

できる症例も多く認められる。

このほか、Shimada分類に基づく組織型、がん遺伝子MYCN増幅の有無、DNA diploidyなどが生物学的悪性度を反映する重要な予後因子であり、わが国では一般に、年齢、病期、MYCN増幅の有無などにより悪性度を判定し、治療の選択を行っている。

治療成績は1歳未満の神経芽腫では大多数の例で悪性度は低く、摘出術±化学療法で95%を超える5年生存率が得られている<sup>1)</sup>。

したがって、治療は腫瘍の圧迫による呼吸障害や、肝・腎などの臓器障害の回避を優先する。抗腫瘍療法は最小限で奏効することが多く、とくに、臓器や大血管の合併切除を行うような手術は厳に慎むべきである。ただし乳児期の神経芽腫でも、骨や遠隔リンパ節への転移を伴う症例や2～3%のMYCN増幅例では、進行神経芽腫に準じた強力な治療が必要となる。

一方、1歳以上の進行症例の治療成績は依然、5年生存率で30%を上回る程度である(表2)<sup>1)</sup>。1歳以降では、診断時にすでに腫瘍が切除不能と判断される症例や、骨、リンパ節に遠隔転移を認める症例が75%を超え、MYCN増幅例も30%に認められる。これらの腫瘍では手術、化学療法、放射線療法、造血幹細胞移植などを組み合わせた積極的な治療が行われるが、上記のように、治療成績はいまだ不良であり、有効な新規治療法の開発が待たれている。

### 腎芽腫 (Wilms 腫瘍)

腎芽腫は小児期の代表的な悪性腎腫瘍で、胎生期の後腎芽細胞 (metanephrogenic blastema) から発生すると考えられている。米国では、年間500人の新たな患者の発生があり、100万人に7.9人の頻度で小児腫瘍の6.3%を占めるとされるが<sup>2)</sup>、わが国の年間登録数は数十例程度である。腎芽腫の75%は3歳までに発症し、同時性両側性の症例が5%の頻度で、また家族内発症例も1%に認められる。無症状の腹部腫瘤として発見される場合が多いが、血尿や腫瘍破裂に伴う腹痛などを主訴に診断されることもある(図3)。

腎芽腫には5～12%の頻度で無虹彩症、片側肥大、停留精巣、尿道下裂などの先天奇形を合

表2 神経芽腫の治療成績

年齢	病期 (INSS)	5年生存率
≦1歳	1, 2, 3, 4S	95%以上
	4	70%
	any stage; MYCN増幅あり	40%
≧1歳	1, 2	95%以上
	3	75%
	4	30%

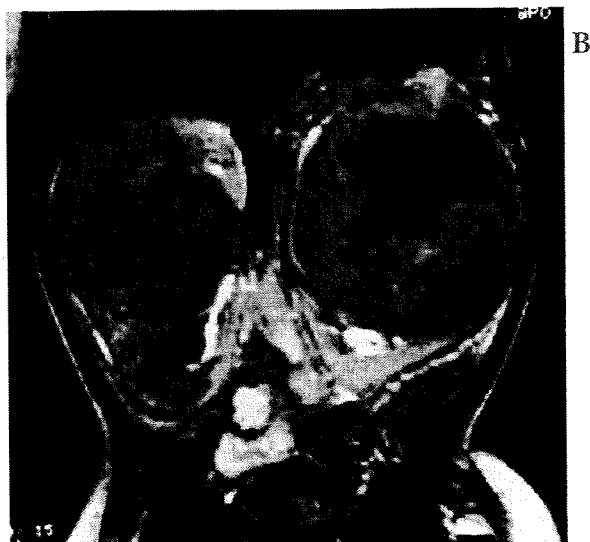
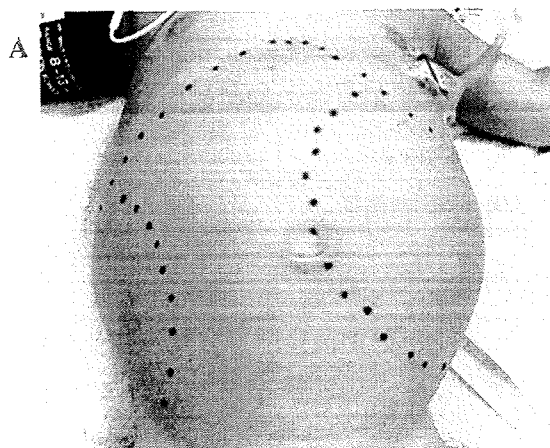


図3 両側腎芽腫  
A：腹部所見、B：腹部MR像

併する(表3)。とくに腎芽腫に無虹彩, 泌尿生殖器奇形, 精神発達遅延を合併したものをWAGR症候群, 腎疾患, 生殖器奇形を合併したものをDenys-Drash症候群という。

一方, 身体の一部の過成長や肥大を伴う症候群と腎芽腫との関連も知られており, Beckwith-Wiedemann症候群では腎芽腫のほか, 肝芽腫, 横紋筋肉腫, 副腎皮質腫瘍などの発生をみることがある。

WAGR症候群では, 11番染色体短腕13領域(11p13)に欠失のあることが知られていたが, 1990年, 11p13に位置するがん抑制遺伝子WT-1が単離された<sup>3)</sup>。WT-1は, 腎および泌尿生殖器の分化に関連する転写調節因子で, WAGR症候群のほか, Denys-Drash症候群および一部の腎芽腫の原因遺伝子と考えられている。一方, Beckwith-Wiedemann症候群にみられる染色体異常は11p15.5の異常であり, この部位に, 第二の腎芽腫原因遺伝子WT-2の存在が想定されている。WT-2の有力な候補であるIGF2遺伝子は, 一部の腎芽腫で過剰発現が観察されており, その過剰発現が臓器の過成長や肥大, また腎芽腫の発生原因になると考えられている。

腎芽腫の前がん病変と考えられているnephrogenic rests, あるいは腎芽腫症(nephroblastomatosis)は, 正常腎組織内における後腎芽細胞の遺残で, 腎芽腫の30~40%に認められ, 新生児の剖検例でも1%の頻度で観察される。この

病変は, 腎内の存在部位によりintralobar nephrogenic rests (ILNR) とperilobar nephrogenic rests (PLNR) に分類される。

わが国における腎芽腫の治療は, 一般に米国のグループ研究National Wilms Tumor Study (NWTS) の治療プロトコールに従って行われることが多い。すなわち組織型がfavorable histologyで病期がI, IIであれば, 腫瘍摘出後にactinomycin D (AMD) とvincristine (VCR) による化学療法を行う。一方, III, IVでは腫瘍摘出後にAMD, VCR, adriamycin (ADR) の3剤併用療法と放射線療法を行う。さらに, 病期Vの同時性両側性の腎芽腫では, 腎機能を可及的に温存する治療戦略が選択される。現在, 腎芽腫全体の生存率は90%を超えるともいわれており<sup>4)</sup>, 晩期障害を回避すべく, 縮小治療の開発研究が行われている。しかし腎芽腫は, 肺や局所に転移再発することもまれでなく, 治療終了後も慎重に経過観察する必要がある。

## 小児肝がん

小児期の原発性肝腫瘍は, 小児腫瘍全体の0.5~2%で, 良性および悪性の上皮性腫瘍と間葉系腫瘍が含まれる<sup>5)</sup>。悪性腫瘍は肝腫瘍全体の55~65%で, その90%が肝芽腫または肝細胞がん(成人型肝がん)である<sup>6)</sup>。鑑別すべきその他の腫瘍にはfibrolamellar carcinoma, 未分化肉腫, 胆道原発の横紋筋肉腫などに加え, 卵黄

表3 腎芽腫の先天異常と原因遺伝子

過成長	症候群・症状・前がん病変	原因遺伝子	遺伝子座	遺伝子のはたらき
なし	WAGR症候群 Denys-Drash症候群 intralobar nephrogenic rests (ILNR)	がん抑制遺伝子WT-1	11p13	腎・泌尿生殖器の分化 転写調節
あり	Beckwith-Wiedemann症候群 片側肥大 Perlman症候群 perilobar nephrogenic rests (PLNR)	WT-2?	11p15.5	

表4 小児肝腫瘍の好発年齢

乳幼児期 (~5歳)	肝芽腫 横紋筋肉腫 乳児血管肉腫 間葉性過誤腫
学童期以降 (6歳~)	肝細胞がん 未分化肉腫

嚢腫瘍、絨毛がん、転移性肝腫瘍（神経芽腫など）などがある。

一方、良性腫瘍の大部分は血管腫で、ほかに間葉性過誤腫など小児に特異な腫瘍がある。それぞれの腫瘍には好発年齢があるので、鑑別診断の際には患児の年齢を参考とする（表4）。

### 1. 肝芽腫

肝芽腫の45%は1歳前に、また80%は4歳未満で発症し男児にやや多い<sup>6)</sup>。多くは散発例であるが、数%に Beckwith-Wiedemann 症候群、片側肥大、家族性大腸ポリポーシス、18トリソミーなどを伴う。また、低出生体重児においても高率に肝芽腫が発生することが知られている<sup>7)</sup>。

肝芽腫では $\beta$ -カテニン遺伝子の異常が認められ、腫瘍発生への関与が示唆されている。 $\beta$ -カテニン蛋白は、家族性大腸ポリポーシス症で異常のみられる adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子産物により分解されるため、 $\beta$ -カテニンや APC に異常がある場合、 $\beta$ -カテニンが分解されずに細胞内に蓄積し、 $\beta$ -カテニンの転写活性が亢進し、肝細胞ががん化すると仮説されている。

初発症状は腹部腫瘤、腹痛、発熱などで、食思不振、体重減少、貧血などの症状もみられる。画像検査は腫瘍の性状、局在診断、切除可能性などの評価を目的に腹部超音波検査、CT、MRIなどが行われる。また肺、腹部リンパ節、骨などへの転移の有無を検索する目的でCT、骨シンチが必要である。腹部単純X線検査では石灰化がみられることもある。肝芽腫は通常、肝内

の単発性腫瘍として発生するが、20%の症例では、多発性またはびまん性の浸潤形態を示し、転移は肺に多い。組織学的には高分化型（胎児型, fetal type）、低分化型（胎芽型, embryonal type）、未熟型などに分類され、とくに胎児型の亜型である純高分化型（pure fetal type）の予後は良好である。

肝芽腫では、血中の $\alpha$ -フェトプロテイン（AFP）がほぼ全例で高値を示すため、腫瘍マーカーとして用いられる。性早熟を伴う症例では血中の $\beta$ -hCGが高値を示す。血小板増多や高コレステロール血症もしばしばみられ、骨粗鬆症を合併することもある。

治療は外科的切除の役割が大きく、切除の可否が重要な予後因子である。原発巣を一期的または二期的に切除し、同時に cisplatin (CDDP) や THP-adriamycin などによる化学療法を行う。原発巣が切除不能な症例や、診断時に遠隔転移を伴う症例では、化学療法を優先し、腫瘍の縮小を待って切除を行う。肺転移巣も化学療法と切除によりコントロールが可能である。腫瘍が肝に限局し、かつ、切除不能な症例に対しては肝移植の適応が検討される。

わが国では、一期的切除が可能な症例では95%以上の生存率が得られ、化学療法が先行される進行例では39~74%の治療成績である<sup>8)</sup>。

### 2. 肝細胞がん（成人型肝がん）

肝細胞がん（成人型肝がん）は、小児肝悪性腫瘍の10~30%を占め、肝芽腫に次いで多い。男児に多く、好発年齢は学童期以降である。

肝細胞がんはチロシン血症、胆道閉鎖症、新生児肝炎、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン欠損症などの慢性肝疾患からも発生する。長期間の中心静脈栄養に起因する肝硬変や、B型肝炎ウイルス感染も肝細胞がんの発生原因である。

初発症状は肝芽腫と同様、腹痛や腹部腫瘤で、発熱、体重減少、黄疸のほか、腫瘍破裂による出血性ショックを呈することもある。血清の

AFPは50～80%の症例で高値を示す。また肝細胞がんでは、satellite lesionや門脈内浸潤の頻度が高いこともその特徴である。

肝細胞がんは化学療法に対する反応性が乏しく、したがって、切除不能例の予後は不良である<sup>9)</sup>。完全切除が可能な症例は10～20%程度で、切除不能例では2年以内に死亡する例が多い。

### 腹部固形腫瘍を見逃さないために

神経芽腫、腎芽腫、肝芽腫などの腹部固形腫瘍は固い腫瘤として触知され、同時に腹部の膨隆を認めることが多い。日頃から胸部の聴打診とともに、丹念に腹部所見をとる習慣を身につけることが、これらの腫瘍に代表される腹部の腫瘍性病変を見逃さないために、きわめて重要である。

また、触診により腹部の固形腫瘍を疑った際には、腹部の超音波検査が第一選択である。超音波検査により腹部腫瘤の存在を確認したら、速やかに腹部の画像診断や腫瘍マーカーの検索を行える施設に、患児を紹介または転送する。これらの施設において、本稿で述べた腫瘍の存在が診断されたら、小児がんの治療のできる施設において治療が行われるべきである。

### 文 献

1) Ikeda H, Iehara T, Tsuchida Y et al.: Experience with International Neuroblastoma Staging System and Pathology Classification. *Br J Cancer* 86:1110-1116, 2002

2) Bernstein L, Linet M, Smith MA et al.: Renal tumors. In: *Cancer Incidence and Survival among*

*Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. National Cancer Institute Publication, 79-90, 1999

- 3) Call KM, Glaser T, Ito CY et al.: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60: 509-520, 1990
- 4) D'Angio GJ: The National Wilms Tumor Study: A 40 year perspective. *Lifetime Data Anal* 13: 463-470, 2007
- 5) Stocker JT, Husain AN, Dehner LP et al.: Hepatic neoplasms. In: Stocker JT, Dehner LP (eds.): *Pediatric Pathology* (2nd ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 752-795, 2001
- 6) Ikeda H, Matsunaga T, Tsuchida Y et al.: In: Vöute PA, Barrett A, Stevens MCG, Caron HN (eds.): *Cancer in Children* (5th ed.), Oxford University Press, Oxford, 370-383, 2005
- 7) Ikeda H, Matsuyama S, Tanimura M: Association between hepatoblastoma and very low birth weight: A trend or a chance? *J Pediatr* 130:557-560, 1997
- 8) Sasaki F, Matsunaga T, Iwafuchi M et al.: Outcome of hepatoblastoma treated with the JPLT-1 (Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor Protocol-1): A report from the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor. *J Pediatr Surg* 37: 851-856, 2002
- 9) Katzenstein HM, Krailo MD, Malogolowkin MH et al.: Hepatocellular carcinoma in children and adolescents: Results from the Pediatric Oncology Group and the Children's Cancer Group intergroup study. *J Clin Oncol* 20:2789-2797, 2002

### 著者連絡先

〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷 2-1-50  
獨協医科大学越谷病院小児外科  
池田 均

## ■ 特集 小児がん治療の晩期障害と対策

# 進行神経芽腫の両腎温存手術

金子道夫\* 平井みさ子 大川治夫 澤口重徳

### はじめに

神経芽腫の治療は、限局性腫瘍には手術が、転移性腫瘍には化学療法で原発巣・転移巣、とくに後者をコントロール後に腫瘍全摘とリンパ節郭清が行われ、施設によりその後放射線治療や幹細胞移植を伴った抗癌剤大量療法が行われている。わが国では限局性腫瘍であっても遺残腫瘍がある場合には化学療法が行われてきたが、最近の欧米での限局性腫瘍に対する治療方針は多少の遺残腫瘍があっても手術のみで90%以上の長期生存が得られており、手術のみで十分であると報告されている。局所進展例で手術困難症例では手術時期を遅らせた delayed surgery が定着した。手術術式は原発腫瘍を全摘し、リンパ節転移に対しては腸骨動脈から横隔膜脚までの系統的リンパ節切除を行う radical surgery が主流である。しかし、筑波大学では1985年の厚生省班研究が開始されて以来、術後直ちに化学療法を開始できるよう系統的リンパ節切除を避け、両腎を温存し、可能な限り術中照射を併用する術式を行ってきた<sup>1)</sup>。それまでは骨転移のある症例の予後は絶対不良であったが、その後生存例が得られたことより、長期障害を回避する観点からも有用な方法であると考えている。これらの成績を述べつつ、現時点での神経芽腫治療の問題点、とくに外科治療の問題点とこれからの解決法について述べる。

### I. 進行症例に対する患側腎温存手術 —筑波大学の経験

腹部原発の進行神経芽腫は原発巣とリンパ節が

一塊となり腹部大動脈とその主要分岐を取り巻くように進展し、全摘はきわめて困難である。いわゆる「癌の根治手術」は不可能である。化学療法により腫瘍が縮小すると、副腎原発例では原発腫瘍がリンパ節転移とある程度離れ、原発巣は全摘可能となることも少なくない。しかし、後腹膜原発腫瘍は通常転移リンパ節と一塊となり、縮小後も原発腫瘍の同定が困難である。術前化学療法により、易出血性であった腫瘍は硬化して出血は少なくなるが非常に硬くなり、脈管からの剥離は難しく、自律神経やリンパ管とともに血管の外膜層で剥離するのが最も容易で、腫瘍の「全摘」に近い手術が可能である。現在、わが国でも欧米でもこのような手術が行われている。しかし、それでも全摘は困難な症例があり、また、「全摘」してもいわゆる癌の根治的手術とはいえず、またそのような手術では術後の短期的・長期的障害も多くなる。

筑波大学では1985年から厚生省班研究プロトコルに従って化学療法を行い、ほとんどすべての症例で初期治療6クールを終了してから手術を行っている。当時、術前化学療法で切除可能と外科医が判定した時期が手術時期とされ、通常3クール後くらいに摘出術が行われていた。筑波大学では次第に手術時期が遅くなる傾向が顕著であった。手術法は原発巣は全摘、リンパ節は主要な血管を損傷しないようにしてなるべく切除し(図1)、切除後術中照射を併用した。1990年頃からは大きいリンパ節をサンプリングするにとどめた。全例で患側腎の温存をはかり、とくに腎血管や腎門部のリンパ節転移は細心の注意を払って腎の温存に努めた。

\* 筑波大学臨床医学系小児外科  
〔〒305-8575 つくば市天王台1-1-1〕

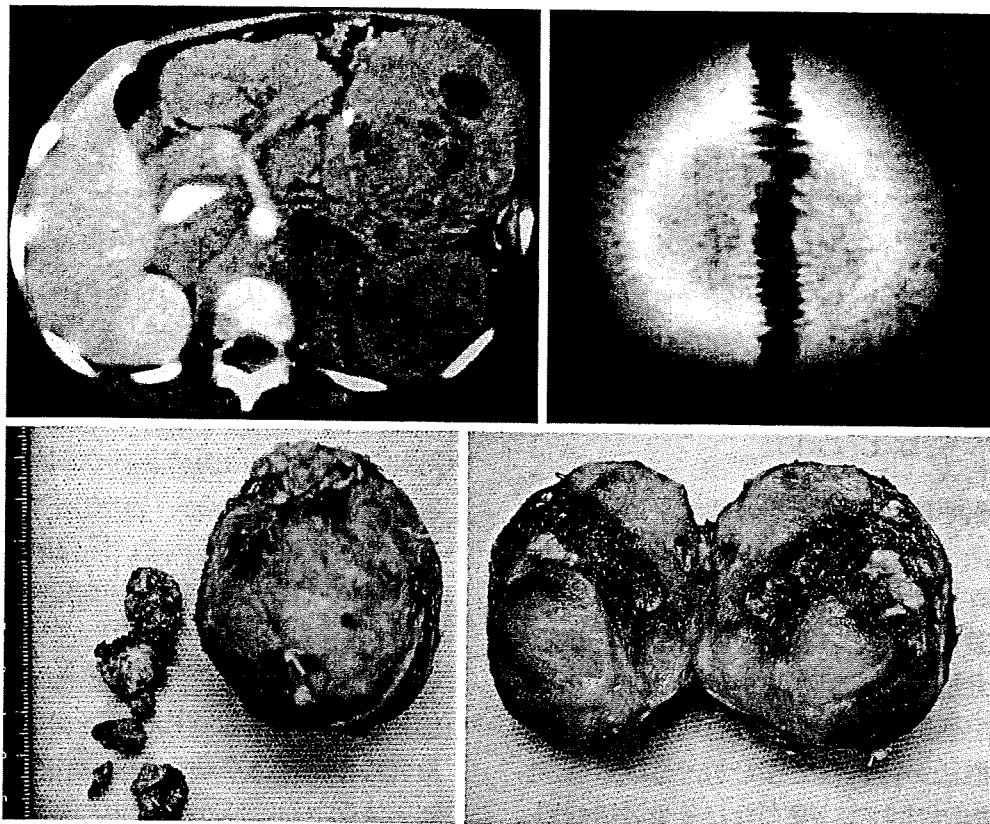


図 1 5歳の腹部原発進行神経芽腫

腹部は多数の腫瘍で占められていた。頭蓋転移も非常に高度であった。初期治療で縮小し、摘出標本はほとんどが神経節腫となった原発巣と1.5 cm以上のリンパ節が3個、それ以下が2個。この患者はその後骨転移再発と照射野外の再発がみられた。

## 1. 手術成績

2005年までに厚生労働省班研究プロトコールで治療が開始され、3年以上経過した腹部原発手術症例は22例であった。腎は2例で腫瘍による水腎症がみられた。また、1例は患側腎全体に瀰漫性に腫瘍浸潤があり、当初非ホジキンリンパ腫と診断された例では手術時患側腎が全く無機能であったので、当初から腎は合併切除する方針とした。スケジュールの関係で術中照射を施行できなかった2例では、リンパ節切除が他の例より広範に施行された。術中照射は1980年代では15 Gy、以後1995年までは12 Gy、それ以後は10 Gyと減少した。手術もこの20年間に变化しており、初期の症例では腎動静脈や腎下部大動脈にかなりの剝離操作を行ったが、1990年以降は1.5~2 cm以上のリンパ節のみ切除、それがない場合には画像で中心的に存在した部位の組織を生検するのみとした。照射野は術前画像診断により「腫瘍床」

に照射し、腎門部にも照射するため一部腎組織に照射される症例もあった。しかし、横隔膜脚より上方は肝臓があるため、技術的制約があり、腫瘍があった部位であっても照射野から外れる症例もあった。術後照射は1987年1月に手術を行い、病期4の最初の生存例となった1例で行ったのみである。

## 2. 治療結果

*N-myc* 遺伝子増幅例の多くは治療に良く反応したが、2例で初期治療5および6クールで局所、および転移巣ともに再燃し手術に至らなかった。腹部原発で手術に至った症例は22例であった。術中照射を行わなかった2例のうち1例で、術後1年以上にわたり腸管運動異常が持続し、術後化学療法中に腸管からの bacterial translocation と考えられる敗血症をきたした。2 cm以上の大きなリンパ節が上腸間膜動脈を取り囲んで摘出困難であった2例で、骨転移などが遠隔再発し

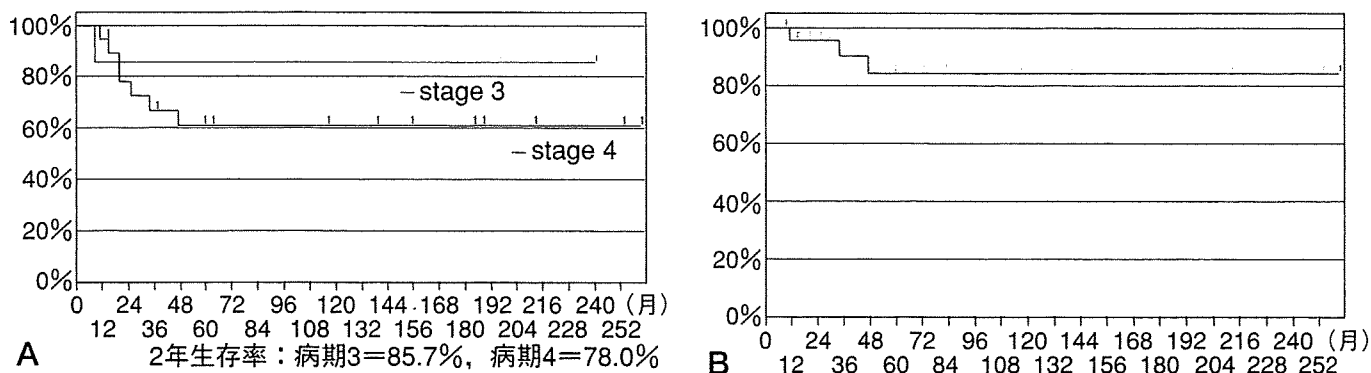


図 2 A. 筑波大学の進行神経芽腫の治療成績 (1986~2005 年), B. 局所コントロール率  
非常に満足すべき結果といえよう。この集計後 1 例が照射野外再発をきたした。

たときに残存リンパ節の増大がみられた。また、照射野外上方から腫瘍が再発し、その後手術野まで進展した症例が 2 例みられた。遺残リンパ節増大 2 例と照射野外からの進展 2 例の計 4 例で「局所再発」が認められた。術後 2 年以上の観察で腫瘍死は 6 例、stage 4 の 5 年生存率 70%、10 年生存率が 61%であった (図 2)。「局所再発」が死亡の原因となった症例はなかった。2 例の腸閉塞を除き合併症、後障害を認めていない。

### 3. 腎温存の結果

腫瘍の広範な腎進展で術前無機能となった 1 例を除き、全例で両側腎温存手術が行われた。水腎症 2 例のうち 1 例において術後 4 年で腎盂尿管移行部狭窄による水腎症の悪化がみられ、腎杯尿管吻合術を施行した。主に CDDP によると考えられる治療中のクレアチニンクリアランスの低下が多くの症例でみられ、造血幹細胞移植などでの抗癌剤投与量を調節した症例が認められたが、腎機能障害による治療の中止症例はみられなかった。ただし、生存例のほとんどで  $\beta_2$  ミクログロブリンの異常が現在も認められるが、これは手術の影響ではなく、抗癌化学療法のためと考えられる。術中照射による椎体、脊髄の障害は術後照射を併用した 1 例を除いてみられなかった。分腎機能についての検討は一部の症例以外に行われておらず、今後の重要課題と考えられる。

病期 4 での筑波大学生存第 1 例は腎機能の観点から示唆に富むので報告したい。

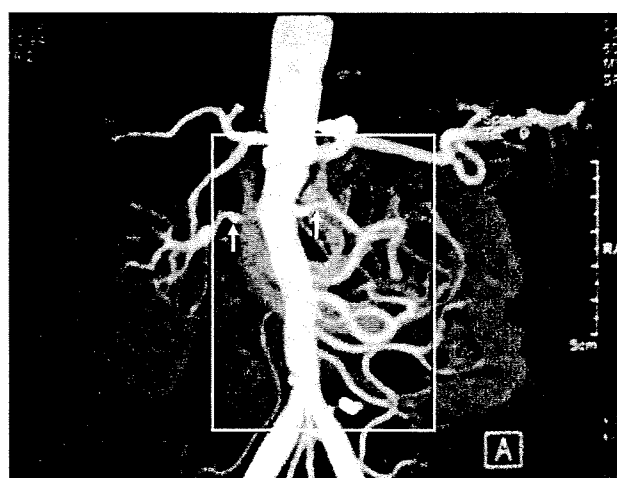


図 3 長期生存第 1 例目の治療後 19 年後  
四角い枠は照射野で、腹部大動脈に發育不全がみられ、右腎動脈は高度の狭窄になっている。左腎動脈は全長にわたって細い。左腎は水腎症で、実質が薄くなっている。

### 症 例

4 歳 1 カ月、女児

左後腹膜原発病期 4 で、腫瘍による左水腎症が明らかであった。85A16 クール終了後、治療開始後 6 カ月で、腫瘍切除が行われた。腫瘍は 45×35×23 cm で、腫瘍床に対し術中照射 12 cm×6 cm の照射野に 15 Gy 施行した。術後 6 日目より、腫瘍床、傍大動脈、腎門部の椎骨レベルで Th<sub>11</sub>~L<sub>4</sub> に対し、6MeV の X 線 1 回 1.8 Gy、総線量 14.4 Gy の外部照射を施行した。術後化学療法 (85A2 および 85C) を 5 クール施行後、帯状疱疹となったため治療終了とした。その後再発は認められなかったが、手術後 7 年経過して左水腎症の進行が

みられ、腎盂尿管移行部狭窄切除・腎杯尿管吻合術を施行した。治療開始後 19 年経過後、高度の高血圧に偶然気づき、精査したところ照射した大動脈およびその主要分岐に発育不全による高度の狭窄が発見された (図 3)。腎血管の再建は困難で腎の自家移植が勧められているが、未施行である。

## II. 考 察

厚生労働省班研究プロトコールが施行される前までは、有効な治療レジメンがないこともあり、大きな局所腫瘍に対しチャレンジングな癌の手術が行われ、患側腎の合併切除もやむを得ないものと考えられた。しかし、85 プロトコールにより原発腫瘍がかなり縮小することが多くなり、1990 年代に入り患側腎温存は次第に受け入れられるようになった。今では腎温存が標準的術式になったと思われる。しかし、温存したはずの腎が術後に消失したり、大幅な機能喪失をきたすことが少なからずあり、これは腎血管に対するリンパ節郭清により腎血管の損傷や攣縮のために術後血行障害に陥るためである。時に両側腎が血行障害になる。上腸間膜動脈や腹腔動脈でも同様であり、さらに血管に密にからみつくように存在する自律神経やリンパ管が切除されることにより、術後の腸管運動不全や大量のリンパ漏のため、術後化学療法の施行にも大きな影響がある。さらに、これまで治療不能な進行神経芽腫にも生存例が得られるようになり、系統的リンパ節郭清は今後男子の性機能不全など新たな長期障害となる可能性が高い。

欧米でも進行例に系統的リンパ節郭清を行う意義を疑問視する外科医は少なからず存在するが、腫瘍全摘症例と遺残症例で治療成績が前者で有意によいと観察から、進行例であっても腫瘍全摘を目指し、リンパ節郭清を行う術式が多数派である。しかし、術式の層別化を行った臨床試験は実際は困難で、科学的エビデンスを証明することはいまだなされていない。これまで、適切な局所治療の臨床試験は困難とされていたが、2006 年から開始された進行神経芽腫に対する臨床試験では局所治療を治療の最後におき、手術の方式も系統的リンパ切除を行わない術式に統一した。これにより、局所治療の意義とこの術式を明らかにし、さ

らに、治療の最後に摘出した腫瘍の病理組織と再発との関連をみることができるとなっている。以下にそのプロトコールの腹部での外科治療の部分を概説する。

### 1. 外科治療

high-risk 群に分類される 1 歳以上の病期 3, 4 の神経芽腫は、化学療法で縮小が得られても完全摘除が非常に難しく、厳密には完全摘除は不可能といっても誤りではない。しかし、多くの施設でより高い根治性を目指して可能な限り切除を行うことに努力してきた<sup>2~5)</sup>。神経芽腫の進展様式からいって、完全切除を目指す手術は血管およびその周囲の神経組織、リンパ管の損傷を伴い、術後腹部腫瘍臓器の血行障害、腸管の運動障害、術後の大量リンパ瘻、呼吸不全の問題も常に伴っていた<sup>6,7)</sup>。とくに、腎の血行障害は化学療法剤の変更、減量さらに引き続いて施行される大量化学療法のリスクを大きく左右する。手術のこれらの問題は術後化学療法の開始時期の遅れ、投与抗癌剤の減量、腎障害など、術後治療のばらつき大きな要因になり、適切な治療法を明らかにする臨床試験の遂行を妨げる大きな要因となった。いくつかの施設では術中照射法や術後照射と組み合わせることにより、より侵襲の少ない手術とする治療方針をとり、それにより局所再発率を高めることはないとの報告がみられる<sup>8~10)</sup>。

### 2. 原発巣摘除と機能温存

進行神経芽腫は治療成績がまだ不良とはいえ、5 年生存率は 40% に達する。したがって、局所再発の頻度を上げることなく機能温存を考慮することは重要である。また、治療中の合併症を少なくし、治療を予定どおり完遂するためにも短期合併症を防止することは治療成績向上に資すると考えられる。以下に進行神経芽腫の外科治療ガイドラインのうち腹部に関する部分を掲げる。

#### 1) 原発巣に関して

原発部位にかかわらず、原則として周囲臓器をできるだけ温存して原発巣を全摘出する。原発巣と一塊になったリンパ節は原発巣とともに切除を目指す。

(1) 副腎、後腹膜原発：肝・腎に関しては、手術時に viable とみられる浸潤がある場合は、部分



合併切除を行う。

(2) 機能のある腎は温存する。腎血管を巻き込んでいて剥離が困難な場合、腫瘍被膜内切除にて腎血管を温存し、腎合併切除を極力避ける。腎動脈の攣縮にはキシロカインを浸したガーゼで包み、攣縮を軽減しつつ手術を続行し、腎温存につとめる。

(3) 広範な腎実質浸潤がある場合には、腎合併切除をする。腎合併切除を行っても、腫瘍全摘出困難な場合は、腎を温存して、できるだけ腫瘍切除を行う。

(4) 腹腔動脈や上腸間膜動脈などの腹部大動脈からの主要な血管を巻き込んでいて剥離が困難な場合は、腫瘍被膜内切除にて血管を温存してできるだけ腫瘍を切除するものとする。

## 2) 転移巣に関して

(1) 原則として系統的リンパ節郭清は行わないものとする。

(2) 転移リンパ節と思われる 2.0 cm 以上のリンパ節は切除する。それ以下の大きさであっても肉眼・触診上で viable とみられる腫瘍があると考えられるリンパ節は切除する。

(3) 2.0 cm 以上のリンパ節の腫大したリンパ節が手術時にない場合、治療前に転移のみられた部位のリンパ節サンプリングを行う。

## おわりに

筑波大学で 20 年間にわたり施行された、腹部原発進行神経芽腫の手術について報告した。これらはほぼ一貫して両側腎の温存につとめ、局所制御でも生存率でも満足できる結果が得られた。現在行われている臨床試験では手術に関しこのコンセプトで施行されている。ただし、術中照射が可能な施設は限られているので、術中照射に代わり術後外部照射が施行される。その結果が、筑波大学とほぼ同じ結果が得られれば、世界に発信できる成果になる。術中照射の照射量に関しては線量が次第に少なくなってきたり、血管系の長期障害が千葉大学から報告されている。成長する小児

にあつては予想外の長期障害が出現する可能性があり、現在筑波大学症例でも長期障害調査が進行中である。

## 文 献

- 1) Kaneko M, Ohkawa H, Iwakawa M : Is extensive surgery required for the treatment of advanced neuroblastoma? *J Pediatr Surg* 32 (11) : 1616-1619, 1997
- 2) Tokiwa K, Fumino S, Ono S, et al : Results of retroperitoneal lymphadenectomy in the treatment of abdominal neuroblastoma. *Arch Surg* 138 (7) : 711-715, 2003
- 3) Kuroda T, Saeki M, Honna T, et al : Clinical significance of intensive surgery with intraoperative radiation for advanced neuroblastoma : Does it really make sense? *J Pediatr Surg* 38 : 1735-1738, 2003
- 4) Adkins ES, Sawin R, Gerbing RB, et al : Efficacy of complete resection for high-risk neuroblastoma : a Children's Cancer Group Study. *J Pediatr Surg* 39 : 931-936, 2004
- 5) La Qualia MP, Kushner BH, Su W, et al : The impact of gross total resection on local control and survival in high-risk neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 39 : 412-417, 2004
- 6) Rees H, Markley MA, Kiely EM, et al : Diarrhea after resection of advanced neuroblastoma : A common management problem. *Surgery* 123 : 568-572, 1998
- 7) Shamberger RC, Smith EI, Joshi VV, et al : The risk of nephrectomy during local control in abdominal neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 33 : 161-164, 1998
- 8) Kaneko M, Ohkawa H, Iwakawa M : Is extensive surgery required for the treatment of advanced neuroblastoma? *Journal of Pediatric Surgery* 32 : 1616-1619, 1997
- 9) Von Schweinitz D, Hero B, Berthold F : The impact of surgical radicality on outcome in childhood neuroblastoma. *Eur J Pediatr Surg* 12 : 402-409, 2002
- 10) Castel V, Tovar E, Costa J, et al : The role of surgery in stage IV neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 37 : 1574-1578, 2002

## 小児固形腫瘍の病理

## (2) 神経芽腫群腫瘍・腎腫瘍・胚細胞性腫瘍

中川温子<sup>\*1</sup>  
大喜多 肇<sup>\*2</sup>

## I. 神経芽腫群腫瘍の組織像と生物学的特性

International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC: 国際神経芽腫病理分類) は, 神経芽腫の生物学的特性に基づいた病理組織学的分類であり, 強力な予後予測因子である(表1)<sup>1,2)</sup>. 本稿では, INPCにおけるfavorable histology (FH) 群とunfavorable histology (UH) 群, およびganglioneuroblastoma, nodular subtype (GNBn) の組織像と分子生物学的特性について最近明らかになりつつあるゲノムアレイ情報を含めて概説する.

## 1. Favorable Histology (FH) 群

FH 群とは, poorly differentiated neuroblastoma (poorly diff. NBL) から differentiating NBL, ganglioneuroblastoma, intermixed, ganglioneuroma に至る年齢相応の分化・成熟能をもつ腫瘍群である. 生物学的には, high-affinity nerve growth factor receptor (TrkA) の発現が高く, DNA index は near-triploid (hyperdiploid) を示し, MYCN 遺伝子の増幅や 1p 欠失は認められないという特徴をもつ<sup>3-5)</sup>. TrkA の発現が高く, 神経節細胞への分化能をもっているが, 18 ヶ月未満ではほとんどの腫瘍が poorly diff. NBL の像を呈しており, 組織学的に分化した像を呈するまでには一定の時間を必要とする(図1)<sup>5)</sup>. リンパ節転移などの転移巣においても年齢に伴って分化・成熟が認められる. genomic DNA profile では, whole chromosome gain and loss を示す<sup>6)</sup>. 臨床的に予後良好とされる乳児神経芽腫の大部分はこの群に含まれ, マスクリーニング発見例を経過観察した症例では, 患児の年齢に相当した組織学的な分化・成熟が観察された<sup>7)</sup>. netrin 受容体である UNC5H4 は p53 のターゲット遺伝子

であり, p53 を介した細胞の生死をスイッチングする機能をもつ<sup>8)</sup>. p53 mutation は, 治療前 NBL には認められない. UNC5H4 は FH 群において発現が高く, NBL の自然退縮機構において重要な役割を果たしていると考えられる (unpublished data). FH 群における 5 年無病生存率は 90±1%, 5 年生存率は 97±1% と UH 群 (5 年無病生存率 39±3%, 5 年生存率 48±3%) に比較して格段に予後良好である<sup>9)</sup>. FH 群には, 自然退縮するものや分化・成熟していくものがあるが, 後者の場合, 化学療法に反応せずかえって腫瘍が再増大する症例もみられる<sup>10)</sup>. 治療効果の判定や治療方針の決定にあたっては FH 群の生物学的特性を十分に理解することが重要である.

## 2. Unfavorable Histology (UH) 群

この群は, 組織学的には, 分化・成熟傾向が全く認められない undifferentiated NBL および年齢相当の分化・成熟を示さない NBL が含まれ, MYCN 増幅腫瘍と MYCN 非増幅腫瘍とに大別される.

MYCN 増幅腫瘍は, MYCN 増幅により, TrkA の発現低下による細胞分化の停止, 細胞増殖の促進とアポトーシスの増加が起こるため, 図2に示すような特徴的な組織像を呈する<sup>4,11)</sup>. DNA index は near-diploid を示し, genomic DNA profile では, 1p deletion (1p36LOH), 17q gain を示し, 他の DNA コピー数の異常は稀である<sup>6)</sup>. UH 群 MYCN 増幅腫瘍における 5 年無病生存率は 25±5%, 5 年生存率は 29±5% で, UH 群 MYCN 非増幅腫瘍 (5 年無病生存率 46±4%, 5 年生存率は 57±4%) に比較し, 予後不良である<sup>9)</sup>.

UH 群の約 2/3 は MYCN 非増幅腫瘍であり, 組織学的に年齢相当の分化・成熟を示さない腫瘍であるが, 生物学的特性は十分に解明されていない. TrkA 発現は高いものから低いものまで様々であるが, TrkA の発現が高くても組織学的には年齢相当の分化・成熟が認められない<sup>5)</sup>. genomic DNA profile では, 3p-, 4p-, 11q-, 1q+, 2p+, 12q+, 17q+ などの多数の異

\*1 国立成育医療センター病理診断科

\*2 同 研究所発生・分化研究部

表1 International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)

年齢	Favorable histology (FH)	Unfavorable histology (UH)
全て	Ganglioneuroma Maturing Mature	
	Ganglioneuroblastoma, intermixed	
	Ganglioneuroblastoma, nodular Favorable subset	Ganglioneuroblastoma, nodular Unfavorable subset
		Neuroblastoma, undifferentiated any MKI
< 1.5 歳	Neuroblastoma, poorly diff. low/intermediate MKI	Neuroblastoma, poorly diff. high MKI
	Neuroblastoma, differentiating low/intermediate MKI	Neuroblastoma, differentiating high MKI
1.5~5 歳		Neuroblastoma, poorly diff. any MKI
	Neuroblastoma, differentiating low MKI	Neuroblastoma, differentiating intermediate/high MKI
5 歳以上		Neuroblastoma, poorly diff./differentiating any MKI

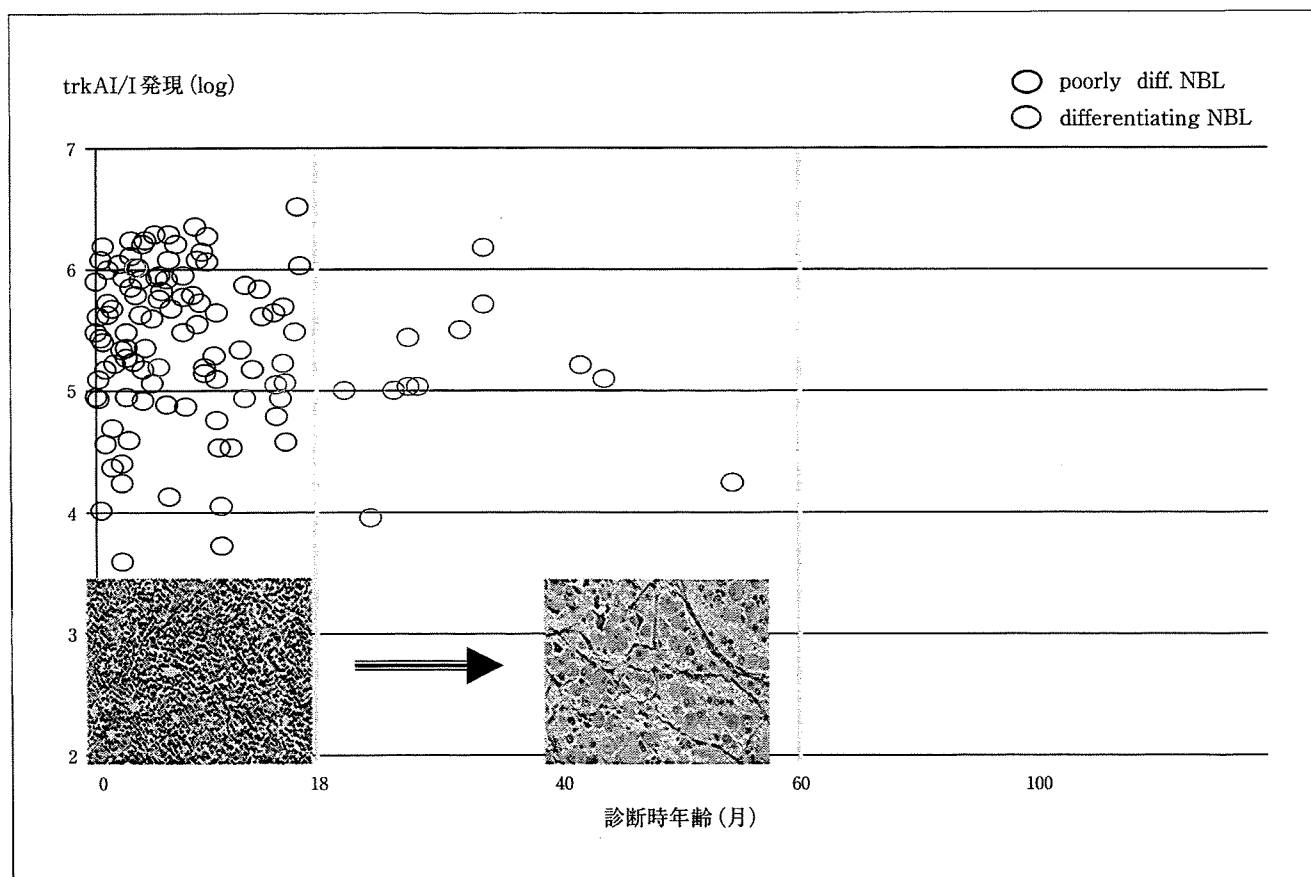


図1 TrkA 発現と組織像 (poorly diff. NBL, differentiating NBL) 18ヵ月未満では, TrkA が高発現であっても組織学的には低分化である, 18ヵ月以上になると TrkA 高発現腫瘍はより分化した differentiating NBL の像を呈する。

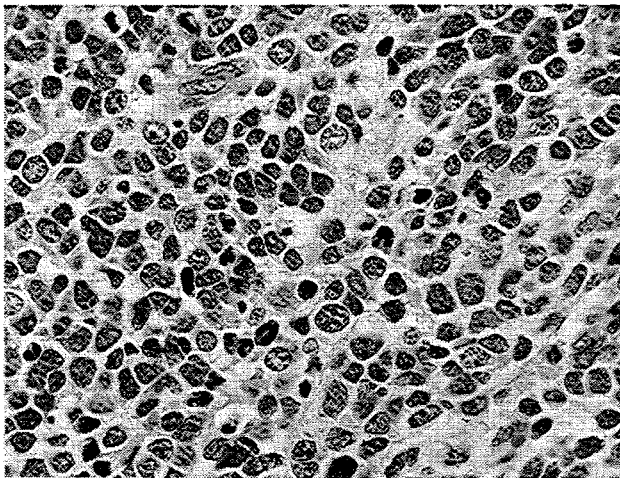


図2 unfavorable histology (UH)群MYCN増幅腫瘍(2歳2ヵ月男児の副腎腫瘍) neuroblastoma, poorly diff. subtype, high MKIの像である。

常を示す群とDNAコピー数の異常が認められない群がみられる<sup>6)</sup>。最近、MYCN非増幅腫瘍において unbalanced 11q LOH (unb 11qLOH) および 1p36LOH が独立した予後不良因子であることが報告された<sup>12)</sup>。unb 11qLOHを示す腫瘍では、大型の多形性の強い腫瘍細胞が約70%の症例で観察されるという報告がある<sup>13)</sup>。unb 11qLOHを示す腫瘍はUH群MYCN非増幅腫瘍の40%程度にすぎず、この群における分子生物学的予後因子は未だ確定していない<sup>13)</sup>。

### 3. Ganglioneuroblastoma, nodular subtype (GNBn)

GNBnは複数のクローンから構成される composite tumorで、肉眼的には暗赤色の出血を伴うNBL (stroma-poor tumor)の結節が、白色調のGNB, intermixed subtypeあるいはganglioneuroma (stroma-rich/stroma-dominant tumor)の中に認められる。GNBnの中のNBL成分を通常のNBLと同様に、年齢、分化・成熟度、MKI (mitosis karyorrhexis index)を指標として分類することにより、GNBnは予後良好な favorable subsetと予後不良な unfavorable subsetに分けられる<sup>14)</sup>。favorable subsetのstroma-poor tumorとstroma-rich/stroma-dominant tumorとは、組織像は異なるものの、どちらも年齢相応の分化・成熟をしていくFH群と同じ生物学的特性をもつ。一方、unfavorable subsetのGNBnにおいては、stroma-rich/stroma-dominant tumorはFH群と同様の non-aggressive cloneであるが、stroma-poor tumorはUH群, aggressive cloneである。原発巣における

stroma-rich/stroma-dominant tumorとstroma-poor tumorの占める割合は様々で、stroma-rich/stroma-dominant tumorがほとんどを占める場合には、生検の際にサンプリングエラーのため、正確な組織学的分類や生物学的特性(MYCN増幅など)が判定できないことがある。例えばstage 4で、原発巣の部分切除または生検による組織がganglioneuromaの像を示す場合には、GNBnが疑われるので、転移巣(骨髄など)の組織学的検索が必要となる。

## II. 腎腫瘍

乳幼児に好発する腎腫瘍のなかで腎芽腫とその前駆病変とされている造腎組織遺残、腎明細胞肉腫、腎ラブドイド腫瘍について、最近のトピックスを中心に解説する。小児の腎腫瘍では、metanephric stromal tumor, metanephric adenofibroma, anaplastic sarcoma of the kidneyなどの新たな概念の腫瘍が報告され、骨・軟部肉腫として知られるEwing肉腫ファミリー腫瘍や滑膜肉腫が腎にも発生することが遺伝子解析の進歩により明確になってきている。

### 1. 腎芽腫 nephroblastoma (Wilms tumor)

腎芽腫(Wilms腫瘍)は、胎児期の腎組織を模倣した組織構築を示す代表的な胎児性腫瘍である。乳幼児期の腎腫瘍では最も頻度が高いが、我が国での発生数は、1年間に100例未満と推測される。組織学的に、後腎芽組織に類似した形態を示す後腎芽細胞、上皮細胞成分、間葉成分が種々の割合で混在している。後腎芽細胞は、胎生期の後腎組織の未熟細胞に類似した形態を示す、小型・楕円形でクロマチンの濃染する核を有する細胞で、びまん性あるいは結節状に増殖する。上皮成分は、ロゼット様の構造や種々の程度に分化した腺管が多いが、時に扁平上皮や粘液を有する円柱上皮もみられる。間葉成分は、線維芽細胞様の成分、横紋筋成分が多いが、骨、軟骨、脂肪などがみられることもある。これらの3成分全てが認められる腫瘍(triphasic)が最も特徴的であるが、2種類の成分から成るbiphasicあるいは1種類のみから成るmonophasicの腫瘍もある。

アメリカではNWTS(National Wilms Tumor Study Group)を中心に治療法が開発され(現在はCOG: Children's Oncology Group)、最初に腎摘しその後化学療法を行うプロトコルを長く提唱してきた。腫瘍の組織型をfavorable histology (FH)とunfavorable histology (UH) (focalまたはdiffuse anaplasiaを伴う

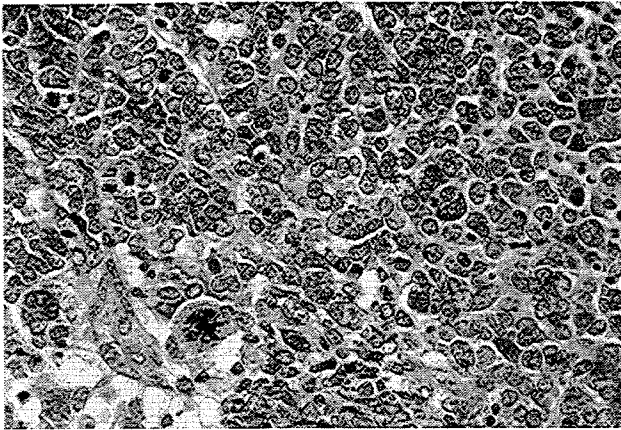


図3 anaplasiaを伴うWilms腫瘍 anaplasiaでは、多極性の核分裂像がみられる。

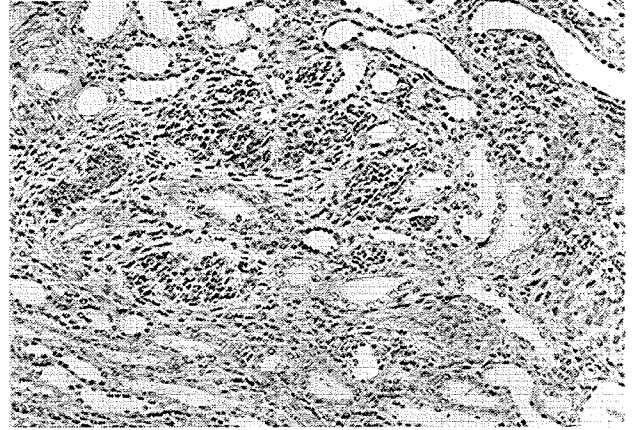


図4 葉内腎芽腫症 後腎芽細胞が、腎組織内に増生している。

腫瘍)に分類し治療方針を決定してきた。anaplasiaは、巨大な核(核の径が他の腫瘍細胞の3倍以上)と多極性核分裂像によって特徴づけられる(図3)。当初、focal anaplasiaはanaplasiaが顕微鏡的に10%以下の場合を指していたが、現在では、anaplasiaを示す領域が、周囲との境界が明瞭で、腎実質に局限し、かつ、anaplasiaがない領域で著しい核の多形性やクロマチン増量がないことと定義されている。focal anaplasia以外はdiffuse anaplasiaである。anaplasiaを有する腫瘍は、化学療法抵抗性とされており、特にdiffuse anaplasiaの場合、強い予後不良因子となる。一方、ヨーロッパでは、SIOP(International Society of Paediatric Oncology)により治療法が開発されてきた。SIOPは、術前に化学療法を行ってから腎摘する治療法を提唱しており、治療後の組織像により治療法を決定している<sup>15)</sup>。特にSIOPの提唱する分類では、化学療法により腫瘍細胞が完全に壊死におちいつている場合は、low risk tumoursとされる。通常、後腎芽細胞成分は化学療法に感受性があるが、化学療法後の腎摘標本にて後腎芽細胞成分が優位な場合は、治療抵抗性があると考えられ、high risk tumoursとされる。また、diffuse anaplasiaを伴う症例も、high risk tumoursとされている。

NWTSとSIOPの治療法は、ほぼ同様の成績であるが、NWTSの場合、確実な病理組織診断により治療法を決定できる利点があり、一方、SIOPの場合、化学療法による腫瘍縮小のため腎摘の切除可能率の向上や切除が容易になるなどの利点が挙げられる。我が国の治療研究グループであるJWiTS(Japan Wilms

Tumor Study Group)では、NWTS同様、最初に腎摘するプロトコルを採用しているが、施設によっては、SIOP同様、化学療法後に腎摘している。我が国では、小児腫瘍組織分類図譜第一篇小児泌尿器腫瘍における分類が提示されていたが、2008年2月に小児腫瘍組織分類委員会編集の新たなアトラスが出版され、腫瘍内の各構成成分の優位性(2/3以上を占める構成成分)による新たな分類が示された<sup>16)</sup>。

## 2. 造腎組織遺残nephrogenic rest, 腎芽腫症nephroblastomatosis

造腎組織遺残は、胎児期の後腎組織の異常な遺残と考えられ、腎芽腫の発生母地と想定されている。腎芽腫症は、造腎組織遺残が多発性、またはびまん性に存在する病変である。造腎組織遺残は、その発生部位により葉内造腎組織遺残intralobar nephrogenic rest(ILNR)、辺葉造腎組織遺残perilobar nephrogenic rest(PLNR)に分類される。造腎組織遺残は腎芽腫患者の25%程度にみられるとされ、本邦ではILNRが多くPLNRは稀である。造腎組織遺残同定のためには非腫瘍部や腫瘍辺縁部からの標本作製が重要である。

ILNRは、腎臓の葉内、すなわち腎髄質の錐体とそれを取り囲む皮質から構成される腎葉の内部、時に腎盂周囲に存在する。境界不明瞭な病変で、後腎芽細胞、間葉成分、上皮成分が種々の割合で混在する。腎組織(糸球体や尿細管)と造腎組織遺残の成分が入り混じるように存在することが多い(図4)。一方、PLNRは腎葉の辺縁部に存在する。比較的境界明瞭で後腎芽細胞、上皮成分をみることが多い。造腎組織遺残は肉眼的に容易に認識できるhyperplastic restから、退縮す

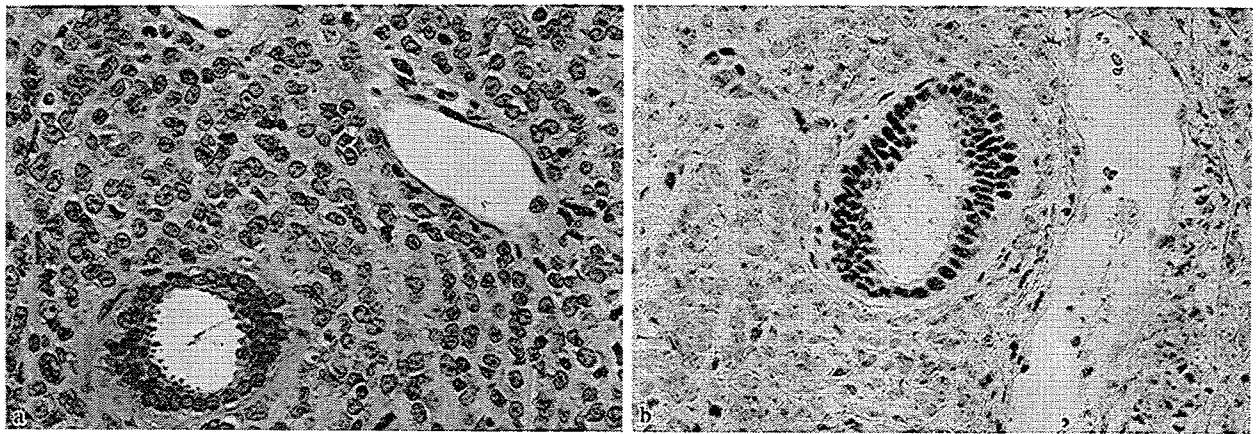


図5 腎ラブドイド腫瘍 a: HE染色. 大型核を有する腫瘍細胞が浸潤性に増殖している. ラブドイド細胞が目立たない領域も多い. b: BAF47染色. 腫瘍細胞の核は, BAF47陰性である.

るrestまで存在する. hyperplastic restでは腎芽腫とほぼ同様の細胞の増殖がみられるため, 生検では, 腎芽腫との鑑別は不可能なこともある.

### 3. 腎明細胞肉腫 clear cell sarcoma of the kidney (CCSK)

腎明細胞肉腫は腎ラブドイド腫瘍と共に, 旧小児腫瘍組織分類委員会分類において腎芽腫, 不全型として分類されていたが, 新分類では腎芽腫から除外され, 腎明細胞肉腫, 腎ラブドイド腫瘍として別個の腫瘍として分類されている.

本腫瘍は, 3歳前後に発生し, 骨転移の頻度が高いことが特徴的である. 被膜をもたないが, 肉眼的に周囲との境界明瞭な白色充実性の腫瘍である. 組織学的には, 樹枝状の血管あるいは血管線維性間質を伴って腫瘍細胞が索状, 胞巣状に増殖するパターンが特徴的である. 腫瘍細胞の核は, 類円形で繊細なクロマチンを有し, 核小体は目立たない. 典型的な症例では比較的容易に診断できるが, 硬化, 間質の粘液腫状変化, 上皮様形態など, 様々なパターンをとることがあり, 診断の難しい症例も多い. 免疫組織化学的に, ビメンチン陽性となるものの, CD34, S-100, デスミン, MIC2, サイトケラチン, EMAは陰性と報告されている<sup>17)</sup>. もともと予後不良であったが, NWTSの報告によると化学療法剤にドキシソルビシンを加えることにより, 生存率が大幅に向上した.

### 4. 腎ラブドイド腫瘍 rhabdoid tumor of the kidney (RTK)

腎ラブドイド腫瘍は, 乳児に好発する高悪性度の腫瘍である. もともと横紋筋肉腫との形態的な類似点か

らラブドイド(横紋筋肉腫様)という名称がつけられたが, 横紋筋に由来する腫瘍とする証拠はない. 軟部にも発生することが知られており, また脳にも同様の腫瘍が発生する (atypical teratoid/rhabdoid tumor: AT/RT). ほとんどは3歳までに発症する.

肉眼的には, 白色調の軟らかい腫瘍で, 出血・壊死を伴い周囲に浸潤性に増殖する. 組織学的には, 明瞭な核小体と大型核を有する腫瘍細胞が, びまん性に増殖する(図5a). しばしば, 細胞質に好酸性の封入体を認める(ラブドイド細胞)が, 必ずしも腫瘍全体に出現するわけではなく, 部分的にまとまって出現することが多い. 一方で紡錘形の腫瘍細胞が主体を成す部もある. 核は大型で, 大型の核小体を有し, 水泡状のクロマチンを有する.

免疫組織化学的には, ビメンチン陽性であり, サイトケラチン, EMAが一部の細胞に陽性になる. 染色体22qの異常とその領域に存在する *SMARCB1* (*hSNF5/INI1/BAF47*) 遺伝子の欠失や点変異等による不活化が報告されている. また, 中枢神経系と腎臓に腫瘍を発症する患児にて本遺伝子の生殖細胞系列での変異も報告されている. BAF47抗体を用いた免疫染色は, ほとんどの細胞に陽性であるが, RTKでは陰性となることが報告されている(図5b)<sup>18)</sup>. AT/RTでも同様の報告がなされており, RTKやAT/RTの鑑別診断に参考にすることができる. しかしながら, 類上皮肉腫, renal medullary carcinomaなどRTK以外の腫瘍でもその発現消失が報告されており, 特異度についてさらなる検討が必要である.

### Ⅲ. 胚細胞性腫瘍における *c-kit* 遺伝子変異

胚細胞性腫瘍は、原始生殖細胞が起源と考えられており、卵巣、精巣以外に身体の正中線上に近い部位、すなわち頭蓋内、頸部、縦隔、後腹膜、仙尾部などを好発部位とする。原始生殖細胞は胎生4週までに卵黄嚢に観察され、受容体である *c-kit* (KIT) を発現していく。リガンドである stem cell factor (SCF) は卵黄嚢から生殖隆起にかけて濃度勾配を示しながら発現するため、相互の作用により原始生殖細胞は胎生6週の生殖隆起へと遊走し、その後性腺へと分化する。生殖細胞のほか、Cajal細胞、メラノサイト、赤芽球、肥満細胞の分化・増殖において SCF-KIT システムは必須である。

KIT は *c-kit* 遺伝子にコードされる受容体型チロシンキナーゼであり、細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞内領域(傍細胞膜領域とチロシンキナーゼ領域 I, II) より構成される。*c-kit* 遺伝子の突然変異に起因する腫瘍には、gastrointestinal stromal tumor (GIST)、肥満細胞症/肥満細胞性白血病、セミノーマなどの胚細胞性腫瘍、急性骨髄性白血病などがある。GIST にみられる突然変異は傍細胞膜領域(エクソン11)に集中しており、肥満細胞症/肥満細胞性白血病ではチロシンキナーゼ領域 II (エクソン17) の点突然変異が認められる。一方胚細胞性腫瘍では、1999年に Tian らが seminoma/dysgerminoma 2例にエクソン17 (codon 816) の点突然変異を報告した<sup>19)</sup>。*c-kit* 遺伝子の突然変異は、seminoma/dysgerminoma/germinoma の25~38%に認められるが、その他の胚細胞性腫瘍(yolk sac tumor, gonadoblastoma, immature teratoma など)には認められない<sup>20-23)</sup>。免疫組織化学的に KIT 発現は大部分の seminoma/dysgerminoma に認められ、突然変異の認められない腫瘍でも、細胞膜に陽性となる。yolk sac tumor でも時に KIT 発現がみられるが、細胞質に陽性となる<sup>19,20)</sup>。GIST では、チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブが有効であるとされているが、seminoma/dysgerminoma/germinoma に認められるエクソン17の点突然変異のうち、D816V, D816H mutant はイマチニブ抵抗性であることが報告され<sup>20)</sup>、その臨床応用に際してはさらなる検討が望まれる。

#### 文 献

1) Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P. et al. :

- The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer* 1999, 86 : 364-372
- 2) Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P. et al. : Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors : recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999, 86 : 349-363
- 3) Ambros, I.M., Zellner, A., Roald, B. et al. : Role of ploidy chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996, 334 : 1505-1511
- 4) Goto, S., Umehara, S., Gerbing, R.B. et al. : Histopathology and MYCN status in peripheral neuroblastic tumors : a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 2001, 92 : 2699-2708
- 5) Shimada, H., Nakagawa, A., Julius, P. et al. : TrkA expression in peripheral neuroblastic tumors. *Cancer* 2004, 101 : 1873-1881
- 6) Mosse, Y.P., Diskin, S.J., Wasserman, N. et al. : Neuroblastoma have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 2007 46 : 936-949
- 7) Iwanaka, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y. et al. : Maturation of mass-screened localized adrenal neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2001 36 : 1633-1636
- 8) Wang, H., Ozaki, T., Shamim Hossain, M. et al. : A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 370 : 1594-1598
- 9) 佐野秀樹, London, W.B., Cohn, S.L. 他 : 神経芽腫群腫瘍における MYCN 遺伝子検索と国際病理分類 (INPC) の予後予測効果 : 北米グループスタディの経験. *小児がん* 2007, 44 : 1-8
- 10) 前田尚子, 中川温子, 瀧本哲也 他 : 神経節腫に分化したのち再増大をきたした stage IVA 乳児神経芽腫の1例. *小児がん* 2005, 42 : 238-243
- 11) Shimada, H., Stram, D.O., Chatten, J. et al. : Identification of subsets of neuroblastoma combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87 : 1470-1476
- 12) Attiyeh, E.F., London, W.B., Mosse, Y.P. et al. : Chromosome 1p and 11q Deletions and Outcome in Neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005, 353 : 2243-2253
- 13) Berrebi, D., Peuchmaur, M., Okamoto, C. et al. : Chromosomal alternations (unb11pLOH and 1pLOH) and histologic changes in peripheral neuroblastic tumors. *Proceedings Advances in Neuroblastoma Research* 2006
- 14) Umehara, S., Nakagawa, A., Matthay, K.K. et al. : Histopathology defines prognostic subsets of ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 2000, 89 : 1150-1161

- 15) Vujanic, G.M., Sandstedt, B., Harms, D. et al. : Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol* 2002, **38** : 79-82
- 16) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会 編 : 小児腫瘍組織カラーアトラス, 金原出版, 東京, 2008
- 17) Argani, P., Perlman, E.J., Breslow, N.E. et al. : Clear cell sarcoma of the kidney : a review of 351 cases from the National Wilms Tumor Study Group Pathology Center. *Am J Surg Pathol* 2000, **24** : 4-18
- 18) Hoot, A.C., Russo, P., Judkins, A.R. et al. : Immunohistochemical analysis of hSNF5/INI1 distinguishes renal and extra-renal malignant rhabdoid tumors from other pediatric soft tissue tumors. *Am J Surg Pathol* 2004, **28** : 1485-1491
- 19) Tian, Q., Frierson, H.F.Jr., Krystal, G.W. et al. : Activating *c-kit* gene mutation in human germ cell tumors. *Am J Pathol* 1999, **154** : 1643-1647
- 20) Kemmer, K., Corless, C.L., Fletcher, J.A. et al. : *KIT* mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol* 2004, **164** : 305-313
- 21) Høi-Hansen, C.E., Kraggerud, S.M., Abeler, V.M. et al. : Ovarian dysgerminomas are characterized by frequent *KIT* mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Mol Cancer* 2007, **6** : 12
- 22) Sakuma, Y., Sakurai, S., Oguni, S. et al. : *c-kit* gene mutations in intracranial germinomas. *Cancer Sci* 2004, **95** : 716-720
- 23) Przygodzki, R.M., Hubbs, A.E., Zhao, F.Q. et al. : Primary mediastinal seminomas : evidence of single and multiple *KIT* mutations. *Lab Invest* 2002, **82** : 1369-1375



ORIGINAL ARTICLE

## Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature

N Tomioka<sup>1,2,3,11</sup>, S Oba<sup>4,11</sup>, M Ohira<sup>1,11</sup>, A Misra<sup>2,12</sup>, J Fridlyand<sup>5</sup>, S Ishii<sup>4,13</sup>, Y Nakamura<sup>1</sup>, E Isogai<sup>1</sup>, T Hirata<sup>6</sup>, Y Yoshida<sup>7</sup>, S Todo<sup>3</sup>, Y Kaneko<sup>8</sup>, DG Albertson<sup>9,10</sup>, D Pinkel<sup>9,10</sup>, BG Feuerstein<sup>2,9,10,12</sup> and A Nakagawara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Biochemistry, Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba, Japan; <sup>2</sup>Department of Neurological Surgery, Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, CA, USA; <sup>3</sup>Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan; <sup>4</sup>Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Japan; <sup>5</sup>Department of Epidemiology and Biostatistics, University of California, San Francisco, CA, USA; <sup>6</sup>Hisamitsu Pharmaceutical Co. Inc., Tokyo, Japan; <sup>7</sup>GENESHOT project, R&D Center, NGK Insulators, Ltd, Nagoya, Japan; <sup>8</sup>Saitama Cancer Center Research Institute, Saitama, Japan; <sup>9</sup>Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, CA, USA and <sup>10</sup>Comprehensive Cancer Center, University of California, San Francisco, CA, USA

Human neuroblastoma remains enigmatic because it often shows spontaneous regression and aggressive growth. The prognosis of advanced stage of sporadic neuroblastomas is still poor. Here, we investigated whether genomic and molecular signatures could categorize new therapeutic risk groups in primary neuroblastomas. We conducted microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) with a DNA chip carrying 2464 BAC clones to examine genomic aberrations of 236 neuroblastomas and used in-house cDNA microarrays for gene-expression profiling. Array-CGH demonstrated three major genomic groups of chromosomal aberrations: silent (GGS), partial gains and/or losses (GGP) and whole gains and/or losses (GGW), which well corresponded with the patterns of chromosome 17 abnormalities. They were further classified into subgroups with different outcomes. In 112 sporadic neuroblastomas, *MYCN* amplification was frequent in GGS (22%) and GGP (53%) and caused serious outcomes in patients. Sporadic tumors with a single copy of *MYCN* showed the 5-year cumulative survival rates of 89% in GGS, 53% in GGP and 85% in GGW. Molecular signatures also segregated patients into the favorable and unfavorable prognosis groups ( $P=0.001$ ). Both univariate and multivariate analyses revealed that genomic and molecular signatures were mutually independent, powerful prognostic indicators. Thus, combined genomic and molecular signatures may categorize novel risk groups and confer new clues for

allowing tailored or even individualized medicine to patients with neuroblastoma.

*Oncogene* (2008) 27, 441–449; doi:10.1038/sj.onc.1210661; published online 16 July 2007

**Keywords:** neuroblastoma; array-CGH; molecular signature; risk stratification; microarray

### Introduction

Neuroblastoma is one of the most common solid tumors in children. However, its clinical behavior is enigmatic because the tumor usually regresses spontaneously when developed in patients under 1 year of age, but often grows rapidly to cause fatal outcomes when developed as an advanced tumor in patients over the age of 1 year (Brodeur, 2003; Schwab *et al.*, 2003). Recent nationwide mass screening (MS) in Japan for discovering neuroblastoma at the age of 6 months clearly demonstrated the presence of a large number of asymptomatic tumors undergoing spontaneous regression (Woods *et al.*, 2002), which had been suggested by Beckwith and Perrin (1963). The involvement of TrkA, a high-affinity receptor for nerve growth factor, in the regression of neuroblastoma has been suggested; however, the molecular mechanisms of the regressive event still remain elusive (Nakagawara *et al.*, 1993; Nakagawara, 1998). On the other hand, the majority of sporadic neuroblastomas are discovered at advanced stages, and their prognosis is still very poor (Brodeur, 2003; Schwab *et al.*, 2003). Recently advanced cytogenetic analyses revealed that given subsets of neuroblastomas with a favorable prognosis possess the hyperdiploid karyotype of chromosomes (Look *et al.*, 1984; Tomioka *et al.*, 2003) and that the other subsets with an unfavorable prognosis usually possess the diploid or tetraploid karyotype and often have *MYCN* amplification, gains of chromosome arms 1q, 2p and 17q, as well as allelic losses of chromosome arms 1p, 3p and 11q (Brodeur,

Correspondence: Dr A Nakagawara, Division of Biochemistry, Chiba Cancer Center Research Institute, 666-2 Nitona, Chuoh-Ku, Chiba 260-8717, Japan.

E-mail: akiranak@chiba-cc.jp

<sup>11</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>12</sup>Current address: Department of Neurology, Barrow Neurological Institute, St. Joseph's Hospital and Medical Center, Phoenix, AZ, USA.

<sup>13</sup>Current address: Graduate School of Informatics, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Received 29 December 2006; revised 29 May 2007; accepted 11 June 2007; published online 16 July 2007

2003; Schwab *et al.*, 2003). We and other investigators have previously reported the high accuracy of gene-expression profiling to predict the prognosis of neuroblastoma (Wei *et al.*, 2004; Ohira *et al.*, 2005). However, the prognostic significance of genomic signatures when using a high-resolution DNA microarray in primary neuroblastomas has never been reported. Here, we applied microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) to both sporadic and MS-detected neuroblastomas in order to comprehend their clinical behavior and found that genomic signatures, together with molecular signatures, stratified the novel risk groups in sporadic neuroblastomas.

## Results

### *Patterns of genomic signatures in 236 primary neuroblastomas*

The most prominent feature of 236 primary neuroblastomas (112 sporadic and 124 MS detected) was the apparent presence of three genomic groups (GGs) (Figure 1a, its magnified, high-resolution figures are also indicated in Supplementary Figures S1a and b): the group of few chromosomal events (silent, GGS;  $n=29$ ); the group of partial chromosomal gains/losses (GGP;  $n=77$ ) and the group of whole chromosomal gains/losses (GGW;  $n=130$ ) (Supplementary Figures S2a and b). Correlation analysis revealed that the global feature (see Materials and methods) was maximally correlated with the gain of the long arm of chromosome 17 ( $R=-0.807$ ) and with the gain of a whole chromosome 17 ( $R=0.75$ ) (Supplementary Table S1a), therefore the genomic groups GGP and GGW were defined by the status of aberration, by 17q gain and 17 whole chromosomal gain occurred in chromosome 17, respectively. They were followed by DNA ploidy ( $R=-0.642$ ), loss of chromosome 1p ( $R=-0.521$ ), *MYCN* amplification ( $R=-0.531$ ), loss of chromosome 11q ( $R=-0.5$ ), low *TrkA* expression ( $R=-0.47$ ) and age  $\geq 1$ -year old ( $R=-0.466$ ). Even when tested in 112 sporadic tumors, the correlation coefficient was  $-0.773$  in 17q gain,  $-0.705$  in DNA ploidy,  $-0.598$  in 1p loss,  $-0.565$  in tumor stages,  $-0.502$  in *MYCN* amplification,  $-0.49$  in low *TrkA* expression and  $-0.458$  in age  $\geq 1$ -year old (Supplementary Table S1b). These suggested that 17q gain was a characteristic and prognosis-related event in primary neuroblastomas. The percentages of DNA diploidy or tetraploidy were 83% (15/18), 66% (33/50) and 18% (17/94) in GGS, GGP and GGW tumors, respectively (Supplementary Table S2a).

GGS tumors rarely showed chromosomal aberrations except *MYCN* amplification in 5 among 29 tumors (Figure 1b, a high-resolution figure is also indicated in Supplementary Figure S1c). To date, the presence of the GGS subgroup with very silent aberrations of the tumor genome has never been verified definitely. The concern about the possible dilution of the tumor-cell DNA content by contamination of stromal cells was cleared by the detailed examination of GGS tumor specimens

(see Supplementary Figure S2b and Supplementary Information).

Seventy-seven GGP tumors, which had 17q gain, were further subgrouped computationally according to the detailed chromosomal event, the presence and/or absence of 1p loss and 11q loss, which are characteristic and *MYCN* amplification (s, single copy of *MYCN*; a, *MYCN* amplification) (Figures 1a and b, and see Supplementary Information). GGP1 tumors were characterized by 1p loss and 17q gain as main aberrations. GGP1a ( $n=23$ ) was one of the most common GGP tumors. They showed the diploid karyotype (10/13, 77%) and had *MYCN* amplification in addition to 1p loss and 17q gain. Interestingly, GGP1s tumors lacking *MYCN* amplification ( $n=6$ ) showed relatively frequent 2p gain, as well as 14q loss, 1q gain, 4p loss and 7p gain that were rare in GGP1a tumors with *MYCN* amplification. GGP2 tumors were characterized by the presence of both 1p loss and 11q loss, in addition to 17q gain. In GGP2a, tumors with *MYCN* amplification ( $n=4$ ) also frequently showed 1q gain. GGP3 tumors formed a group typically characterized by the presence of 11q loss and 17q gain without 1p loss. Intriguingly, only 1 of 27 GGP3 tumors had *MYCN* amplification. All GGP4 tumors except one, which presented neither 1p loss nor 11q loss, also had no *MYCN* amplification. The percentages of diploidy/tetraploidy in GGP1, GGP2, GGP3 and GGP4 tumors were 76% (13/17), 75% (6/8), 76% (13/17) and 13% (1/8), respectively (Supplementary Table S2a).

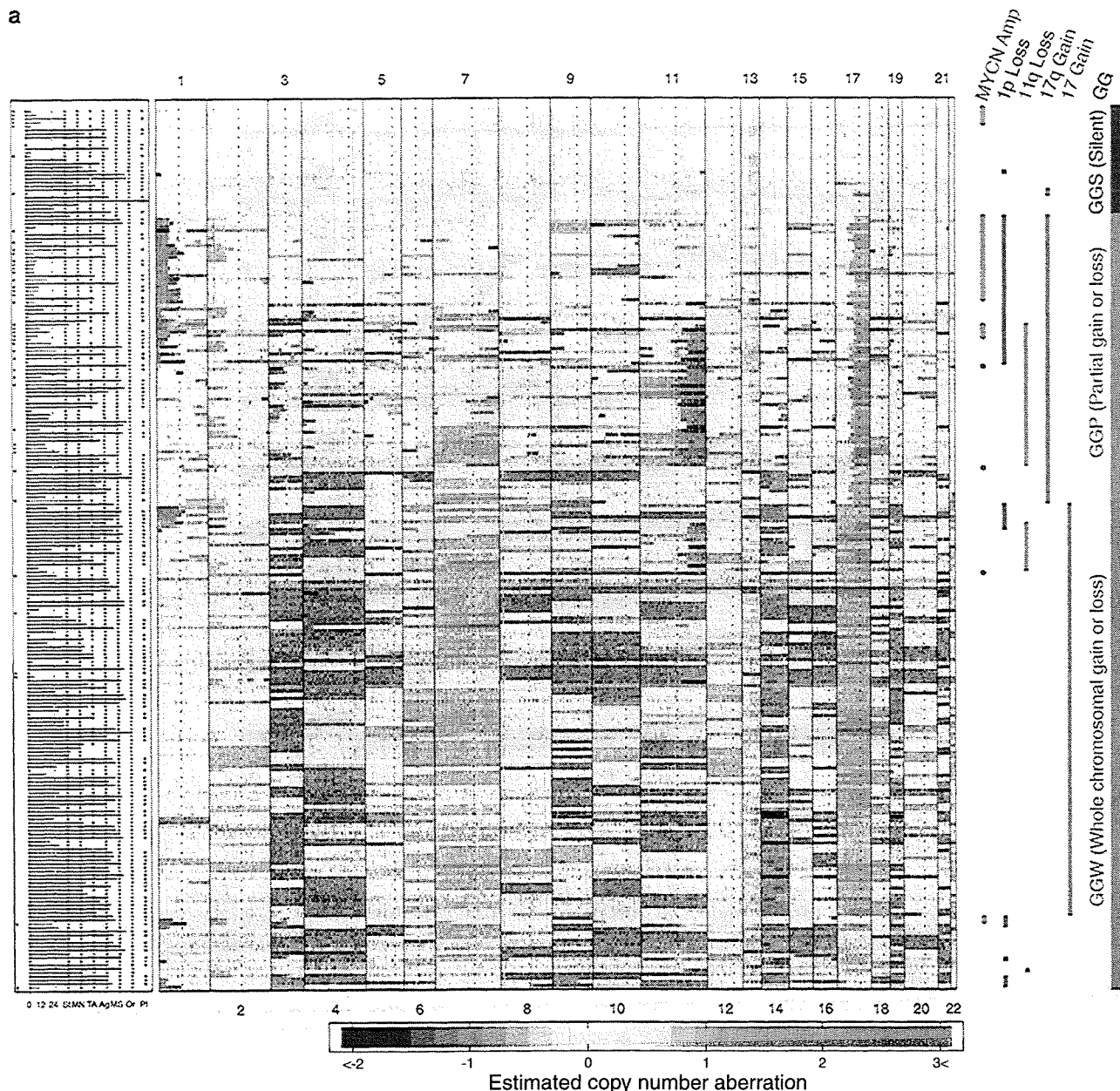
GGW tumors with whole chromosomal gains and/or losses, especially with the predominant gain of whole chromosome 17 (Figure 1b), were mostly the tumors detected by MS (94/130, 73%; see Supplementary Table S2a). The highest incidence of MS-detected neuroblastomas was observed in GGW4s tumors that were purely composed of whole chromosomal gains/losses. The DNA ploidy analysis revealed that 82% (77/94) of GGW tumors were hyperdiploidy. Similarly to GGP tumors, GGW tumors were categorized into tumors with the following aberrations: 1p loss (GGW1,  $n=5$ ); both 1p loss and 11q loss (GGW2,  $n=2$ ); 11q loss (GGW3,  $n=11$ ) and without any one (GGW4,  $n=92$ ). GGW5 tumors ( $n=20$ ) formed a group of tumors with a low frequency of chromosome 17 on the BAC array. Like chromosome 17, chromosomes 6 and 7 were frequently gained in GGW tumors. *MYCN* amplification was observed in only three tumors belonging to GGW4 or GGW5 (3/112, 2.7%).

### *Genomic signatures and clinical outcomes*

Genomic signatures of neuroblastomas unveiled previously unknown relationships between genetic subgroup and patient prognosis (Figure 1b). The greatest surprise was the difference in the 5-year survival rates between the GGSa (0%,  $n=5$ ) and GGSs (91%,  $n=24$ ) subgroups ( $P<0.001$ ). The other *MYCN*-amplified tumor subgroups, GGP1a ( $n=23$ ), GGP2a ( $n=4$ ) and GGWa ( $n=3$ ), also showed very poor survival rates of 42, 0 and 0%, respectively. On the other hand, GGWs

neuroblastomas demonstrated good outcomes (GGW1s: 100%,  $n=5$ ; GGW2s: 100%,  $n=2$ ; GGW3s: 100%,  $n=11$ ; GGW4s: 97%,  $n=91$  and GGW5s: 89%,

$n=18$ ). The intermediate 5-year cumulative survival rates were demonstrated in GGPs tumors (GGP1s: 80%,  $n=6$ ; GGP2s: 57%,  $n=7$ ; GGP3s: 75%,  $n=26$



**Figure 1** Genomic signatures of 236 primary neuroblastomas by array-based comparative genomic hybridization (array-CGH). (a) Overall schematic of the genomic signatures of 236 primary neuroblastomas. The left panel summarizes information about patient diagnostic factors: survival time in months after diagnosis for censored (blue bars) or dead (red bars) patients, stages 1, 2 and 4s (blue) or 3 and 4 (red) (ST), *MYCN* amplification (red) or not (blue) (MN), *TrkA* low (red) or high expression (blue) (TA), age more (red) or less (blue) than 12 months (Ag), sporadic tumors (red) or tumors detected by mass screening (blue) (Ms), adrenal gland (red) or others (blue) in origin (Or) and hyperploidy (blue) or diploidy/tetraploidy (red) (PI). The central panel shows estimated copy number aberrations of DNA as color matrixes (blue: loss, red: gain) at chromosome locations complementary to BAC clones in each sample. The right panel shows the important features of chromosomal events, including *MYCN* amplification, deletions of chromosomes 1p and 11q, chromosome 17q gain and whole chromosome 17 gain. Furthermore, genomic groups (GGS, silent genomic group; GGP, partial chromosomal gains/losses genomic group and GGW, whole gains and/or losses genomic group) are also indicated. (b) Genomic signatures in each genomic group and the 5-year survival rates for all neuroblastomas including MS detected and sporadic tumors. Regarding each genomic group, the colored histogram represents the rates of gains and losses for each clone, where the red areas on the baseline correspond to gain and the blue areas under the baseline to loss. The right panel indicates the presence of *MYCN* amplification, 1p loss, 11q loss, 17q gain and 17 gain. The 5-year survival rates (SR) of each genomic subgroup are indicated in the right panel.

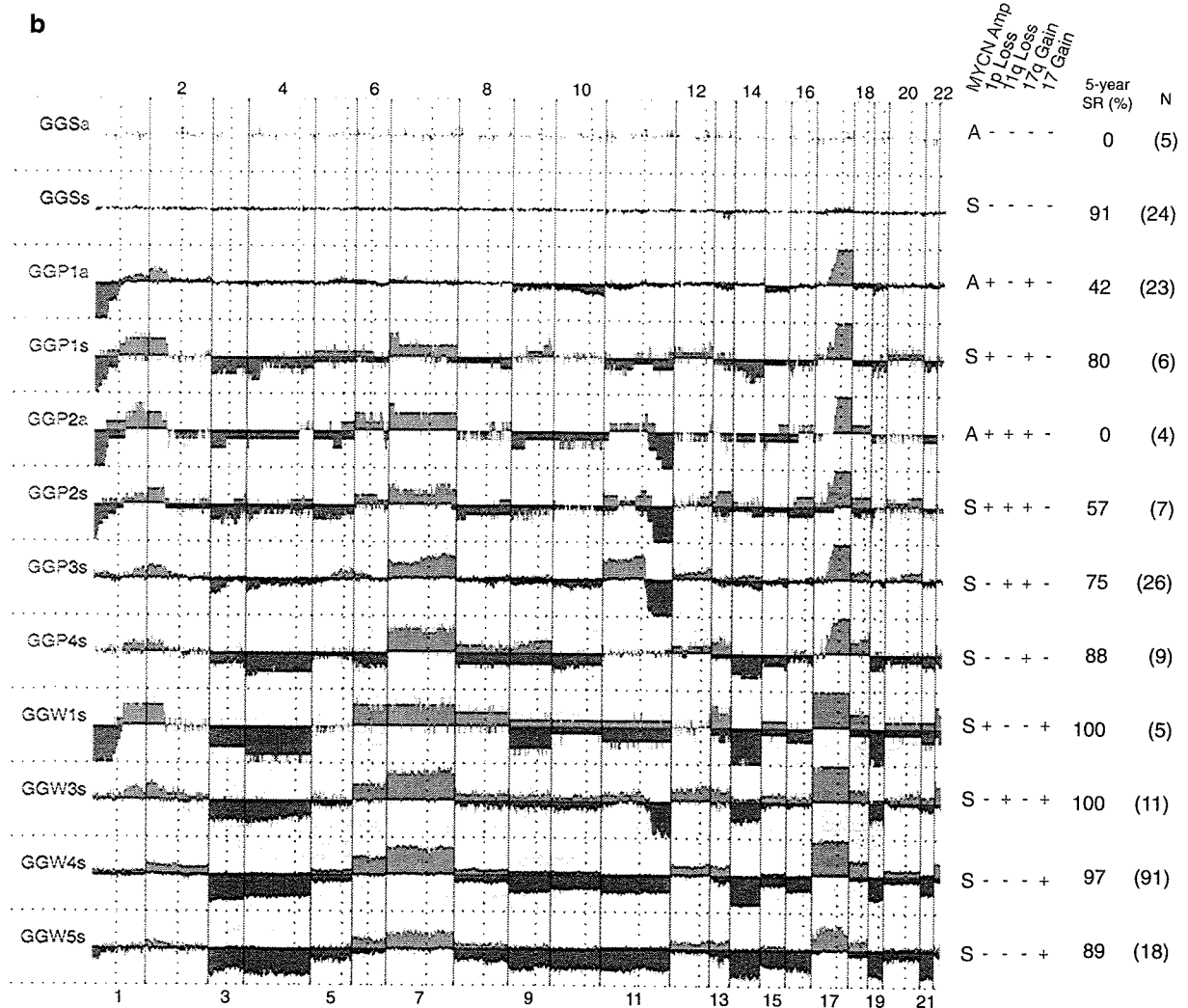


Figure 1 Continued.

and GGP4s: 88%,  $n=9$ ). Interestingly, in GGP tumors, 1p loss (GGP1s,  $n=6$ ) and 11q loss (GGP3s,  $n=26$ ) seemed to have a similar effect on patient prognosis (5-year survival rates: 80 and 75%, respectively). However, GGP2s tumors with both 1p loss and 11q loss ( $n=7$ ) had a poorer prognosis (57%) in an additive manner. Furthermore, the addition of 11q loss and 1q gain to *MYCN* amplification apparently afforded absolutely poor outcomes as suggested by the comparison between GGP1a (42%) and GGP2a tumors (0%). An analysis of 112 sporadic tumors also revealed a similar tendency except GGP1s, in which 2 sporadic tumors showed 0% survival, whereas all 4 MS-detected tumors gave good outcomes (Table 1 and Supplementary Figure S3). These suggested that *MYCN* amplification had the most powerful influence on clinical outcomes. We next compared the patterns of whole genome abnormalities of *MYCN*-amplified neuroblastomas between survivors (disease-free for more than 2 years after initiating treatment) and non-survivors (dead

of disease). One of the most striking differences was frequent loss of 11q (Supplementary Figure S4).

#### Effects of genomic signatures, *MYCN* amplification and age on prognosis in sporadic neuroblastomas

Figure 2 shows the Kaplan–Meier cumulative survival curves in each genetic group. In sporadic neuroblastomas, the overall survival rates of GGW, GGS and GGP were 80% ( $n=36$ ), 68% ( $n=23$ ) and 43% ( $n=53$ ), respectively (Figure 2a). The prognosis of GGP was significantly poorer than that of GGW ( $P=0.002$ ). In MS-detected tumors, on the other hand, the survival rates of GGW, GGS and GGP were 100% ( $n=94$ ), 100% ( $n=6$ ) and 96% ( $n=24$ ), respectively (no significant difference among the groups; Figure 2b). The main difference between sporadic and MS-detected tumors was that the latter was detected before 1 year of age and had very few *MYCN* amplifications. Therefore, sporadic tumors were next subcategorized according