、現在は神経芽細胞腫国際病期分類 (International Neuroblastoma Staging System/INSS) (表1) が使用される。病期分類には初診時での原発腫瘍の拡がり、

リンパ節転移、肝転移、あるいは神経芽腫の好発部位である交感神経の経路に沿った部位への転移の把握が必要であり、これには全身のX線CTやMRIが必要である。さらに骨および骨髄転移の検索が必須で、¹²³I metaiodobenzylguanidine (MIBG) シンチグラフィおよび^{99m}Tc骨シンチグラフィが必要である。骨髄転移の検索には、治

療効果の判定として International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) (表 2) を用いる場合には左右 2 か所の腸骨での骨髓穿刺吸引検査と左右 2 か所の骨髓生検が必要とされている。

リスク分類 神経芽腫は年齢, 病期, 病理学的特徴, 分子生物学的特徴などにより著しく予後が異なる。このため治療選択の基準として, 病期分類にさらにいくつかの予後因子を組み合わせたリスク分類の必要性が提唱されている。リスクは予後との関連により低リスク群, 中間リスク群, 高リスク群に分類することが一般的である。これまでは日米欧で独自のリスク分類が提案されてきたが, 現在は国際的な統一分類の開発が企画され討議されている。代表的なリスク分類である COG のリスク分類では, 年齢と INSS 病期分類, INPC 組織分類, MYCN 増幅の有無および DNA index により表 3 のように分類している。

鑑別診断 悪性リンパ腫, Ewing 肉腫ファミリー腫瘍, 横紋筋肉腫と神経芽腫は, HE 染色による形態判断では鑑別が困難な場合があり, これらの疾患を総称して小円形細胞腫瘍と呼んでいる。これらの鑑別には生検あるいは摘出組織を利用して免疫染色や電子顕微鏡検査あるいは分子生物学的検査を施行する必要がある。また, いわゆる腫瘍マーカーとしての血清カテコールアミンや VMA, HVA などを確認することが有効である。NSE は小円形細胞腫瘍ではいずれの腫瘍でも上昇することがある。また原発部位が腎近傍の場合には腎芽腫などの腎原発腫瘍の鑑別も必要である。

予後 予後を規定する最も重要な因子は適切な治療法の開発である。このため現在では上述のようにリスク分類による治療法の選択について真剣に討議されている。リスク分類はいまだ議論の途上ではあるが, 今後治療成績の集積により改善していくものと考えられる。一般的には, 1 歳以上の患者は予後不良と考えられている。また stage 4 あるいは MYCN が増幅している進行神経芽腫の予後は, 骨髓破壊の大量化学療法を行っても 3 年無増悪生存率は 20~40% 台にすぎない。主な再発形式は骨あるいは骨髓再発である。現在アメリカでは COG のリスク分類に基づき 3 年全生存率を低リスク群で 90% 超, 中間リスク群で 70~90%, 高リスク群で 30% 超と推測している。日本全体としての治療成績は明らかではない。

治療方針 神経芽腫治療は以前よりリスクに基づいた治療戦略が行われてきた。現在の COG の治療方針は低リスク群では外科切除後経過観察, 中間リスク群では外科切除と通常化学療法, 高リスク群では集学的治療が必要となり, 外科切除に加え積極的な化学療法と大量化学療法+自家造血細胞移植および放射線療法である。日本においても以前よりほぼ同様の治療方針が採られている。

進行例に対する治療方針 現在日米欧で行われてい

表 3 COG リスク分類

低リスク

1. 患者の年齢を問わず INSS 1 期
2. 1 歳未満の INSS 2A 期および 2B 期
3. 1 歳以上で, FHG の INSS 2A 期および 2B 期
4. 1 歳以上で, *N-MYC* 増幅なしの INSS 2A 期および 2B 期
5. 1 歳未満で, *N-MYC* 増幅なし, かつ FHG, かつ高二倍体 DNA である INSS 4S 期

中間リスク

1. 1 歳未満で, *N-MYC* 増幅なしの INSS 3 期
2. 1 歳以上で, *N-MYC* 増幅なし, かつ FHG の INSS 3 期
3. 1 歳未満で, *N-MYC* 増幅なしの INSS 4 期
4. 1 歳未満で, *N-MYC* 増幅なし, かつ二倍体に近い DNA の INSS 4S 期
5. 1 歳未満で, *N-MYC* 増幅なし, かつ UFHG の INSS 4S 期

高リスク

1. 1 歳以上で, *N-MYC* 増幅あり, かつ UFHG の INSS 2A 期および 2B 期
2. 患者の年齢を問わず, *N-MYC* 増幅ありの INSS 3 期
3. 1 歳以上で, UFHG の INSS 3 期
4. 1 歳未満で, *N-MYC* 増幅ありの INSS 4 期
5. 1 歳以上の INSS 4 期
6. 1 歳未満で, *N-MYC* 増幅ありの INSS 4S 期

FHG: INPC で favorable histology group, UFHG: INPC で unfavorable histology group

記載のない項目は不問である。

(Castleberry RP: Eur J Cancer 33: 1430-1437, 1997)

高リスク群の治療戦略は, 診断時には原発巣が全摘出できる症例がほとんどないこと, および骨, 骨髓転移例が多く速やかな全身化学療法の開始が必要であることから, 初回手術は診断目的の生検にとどめられ, 寛解導入療法としての化学療法を数コース行った後, 局所療法として外科切除術および局所放射線療法を組み合わせた治療を行い, その後強化した化学療法あるいは骨髓破壊の大量化学療法による地固め療法を行うものである。寛解導入療法としては, シスプラチン, トポイソメラーゼ II 阻害剤, アントラサイクリン系薬剤, ビンクリスチン, シクロホスファミドのうちから 3~5 種類の薬剤を組み合わせた多剤併用療法が一般的に行われている。治療回数は間に外科手術や放射線治療を挟む形で 5~7 回程度行われる計画が多い。外科療法の施行時期と腫瘍の切除度合については議論が分かれており, 結論がでていない。神経芽腫はいまだ治療法開発段階であり, 今後は整備された前方視的な多施設共同臨床研究に従い治療が行われることが望ましいと考えられる。

神経芽腫

—難治希少疾患への挑戦—

福島 敬*¹ 七野 浩之*² 熊谷 昌明*³[*Jpn J Cancer Chemother* 34(2):167-174, February, 2007]

Neuroblastoma Trial to Overcome a Rare Malignant Disease: Takashi Fukushima*¹, Hiroyuki Shichino*² and Masaaki Kumagai*³ (*¹Dept. of Pediatrics, Graduate School for Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, *²Dept. of Pediatrics, Nihon University School of Medicine, *³Division of Hematology, National Center for Child Health and Development)

Summary

Neuroblastoma is one of the main causes of children's deaths in Japan and many developed countries, although it is a rather rare pediatric cancer. Many clinical studies have been carried out and reported. The clinical study system of Japan is much different from the systems of the other countries. In Japan, the main hospitals, where clinical study including clinical trials have been conducted, are not only national centers but also many regional or prefectural centers. Progression-free survival has been achieved in over 80% of low-risk patients, and in about 40% of high-risk patients. These are the same as the outcomes of neuroblastoma patients in European countries and North America. Further clinical studies and translational research should be planned especially regarding high-risk neuroblastomas. **Key words:** Neuroblastoma, Risk factors, Dose density, Supportive care, **Corresponding author:** Takashi Fukushima, Department of Pediatrics, Graduate School for Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba-shi 305-8575, Japan

要旨 小児固形腫瘍の代表である神経芽腫は、希少疾患でもある。小児慢性特定疾患の制度に基づき、国内であればどの地域でも標準以上の診療を提供できるようにという課題を抱えながら研究実績を重ねてきた日本の経緯と、診療施設を集約化した欧米での経緯とでは、あまりにも土台が違う。しかし異なる背景を踏まえながら、お互いの成果を提供し合った結果、日本でも欧米でも低リスク群は80%以上、高リスク群は40%前後の無増悪生存率が達成された。今後の主な課題は高リスク群の治療成績向上である。集学的治療の強化と副作用の回避・軽減という一見相反する課題を同時に達成すべく、種々の工夫がなされている。

はじめに

小児がんはどの病型であっても希少疾患であるが、小児死亡率が十分に低くなった日本および欧米諸国のほとんどにおいて、小児の死亡原因として不慮の事故に次ぐ順位を占める。小児固形腫瘍のなかで、神経芽腫は脳腫瘍に次ぐ頻度である。この神経芽腫を克服するために引き継がれてきた工夫とその成果、今後の課題について述べる。

北米では7,000出生に対し1人の割合、すなわち10.4人/100万人/年の頻度とされる^{1,2)}。この頻度を日本に当

てはめると、マスキリングを施行しない場合の神経芽腫の発生数は年間180~200人程度と推測される。発症年齢、病期、発生部位、病理組織学的所見、分子医学的特徴などによって層別化されたなかの低リスク群は、すでに生存率80%以上を達成している。一方で、高リスク群は、化学療法・骨髄破壊的大量化学療法+自家造血幹細胞移植(救済)療法および支持療法の進歩および外科治療や放射線療法などの局所療法の工夫により治療成績の改善がみられるようになったものの、3年無増悪生存割合は20~40%台にとどまり、適切な治療方法の開発をめざして臨床研究が進行中である¹⁾。

*² 日本大学医学部・小児科*³ 国立成育医療センター・血液科

表 1 神経芽細胞腫国際病期分類 (International Neuroblastoma Staging System/INSS)

病期	定義
1	限局性腫瘍で、肉眼的に完全切除。組織学的な腫瘍残存は不問。同側のリンパ節に組織学的な転移を認めない。(原発腫瘍に接し、一緒に切除されたリンパ節転移はあってもよい)
2 A	限局性腫瘍で、肉眼的に不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認めない。
2 B	限局性腫瘍で、肉眼的に完全または不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認める。対側のリンパ節に転移を認めない。
3	切除不能の片側性腫瘍で、正中線 (対側椎体縁) を越えて浸潤。同側の局所リンパ節の転移は不問。または、片側発生の限局性腫瘍で対側リンパ節転移を認める。または、正中発生の腫瘍で椎体縁を越えた両側浸潤 (切除不能) か、両側リンパ節転移を認める。
4	いかなる原発腫瘍であるかに関わらず、遠隔リンパ節、及び/または、骨、骨髄、肝、皮膚、他の臓器に播種している。(4 S は除く)
4 S	限局性腫瘍 (病期 1, 2 A, 2 B) で、播種は皮膚、及び/または、肝、骨髄に限られる (1 歳未満の患者のみ)。骨髄中の腫瘍細胞は有核細胞の 10% 未満で、それ以上は病期 4 である。MIBG シンチが行われるならば骨髄への集積は陰性。

I. 神経芽腫の診断

発生部位や尿中カテコラミン排泄量の増加、血清 NSE 高値などから、臨床診断は困難ではないことが多いが、発症時の病理組織診断は必須である。HE 染色でロゼット形成や神経細線維の存在が確認される場合には比較的容易であるが、それ以外の場合には酵素抗体法やフローサイトメトリーによる抗原診断、または特定の腫瘍に特異性の高いキメラ遺伝子や高発現遺伝子を対象とした DNA/RNA 診断を用いて small round cell cancer の鑑別診断が可能になる場合もある³⁾。

II. 病期分類、およびその他のリスク因子

1990 年代以降、国際標準化の必要性から病期分類、病理分類に関してそれぞれ International Neuroblastoma Staging System (INSS, 1987, 1991 の国際会議で決定、表 1)^{4,5)}、International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)^{6,7)} の国際的合意が成立した。現在まで、日米欧いずれにおいても INSS 病期および INPC に基づく組織所見の他に、発症年齢、MYCN 増幅の有無、DNA index などいくつかの因子を基にリスク分類がなされてきた。最近の国際会議では、分子医学的所見を大幅に取り入れ、病理組織診断の役割を相対的に減じる方向で新たなリスク分類の検討がなされているという。

III. 治療の層別化

複数のリスク因子によって病期 1, 2 で、MYCN 増幅のないことなど、その他のリスク因子がない場合には低リスク群に分類される。すでにこの群の生存率は 80% 以上に達している。1960 年代以降使用されている James

療法⁸⁾は vincristine と cyclophosphamide との併用療法であり、現在でも低リスク神経芽腫に対する薬物療法の基本骨格である。

一方で病期 3 を主な対象とする中間リスク群には、低リスク群的な要素をもつ症例と、高リスク群的な要素をもつ症例とが混在して含まれ、将来は低リスク群かまたは高リスク群かのどちらかに分類可能かどうかを含めて検討が必要である。

乳児期の病期 4s を除く遠隔転移例、および MYCN の 10 倍 (または 4 倍) 以上増幅を伴う病期 3 (病期 2 まで含めるという意見もある) の例は、高リスク群に分類される。この群に対しては、多剤併用化学療法および自家造血幹細胞移植療法 (自家造血幹細胞救済療法) を主体として、外科治療、放射線療法などを併用した集学的治療が行われる。この際には、きめ細かな支持療法が必須である。むしろ中心であるといっても過言ではない。治療の内容またはフェーズにより、または施設により経験則的エビデンスに基づく方法が工夫されている。多施設共同臨床試験の場合を含め、推奨される支持療法のガイドラインを十分に踏まえる必要がある。

IV. 高リスク群神経芽腫に対する治療方針

全国的なマススクリーニング事業休止の後、病期進行例の増加が予想され、高リスク群の治療は最も重要なテーマである。診療上の骨格は下記のとおりである。病期 3, 4 の症例では初回の手術での病巣摘出は困難であり、むしろそれによる侵襲は後の治療継続にとって不利益をもたらすことが多く、診断目的の生検にとどめられる。この際、原発巣内でも複数の組織型が混在している可能性があり、その一部しか採取できないという要素を

表2 寛解導入レジメンと寛解導入率

研究名称	研究期間	n	寛解導入療法レジメン			寛解導入率 (%)	文献
POG-8104-A	1981~1984	70	day 1~7 day 8	CPA DXR	150 mg/m ² /day (po) 35 mg/m ²	21日ごと×5回	59 (35)
POG-8104-B	1981~1984	64	day 1 day 3	CDDP teniposide	90 mg/m ² 100 mg/m ²	21日ごと×5回	64 (35)
CCG 321 P 2	1985~1989	207	day 1 day 3 day 3, 6 day 4, 5	CDDP DXR VP-16 CPA	60 mg/m ² 30 mg/m ² 100 mg/m ² 900 mg/m ²	8日ごと×5~7回	76 (33)
POG-8742-1	1987~1991	111	day 1~5 day 2~4 day 22~28 day 29	CDDP VP-16 CPA DXR	40 mg/m ² 100 mg/m ² 150 mg/m ² /day (po) 35 mg/m ²	42日ごと×5回	77 (30)
POG-8742-2	1987~1991	115	day 1 day 2 day 3~10 day 11	CDDP VP-16 CPA DXR	90 mg/m ² 100 mg/m ² 150 mg/m ² /day (po) 35 mg/m ²	21日ごと×5回	93 (30)
CCG-3891	1991~1996	539	day 1 day 3 day 3, 6 day 4, 5	CDDP DXR VP-16 CPA	60 mg/m ² 30 mg/m ² 100 mg/m ² 900 mg/m ²	28日ごと×5回	78 (34)
JANB-85-A 1	1985~1990	301	day 1 day 1 day 3 day 5	VCR CPA THP-ADR CDDP	1.5 mg/m ² 1,200 mg/m ² 40 mg/m ² 90 mg/m ²	28日ごと×6回	93 (10)

CCG: Children's Cancer Group, JANB: 神経芽腫に対する厚生省がん研究助成金班研究, POG: Pediatric Oncology Group

はらんでいる。寛解導入療法としての化学療法を数コース行った後、局所療法として原発巣摘出術および放射線照射を組み合わせて行う。引き続き、強化した化学療法あるいは骨髄破壊の大量化学療法による地固め療法を行う^{1,9,10}。再発は以上の集学的治療終了直後から2年以内が多いが、その後も少数ながら4~5年にわたってみられる¹。局所療法の工夫によって原発巣周辺の再発は減少し、骨・骨髄が主な部位となっている。

1. 寛解導入化学療法

1960年代以降の数々の臨床研究¹¹⁻³⁰の結果を踏まえて、神経芽腫に対する寛解導入療法としては、cisplatin, トポイソメラーゼII阻害剤, アントラサイクリン系薬剤, vincristine, cyclophosphamideのうち3~5剤を組み合わせた併用療法が主体である。5~7回程度^{1,9,10}反復し、その間に外科手術や放射線治療を挟むことが多い。日本では厚生省がん研究助成金による班研究として進行神経芽腫に対する研究が行われており、1985年からの澤口重徳班研究(JANB-85研究)で提案されたA1レジメンはcyclophosphamide + vincristine + pirarubicin + cisplatinの4剤併用療法であり、このレジメンを28日ごとに6サイクル行って寛解導入療法とするものであ

る^{9,10,31,32}。それ以後、現在まで引き継がれている班研究(金子道夫班長)でも、上記レジメンの骨格を改変して使用している。一方で北米のChildren's Cancer Group (CCG)-3881研究ではcisplatin + doxorubicin + etoposide + cyclophosphamideの組み合わせによる多剤併用化学療法を行い³³、CCG-3891研究では3881のetoposideとcyclophosphamideとを増量して、さらにifosfamideを加えたレジメンを28日ごとに5サイクルを行った³⁴。代表的なレジメンを表2に示す。

CR, VGPR, PRを寛解と定義した場合の寛解導入率は、北米のPediatric Oncology Group (POG), CCGなどの研究では59~93%^{30,33-35}、ヨーロッパの共同研究European Neuroblastoma Study Group (ENSG)では68~96%³⁶であり、これらと比較して日本では澤口重徳班研究(JANB-85研究)で93%、1991年からの土田嘉昭班研究(JANB-91研究)で92%といずれも良好な寛解導入率である^{9,10,32}。寛解導入率をみると、1985年以降の複数の報告の奏効率に大きな差はない。それぞれの薬剤量は、臨床試験の世代が進むごとに増加傾向にあり、わが国のレジメン開発も同様に増量・強化の方向で進んできた。さらに、近年は化学療法のレジメンそのものの強

表 3 MEC (CEM) レジメンにおける各薬剤の用量比較

	金子班	PBSCT 研究会	CCG 3891	COG A 3973	GPOH (SIOP)
Melphalan	200 mg/m ² 2 days	180 mg/m ² 2 days	210 mg/m ² 2 days	210 mg/m ² 3 days	180 mg/m ²
Etoposide	500 mg/m ² 5 days	800 mg/m ² 4 days	640 mg/m ² 4 days	1,352 mg/m ² 4 days	1,200 mg/m ²
Carboplatin	1,500 mg/m ² 5 days	1,600 mg/m ² 4 days	1,000 mg/m ² 4 days	1,700 mg/m ² 4 days	1,500 mg/m ²

MEC 療法と一口に表現しても、用量には相当の開きがある。

度を上げるよりも、むしろレジメンを反復する間隔を可能な限り短縮して治療密度を上げることによって治療成績向上をめざすことに比重がおかれている。

この過程で、腎尿管障害や骨髄抑制の遷延と感染症の発生が増加の傾向にある³⁷⁾。また従来は目立たなかった急性心機能障害もクローズアップされる可能性がある³⁸⁾。これらのデータを基に、有効性と安全性のバランスのとれる用量が模索されている。

2. 大量化学療法と自家造血幹細胞移植（自家造血幹細胞救援）療法

高リスク神経芽腫に対する地固め療法として、骨髄破壊的大量化学療法の有効性は、近年行われた CCG による臨床研究^{33,34)}により確認された。以後の治療スケジュールでは、骨髄破壊的大量化学療法が地固め療法として国際的に採用されている。

骨髄破壊的大量化学療法レジメンとして最も多く使用されてきたのは melphalan+etoposide+carboplatin の組み合わせによる MEC (HiMEC) レジメン（北米では CEM レジメン）である。この他に検討されているのは cisplatin+melphalan+etoposide や busulfan+melphalan, thio-TEPA+melphalan, melphalan+etoposide+carboplatin+doxorubicin などである¹⁾。日本では金子班研究以来 MEC が提案されている^{9,10)}が、施設によってはそれ以外のレジメンも採用されている。また、同じ MEC (CEM) の組み合わせでも、non-TBI レジメンを採用している COG-A 3973 研究³⁹⁾や GPOH 研究⁴⁰⁾では etoposide の増量が行われている（表 3）。

一方、放射線照射が神経芽腫に対して高い治療効果を示すことはすでに明らかであり¹⁾、1980 年代以降、全身放射線照射 (TBI) を併用した骨髄破壊的大量化学療法による自家造血幹細胞救援療法の効果を確認するため、複数の臨床研究が行われた^{33,34,41)}。これらの臨床研究の結果、TBI を併用した大量化学療法レジメンの有効性が示唆されたものの、TBI による急性毒性に加えて、成長障害、内分泌障害、白内障、二次がんなどの晩期毒性も明らかにされ^{34,42)}、短期的な毒性としては、Matthay らの報告

で TBI 群では高度の腎障害は 18%、間質性肺炎が 10%、VOD が 9% にみられている^{34,42)}。TBI を受けた 16 例では 5 年後の身長が -2.0 SD であった⁴²⁾。このような毒性データから、近年は non-TBI レジメンによる骨髄破壊的大量化学療法+自家造血幹細胞救援療法を採用した治療が工夫されている^{39,40,43)}。

さらに自家造血幹細胞の確保についても工夫が必要な場合がある。一般的な末梢血幹細胞採取（骨髄抑制後の急速回復期にアフエレーシスを行う）では十分な細胞数を確保できない poor mobilizer が、特に広範な骨髄浸潤を伴って発症した高リスク例で時に経験される。このような場合には、自家骨髄に切り替えるか、G-CSF 単独投与による幹細胞動員とアフエレーシスによって十分な細胞数を獲得可能である⁴⁴⁾。

3. 外科療法

寛解導入療法期間内のどの時期に施行するか、腫瘍をどの程度切除（郭清）するかという二つの課題がある。

外科療法の施行時期については、有効な化学療法が発見される前は診断後速やかに手術が行われていたが、現在では delayed primary surgery が一般的である。すなわち、診断時の進行神経芽腫は周辺への浸潤や遠隔転移があり、完全摘出をめざす意義は乏しく、生検のみ行うべきであるという点については意見が一致している。しかし原発巣摘出術の最適な時期についての統一見解はなく、3~5 コースの間に施行されることが多い。

一方、腫瘍の切除に際して gross total resection (GTR)/complete resection をあくまでもめざすのか、それとも周囲臓器の侵襲を少なくし、それ以後の化学療法または放射線療法の早期開始を優先するために、血管周囲などの少量の遺残腫瘍は許容してもよい (partial resection: PR) かという議論がある。GTR 群のほうが生存率が優れているとする報告⁴⁵⁻⁴⁸⁾、GTR でも PR でも生存率に差を認めないとする報告⁴⁹⁻⁵⁴⁾とがありまだ結論をみていない。寛解導入化学療法の強化、骨髄破壊的大量化学療法の強化および局所放射線療法の徹底などによる集学的治療を強化することによって、delayed pri-

mary surgery 後の遺残腫瘍量は結果的に少なく、むしろ周囲臓器の侵襲を最小限にすることが全体の治療成績向上に貢献するという仮説を検証する必要があると考えられる。

4. 局所放射線療法

進行神経芽腫に対しては、腫瘍巣に対する術後照射と骨転移部への放射線治療 15~30 Gy を採用することにより局所制御率が高まった⁵¹⁾。

1980年代、大量化学療法を用いない旧来の治療法では、POG staging system C (1歳以上の予後不良群)の化学療法後の手術とその3週間以内の術後照射(1歳以上2歳までは24 Gy/3週間, 2歳以上は30 Gy/3~4週間)を行うことにより、明らかに予後が改善した⁵⁵⁾。

1990年代に大量化学療法を用いるようになると、術後残存腫瘍および骨転移部へ10 Gy/5分割照射を行い、その後の骨髄移植を前提としたTBI(12 Gy/6分割)を行うことにより予後がさらに改善された⁵⁶⁾。初診時の腫瘍巣を術後照射野とする術後照射20 Gy以上では局所再発率が10%であった⁵⁷⁾。また、術後照射10 Gyのみでは局所再発率が52%と高く、TBIを10 Gy加えることにより局所再発率が22%と下がることも明らかとなった⁵⁸⁾。

大量化学療法への影響を避けるため、放射線治療は自家造血幹細胞移植療法後に行われることが多い。アメリカのCOG研究では、照射野として化学療法により縮小した腫瘍巣をGTVとし、腫瘍巣に1 cm マージンを設け、また初診時のリンパ節転移巣には頭尾側1.5 cm、側方1 cm マージンを設けたCTV、さらに0.5 cm マージンを設けたPTVにて21 Gy/14分割(肉眼的残存腫瘍には9 Gyブースト照射)を行っている。13-*cis*-retinoic acidによる維持療法を行うと、2年期待局所再発率を7%に抑えることができた⁵⁸⁾。

化学療法を手術直後から実施でき、腫瘍巣にのみ照射することが可能な術中照射では、電子線エネルギー6 MeV 10~12 Gyにて顕微鏡的残存腫瘍は制御されている^{59,60)}。

骨転移巣に対しては、TBI 10 Gyでは転移局所再発率が31%と高いため⁶¹⁾、転移局所へ多分割照射21 Gy/14分割/7日間を行うことで局所再発率を7.7%と下げることが可能となった⁵⁷⁾。

5. 後治療

CCG-3891研究によって、大量化学療法終了後に後治療として13-*cis*-retinoic acidを内服させる無作為割付第III相臨床試験を行い、1歳以上のstage 4の生存率を約10%向上したと報告されている³⁴⁾が、その後の追跡調査結果の報告が待たれる。

V. 日本における高リスク群神経芽腫に対する班研究の成果

厚生省(後の厚生労働省)の研究助成による班研究として1985年澤口重徳班, 1991年土田嘉昭班, 1998年金子道夫班と受け継がれてきた。これらは臨床試験というより臨床実践的な体制で継続されてきたため、海外の臨床試験の成績と単純には比較できないが、以下にその概要をまとめた。

85年研究(JANB 85)では、A1レジメンとしてcyclophosphamide 1,200 mg/m², vincristine 1.5 mg/m², pirarubicin 40 mg/m², cisplatin 90 mg/m²を提案した。日本小児外科学会分類のstage III, IVにA1療法を行い、寛解導入率は93%, stage IIIの4年生存率75%, stage IVの4年生存率39%と、当時の海外からの報告を大きく上回った³¹⁾。2004年に金子が報告した85年研究の成績では、stage 3の5年 progression free survival (PFS)は75%, stage 4の5年 PFSは32%であった。一部の症例には、TBI併用自家造血幹細胞移植が併用され、その5年生存率は45.6%であった⁶²⁾。

91年研究(JANB 91)では、cyclophosphamideを1,200 mg/m²×2に、またcisplatinを25 mg/m²×5に増量、vincristineの代わりにetoposide 100mg/m²×5に変更し、pirarubicin 40 mg/m²は引き続き採用したA3レジメンを提示した。またA1療法のvincristineをetoposide 100mg/m²×5に変更したものをnew A1 (91A1)レジメンとした。その結果、寛解導入率は92%と好成績であった^{9,10)}。またMYCN増幅例の5年 event free survival (EFS)は、85年研究のA1療法では23.2%であったが、91年研究ではA3療法を行った群では49.0%, new A1療法+自家造血幹細胞移植療法群では37.0%, new A1+非自家造血幹細胞移植療法群は47.0%と改善した^{9,10)}。しかし、MYCN非増幅例の5年EFSは、85年研究では33.3%, 91年研究でも32.2%と改善はみられなかった。また91年研究ではetoposide関連と考えられる二次性白血病/骨髄異形成症候群が発生した¹⁰⁾。

1998年から現在まで行われてきた98年研究では、以下の諸点に変更された。すなわち、1) INSSの病期分類を採用し、2) リスク群を①MYCN非増幅のstage 3, ②MYCN増幅のstage 3およびMYCN非増幅のstage 4 (moderately poor risk group), ③MYCN増幅のstage 4 (extremely poor risk group)の3群に分けて治療を層別化し、3) 91年研究で採用したetoposideをvincristineに戻した。98年研究の治療成績については現在追跡、集計作業が進行中である。

表 4 1 コースに使用される薬剤の用量の推移 (日米比較)

	1985～		1991～		最新	
	CCG-321 P2	JANB 85	CCG-3891	JANB 91*	COG-A 3973+	JANB 98*
CDDP	60×1 day	90×1 day	60×1 day	25×5 days	50×4 days	25×5 days
CPA	900×2 days	1,200×1 day	900×2 days	1,200×2 days	2,100×2 days	1,200×2 days
DXR/THP**	30×1 day	40×1 day	30×1 day	40×1 day	25×3 days	40×1 day
VP-16	100×2 days	—	100×2 days	100×5 days	200×3 days	—
VCR	—	1.5×1 day	—	—	0.67×3 days	1.5×1 day

*: いずれも A 3 レジメンの用量, **: THP は JANB のみで使用, 薬剤用量の単位はいずれも mg/m², +: VCR+DXR+CPA 療法と CDDP+VP-16 療法を 3 週ごとに交互投与する。他のレジメンはすべて 28 日ごと。

VI. 高リスク群における治療毒性と支持療法

85 年研究 (澤口班) 157 例の有害事象は, 白血球数が 500/mm³未満に達した例が 52 例 (33%), 血小板輸血を要した例が 105 例 (67%), 軽度の出血性膀胱炎および血尿を来した例が 102 例 (65%), 40 mL/分/m²未満のクレアチニンクリアランスの低下を認めた例が 33 例 (21%), 心電図変化 9 例 (6%), 聴覚障害 2 例 (1%) であった⁶³⁾。

98 年研究の中間報告では, A 3 レジメンの安全性に関する二つの留意点が提起された⁶⁴⁾。一つは 1 コース目の化学療法前後の治療関連死亡で, これは最新の集計によると 168 例中 5 例 (3.0%) であった^{62,64)}。うち 2 例は RS ウイルス感染症が死亡原因で, 化学療法に伴う免疫抑制と因果関係は否定できないものの, 2 例とも治療開始時に呼吸器症状がみられていた。残りの 3 例は, がん性胸膜炎による胸水貯留, アスペルギルス肺炎, DIC の合併による死亡が 1 例, 敗血症性ショック 1 例, 頭蓋内出血 1 例であった^{62,64)}。また, これ以外の治療関連死亡は第 5 コース後の敗血症 1 例のみであった。第 1 コース中の重篤な治療関連毒性対策として, RS ウイルス感染症など小児が日常的に罹患する偶発症を含めて, 総合小児医学的対応をさらに徹底することが必要である。

もう一つの問題点は腎障害であり, クレアチニンクリアランス 70 mL/分/1.73 m²未満となった症例は全体の 30% に上った。腎障害による死亡例はみられなかったが, 7 例がその後の化学療法を減量した⁶²⁾。

腎障害に関しては, cisplatin の用量との関連が示唆される。日米の過去 3 世代の臨床試験において, 寛解導入療法に用いられる各薬剤の用量設定の推移を表 4 に示す。過去二つの試験において, 概して日本のレジメンのほうが高用量であり, 特に cisplatin が高用量であることが目立つ。一方, 最新の COG-A 3973 と JANB 98 A 3 の比較では, 1 レジメンの用量は COG-A 3973 がすべて上回っている。ただし, 総投与量および用量強度で比較すると, cisplatin のみ JANB 98 が約 1.5 倍多いことがわかる。1 レジメンにおける投与量や全コースを通じた総

投与量以外にも, 投与方法 (1 レジメンにおける用量を 1 日で投与するのか 5 日間に分けるのか), レジメンごとの間隔 (投与密度), 腎庇護のための補助療法, 薬物代謝酵素活性の個人差・民族差など複数の因子が関与しているものと考えられ, 今後の課題の一つである。

化学療法レジメンの反復間隔を可能な限り短縮 (治療密度を高める) して治療成績の向上をめざす方針を今後採用することにより, 従来は目立たなかった治療毒性が出現したり, われわれの経験した以上に合併症が重篤化する危険もある。この治療密度を高めるプロトコールは, 今後の臨床試験で検証されるべきものであるが, 呼吸循環補助療法, 血液浄化療法, (準)無菌室対応などの支持療法をいつでも導入できる体制を整えておくことが必要であると考えられる。

VII. 日本神経芽腫スタディグループ (JNBSG) の発足

従来は, 班研究および国内地域ごとのグループによる臨床研究が主体であったが, 神経芽腫臨床研究を組織立って継続・発展させるために, 2006 年 5 月に日本神経芽腫スタディグループ (JNBSG) が全国組織として発足した。中央病理診断・分子医学的診断システム, 検体センター (千葉県がんセンター研究所および国立成育医療センター研究所), データセンター兼コントロールセンター (国立がんセンター中央病院小児がんデータセンター), 各専門委員会などを備え, 共通の基盤に立った臨床研究およびトランスレーショナルリサーチを合理的・能率的に支援・推進し, 神経芽腫の病態解明および治療法開発を通して社会貢献することを目的としている。初代会長として, 金子道夫 (筑波大学小児外科) が 2006 年 5 月に選出され, 事務局は福島敬 (筑波大学小児科, 電話 029-853-3219, FAX 029-853-3214, tksfksm@md.tsu-kuba.ac.jp) が担当している。

謝辞 ご校閲いただきました筑波大学大学院人間総合科学研究科小児外科学金子道夫教授に深謝いたします。