

growth factor receptor 1) and development (such as jagged-1 and frizzled-4, -7, and -8). Interestingly, in addition to the surface antigens presented in Fig. 6B and C, the expression profiling of EWS/ETS-expressing UET-13 cells displayed the modulation of several genes associated with cell adhesion, cytoskeletal structure, and membrane trafficking, such as those for collagen-11 and -21, ephrin receptor-A2, -B2, and -B3, ephrin-B1, claudin-1, integrin- $\alpha$ 11, - $\alpha$ M, and - $\beta$ 2, CD66 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1), and CD102 (intercellular cell adhesion molecule-2). They also included genes of chemokines CCL-2 and -3. These data raise the possibility that EWS/ETS can contribute to the membrane condition in human MPCs via the regulation of these cell surface molecules and chemokines.

Using these genes, we performed a PCA to visualize the shift in the gene expression pattern among the 642 probes. As shown in Fig. 7C, the plots of UET-13 transfectants treated with tetracycline became closer to those of EFT cells than to those of UET-13 transfectants without tetracycline treatment. These results indicated that the expression pattern of these genes was altered from that of UET-13 cells to that of EFT cells in an EWS/ETS-dependent manner. Since the gene expression profile of UET-13 cells is similar to those of other cell types of mesenchymal origin (data not shown), our results highlighted that the phenotypic alteration from mesenchyme to EFT-like cells in UET-13 cells induced by tetracycline treatment was accompanied by a change in the global gene expression profile.

**EWS/ETS expression enhances the Matrigel invasion of UET-13 cells.** To assess the role of EWS/ETS in malignant transformation in human MPCs, UET-13 transfectants were examined by invasion assay. As shown in Fig. 8A, tetracycline treatment did not affect the Matrigel invasion ability of UET-13TR cells. When examined similarly, however, tetracycline treatment resulted in an apparently increased invasion ( $P < 0.05$ ) for both UET-13TR-EWS/FLI1 (Fig. 8B) and UET-13TR-EWS/ERG (Fig. 8C) cells. The results indicated that EWS/ETS expression can induce Matrigel invasion properties in human MPCs.

## DISCUSSION

In the present study, using UET-13 cells as a model of human MPCs, we demonstrated that ectopic expression of EWS/ETS promoted the acquisition of an EFT-like phenotype, including cellular morphology, immunophenotype, and gene expression profile. Moreover, EWS/ETS expression enhances the ability of UET-13 cells to invade Matrigel. This assay is thought to mimic the early steps of tumor invasion *in vivo* (34), and the ability to penetrate the Matrigel has been positively correlated with invasion potential in several studies. Therefore, we concluded that EWS/ETS expression could mediate a part of the feature of tumor transformation in human MPCs. Thus, our culture system would provide a good model for testing the effects of EWS/ETS in human MPCs.

Several lines of evidence have indicated the transforming ability of EWS/FLI1, whereas that of EWS/ERG is not yet to be clarified. Therefore, it is noteworthy that our data demonstrated that EWS/ERG could promote an EFT-like phenotype in UET-13 cells similarly to EWS/FLI1. Thus, EWS/ERG also has the ability to induce an EFT-like phenotype in the human

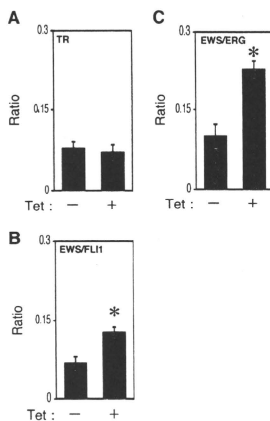


FIG. 8. Effects of EWS/ETS expression on the Matrigel invasion ability of UET-13 cells. UET-13TR (A), UET-13TR-EWS/FLI1 (B), and UET-13TR-EWS/ERG (C) cells were cultured in the absence or presence of tetracycline (Tet) for 72 h and then plated ( $2.5 \times 10^4$ ) on Matrigel-coated or uncoated filter inserts. After 20 h of culture, invading cells were stained with hematoxylin-eosin and counted in five fields per membrane as described in Materials and Methods. \*,  $P < 0.05$ .

system. The major steps in the development of EFT should be commonly regulated by distinct chimeric EWS/ETS proteins. Indeed, several genes are common transcriptional targets of different chimeric EWS/ETS proteins in the murine system (11, 24, 35). Our data also showed that the 642 probes are coregulated in both EWS/FLI1-expressing cells and EWS/ERG-expressing cells. Further comparative studies of both the EWS/FLI1- and the EWS/ERG-mediated onset of EFT could allow us to understand the common functions of EWS/FLI1 and EWS/ERG in EFT. In addition, our systems are also useful for precisely distinguishing between the functions of these chimeric molecules in the development of EFT.

As mentioned above, the immunophenotypic analysis also revealed that the expression profiles of surface antigens in UET-13 cells were changed in favor of EFT cells in the presence of EWS/ETS (Fig. 4). Notably, the expression of CD54 (intercellular cell adhesion molecule-1 [ICAM1]), CD117 (c-kit), and CD271 (low-affinity nerve growth factor receptor [LNGFR]) increased in EWS/ETS-expressing UET-13 cells. These markers are positive in EFT cell lines (17, 28, 33), and in addition, CD117 is detected in about 40% of patient samples (17) and is negative in human primary MPCs (4, 43). Thus, it is reasonable to consider that a phenotypic marker of EFT was induced in UET-13 cells by EWS/ETS expression. On the other hand, CD54 and CD271 are positive in human primary MPCs (8, 25, 42), whereas these markers are negative in UET-13 cells. However, a previous report showed the disappearance of some positive markers, including CD271, from primary human MPCs during the process of ex vivo expansion

(25), and it has been speculated that the expression of these molecules in MPCs is induced *in vivo* via interaction with the bone marrow microenvironment and that the necessary stimuli are absent from *ex vivo* culture conditions. Therefore, the immunophenotype of UET-13 cells rather might be related to that of *ex vivo*-expanded primary human MPCs. In addition, it may be possible that EWS/ETS expression led to the reexpression of these disappeared markers in UET-13 cells without the necessary stimuli. In this case, the maintenance of CD271 expression outside of the bone marrow microenvironment might be a characteristic of EFT. Thus, our results proved that both EWS/FL11 and EWS/ERG can be major causes of the expression of these markers and that human MPCs that precisely recapitulate the expression are strong candidates for the cell origins of EFT cells. The findings also imply that these antigens are suitable targets for diagnostic tools and new therapeutic agents. In fact, imatinib mesylate, which demonstrates anticancer activity against malignant cells expressing BCR-ABL as well as CD117 and platelet-derived growth factor receptor, inhibits proliferation and increases sensitivity to vincristine and doxorubicin in EFT cells (17).

Notably, our results also indicate that UET-13 cells, which have the MPC phenotype, possess the potential to acquire an EFT-like phenotype upon the expression of EWS/ETS. Unlike what is seen for human primary fibroblasts (31), ectopic EWS/ETS expression induces an EFT-like morphological change in human MPCs, suggesting that the cell type affects susceptibility to the events following EWS/ETS expression. In murine MPCs, retrovirally transduced EWS/FL11 has been reported to induce the expression of CD99, a most useful marker for EFT, though the results are controversial (6, 45). However, our direct evidence obtained with UET-13 cells clearly demonstrated that CD99 expression is induced by EWS/ETS proteins in human MPCs. Moreover, we showed that the expression of CD99 might correlate with EWS/ETS-mediated morphological change, whereas the functional role of CD99 and the correlation between CD99 expression status and EWS/ETS-mediated morphological change in the development of EFT remain unclarified.

Consistent with the morphological and immunophenotypic changes, the expression pattern of a set of genes in EWS/ETS-expressing UET-13 cells shifted to that in EFT cells (Fig. 7C). Although EWS/ETS expression enhanced the ability of UET-13 cells to invade Matrigel, it did not promote migratory ability and surface-independent growth, as assessed by migration assay and soft agar colony formation assay (data not shown). We also failed to develop EFT-like tumors by injecting EWS/ETS-inducing UET-13 cells into irradiated nude mice treated with tetracycline (data not shown). These results imply that EWS/ETS expression is not sufficient to induce the full transformation in UET-13 cells, and other genetic abnormalities not regulated by EWS/ETS could still be required for the full transformation of human MPCs into EFT cells. An identification of these genes will greatly improve our understanding of the additional genetic lesions that occur after EWS/ETS expression. The genes expressed in EFT cell lines but not in EWS/ETS-expressing UET-13 cells would be candidates for such genes.

In summary, we reported the development of an inducible EWS/ETS expression system in UET-13 cells as a model for

the development of EFT in MPCs. In our system, the chimeric genes alone are sufficient to confer EFT-like phenotypes, EFT-specific gene expression pattern, and partial but not full features of malignant transformation. Further analysis using our system should elucidate the pathogenic mechanism by which EFTs develop from MPCs, especially the initiating events mediated by EWS/ETS expression. Our system should also aid in the identification of novel targets of the EWS/ETS-mediated pathway as potential anticancer targets.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by health and labor sciences research grants (the 3rd-Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control [H19-010], Research on Children and Families [H18-005 and H19-003], Research on Human Genome Tailor Made, and Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices [H18-005]) and a grant for child health and development from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, JSPS (Kakenhi 18790263). This work was also supported by a CREST, JST grant from the Japan Health Sciences Foundation for Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices and the Budget for Nuclear Research of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, based on screening and counseling by the Atomic Energy Commission. Y. Miyagawa is an awardee of a research resident fellowship from the Foundation for Promotion of Cancer Research (Japan) for the 3rd-Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control.

We are grateful to T. Motoyama for the NRS-1 cell line. We respectfully thank S. Yamauchi for her secretarial work and M. Itagaki for many helpful discussions and support.

#### REFERENCES

- Akagi, T. 2004. Oncogenic transformation of human cells: shortcomings of rodent model systems. *Trends Mol. Med.* 10:542-548.
- Ambros, I. M., P. F. Ambros, S. Strehl, H. Kovar, H. Gagner, and M. Bergeron. 1991. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 67:1886-1893.
- Arvand, A., and C. T. Denny. 2001. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 20:5747-5754.
- Bertani, N., P. Malatesta, G. Volpi, P. Sonogo, and R. Perris. 2005. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J. Cell Sci.* 118:3925-3936.
- Bloom, E. T. 1972. Further definition by cytotoxicity tests of cell surface antigens of human sarcomas in culture. *Cancer Res.* 32:960-967.
- Castillero-Trejo, Y., S. Eliazar, L. Xiang, J. A. Richardson, and R. L. Ilaria, Jr. 2005. Expression of the EWS/FL1-1 oncogene in murine primary bone-derived cells results in EWS/FL1-1-dependent, Ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Res.* 65:8698-8705.
- Colter, D. C., I. Sekiya, and D. J. Prockop. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:7841-7845.
- Conger, P. A., and J. J. Minguell. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 181:67-73.
- Davis, S., and P. S. Meltzer. 2006. Ewing's sarcoma: general insights from a rare model. *Cancer Cell* 9:331-332.
- Deneen, B., and C. T. Denny. 2001. Loss of p16 pathway stabilizes EWS/FL11 expression and complements EWS/FL11 mediated transformation. *Oncogene* 20:6731-6741.
- Deneen, B., S. M. Welford, T. Ho, F. Hernandez, I. Kurland, and C. T. Denny. 2003. PIM3 proto-oncogene kinase is a common transcriptional target of divergent EWS/ETS oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* 23:3897-3908.
- Eliazar, S., J. Spencer, D. Ye, E. Olson, and R. L. Ilaria, Jr. 2003. Alteration of mesodermal cell differentiation by EWS/FL1-1, the oncogene implicated in Ewing's sarcoma. *Mol. Cell. Biol.* 23:482-492.
- Fujii, Y., Y. Nakagawa, T. Hongo, Y. Igarashi, Y. Naito, and M. Maeda. 1989. Cell line of small round cell tumor originating in the chest wall: W-ES. *Hum. Cell* 2:190-191. (In Japanese.)
- Fukuma, M., H. Okita, J. Hata, and A. Umezawa. 2003. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ETS protein in Ewing sarcoma. *Oncogene* 22:1-9.
- Gilbert, F., G. Balaban, P. Moorhead, D. Bianchi, and H. Schlesinger. 1982.

- Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* 75:33-42.
16. Girish, V., and A. Vijayalakshmi. 2004. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J. Cancer* 41:47.
  17. Gonzalez, L., E. J. Andreu, A. Panizo, S. Inoges, A. Fontalba, J. L. Fernandez-Luna, M. Gaboli, L. Sierrasumaga, S. Martin-Algarra, J. Pardo, F. Prosser, and E. de Alava. 2004. Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 10:751-761.
  18. Hansen, M. B., S. E. Nielsen, and K. Berg. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119:203-210.
  19. Hara, S., E. Ishii, S. Tanaka, J. Yokoyama, K. Katsumata, J. Fujimoto, and J. Hata. 1989. A monoclonal antibody specifically reactive with Ewing's sarcoma. *Br. J. Cancer* 60:875-879.
  20. Hatori, M., H. Doi, M. Watanabe, H. Sasano, M. Hosaka, S. Kotajima, F. Urano, J. Hata, and S. Kokubun. 2006. Establishment and characterization of a clonal human extraskeletal Ewing's sarcoma cell line, EESI. *Tohoku J. Exp. Med.* 216:221-230.
  21. Honma, C., Y. Kaneko, K. Sekine, S. Hara, J. Hata, and M. Sakurai. 1989. Establishment and characterization of a small round cell sarcoma cell line, SCCH-196, with t(11;22)(q24;q12). *Jpn. J. Cancer Res.* 80:861-865.
  22. Hubert, R. S., I. Vivanco, E. Chen, S. Rastegar, K. Leong, S. C. Mitchell, R. Madraswala, Y. Zhou, J. Kuo, A. B. Raitano, A. Jakobovits, D. C. Saffran, and D. E. Afar. 1999. STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14523-14528.
  23. Ha-Lieskova, S., J. Zhang, L. Wu, H. Shimada, D. E. Schofield, and T. J. Triche. 2005. EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res.* 65:4633-4644.
  24. Im, Y. H., H. T. Kim, C. Lee, D. Poulin, S. Welford, P. H. Sorensen, C. T. Denny, and S. J. Kim. 2000. EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res.* 60:1536-1540.
  25. Jones, E. A., S. E. Kinsey, A. English, R. A. Jones, L. Straszynski, D. M. Meredith, A. S. F. Markham, A. Jack, P. Emery, and D. McGonagle. 2002. Isolation and characterization of bone marrow multipotent mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* 46:3349-3360.
  26. Khoury, J. D. 2005. Ewing sarcoma family of tumors. *Adv. Anat. Pathol.* 12:212-220.
  27. Kiyokawa, N., Y. Kokai, K. Ishimoto, H. Fujita, J. Fujimoto, and J. I. Hata. 1990. Characterization of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CD10) as an activation molecule on mature human B cells. *Clin. Exp. Immunol.* 79:322-327.
  28. Konemann, S., T. Bolling, A. Schuck, J. Malath, A. Kolkmeier, K. Horn, D. Riesenbeck, S. Hesselmann, R. Diallo, J. Vormoor, and N. A. Willich. 2003. Effect of radiation on Ewing tumor subpopulations characterized on a single-cell level: intracellular cytokine, immunophenotypic, DNA and apoptotic profile. *Int. J. Radiat. Biol.* 79:181-192.
  29. Kovar, H., and A. Bernard. 2006. CD99-positive "Ewing's sarcoma" from mouse bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells? *Cancer Res.* 66:9786.
  30. Kovar, H., M. Dworzak, S. Strebl, E. Schnell, I. M. Ambros, P. F. Ambros, and H. Gaderer. 1990. Overexpression of the pseudautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene* 5:1067-1070.
  31. Lessnick, S. L., C. S. Dacwag, and T. R. Golub. 2002. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI1 induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 1:393-401.
  32. Lin, P. P., R. L. Brody, A. C. Hamelin, J. E. Bradner, J. H. Healey, and M. Ladanyi. 1999. Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 59:1428-1432.
  33. Lipinski, M., K. Brahm, I. Philip, J. Wiels, T. Philip, C. Goridis, G. M. Lenoir, and T. Tursz. 1997. Neuroectoderm-associated antigens on Ewing's sarcoma cell lines. *Cancer Res.* 47:183-187.
  34. Lochter, A., A. Srebrow, C. J. Sympon, N. Terracio, Z. Werb, and M. J. Bissell. 1997. Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties. *J. Biol. Chem.* 272:5007-5015.
  35. May, W. A., A. Arvand, A. D. Thompson, B. S. Braun, M. Wright, and C. T. Denny. 1997. EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic. *Nat. Genet.* 17:495-497.
  36. May, W. A., S. L. Lessnick, B. S. Braun, M. Klemsz, B. C. Lewis, L. B. Lunsford, R. Hromas, and C. T. Denny. 1993. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol. Cell Biol.* 13:7393-7398.
  37. Miyagawa, Y., J. M. Lee, T. Maeda, K. Koga, Y. Kawaguchi, and T. Kusakabe. 2005. Differential expression of a Bombyx mori AHAI1 homologue during spermatogenesis. *Insect Mol. Biol.* 14:245-253.
  38. Mori, T., T. Kiyono, H. Imabayashi, Y. Takeda, K. Tsuchiya, S. Miyoshi, H. Makino, K. Matsumoto, H. Saito, S. Ogawa, M. Sakamoto, J. Hata, and A. Umezawa. 2005. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol. Cell Biol.* 25:5183-5195.
  39. Nishimori, H., Y. Sasaki, K. Yoshida, H. Irihara, H. Zembutsu, T. Tanaka, T. Aoyama, T. Hosaka, S. Kawaguchi, T. Wada, J. Hata, J. Toguchida, Y. Nakamura, and T. Tokino. 2002. The lId2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. *Oncogene* 21:8302-8309.
  40. Ogose, A., T. Motoyama, T. Hotta, and H. Watanabe. 1995. In vitro differentiation and proliferation in a newly established human rhabdomyosarcoma cell line. *Virchows Arch.* 426:385-391.
  41. Prieur, A., F. Tirado, P. Coheu, and O. Delattre. 2004. EWS/FLI1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol. Cell Biol.* 24:7275-7283.
  42. Quirici, N., D. Soligo, P. Bossolasco, F. Servida, C. Luminii, and G. L. Delilieri. 2002. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-neuro growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 30:783-791.
  43. Reyes, M., T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie, and C. M. Verfaillie. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98:2615-2625.
  44. Reyes, M., and C. M. Verfaillie. 2001. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 938:231-235.
  45. Riggi, N., L. Cironi, P. Provero, M. L. Suva, K. Kaloulis, C. Garcia-Echeverria, F. Hoffmann, A. Trumpp, and I. Stamenkovic. 2005. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* 65:11459-11468.
  46. Riggi, N., M. L. Suva, and I. Stamenkovic. 2006. Ewing's sarcoma-like tumors originate from EWS-FLI-1-expressing mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* 66:9786.
  47. Sekiguchi, M., T. Oota, K. Sakakibara, N. Inui, and G. Fujii. 1979. Establishment and characterization of a human neuroblastoma cell line in tissue culture. *Jpn. J. Exp. Med.* 49:67-83.
  48. Smith, R., L. A. Owen, D. J. Trem, J. S. Wong, J. S. Whangbo, T. R. Golub, and S. L. Lessnick. 2006. Expression profiling of EWS/FLI1 identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 9:405-416.
  49. Stage, M. S., C. Hutter, I. Neumann, S. Fojta, U. E. Hattenhorst, G. Hansen, D. Afar, and S. E. Burdach. 2004. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res.* 64:8213-8221.
  50. Takeda, Y., T. Mori, H. Imabayashi, T. Kiyono, S. Gojo, S. Miyoshi, N. Hida, M. Ito, K. Segawa, S. Ogawa, M. Sakamoto, S. Nakamura, and A. Umezawa. 2004. Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J. Gene Med.* 6:833-845.
  51. Tondreau, T., N. Meuleman, A. Delforge, M. Dejenneff, R. Leroy, M. Massy, C. Mortier, D. Bron, and L. Lagneaux. 2005. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 23:1105-1112.
  52. Torchia, E. C., S. Jaishankar, and S. J. Baker. 2003. Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res.* 63:3464-3468.
  53. Woodbury, D., E. J. Schwarz, D. J. Prockop, and I. B. Black. 2000. Adult rat and human marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci.* 20:3264-3270.

## 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ついても、18ヵ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、マスキ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

\* 国立成育医療センター病理診断科

\*\* 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

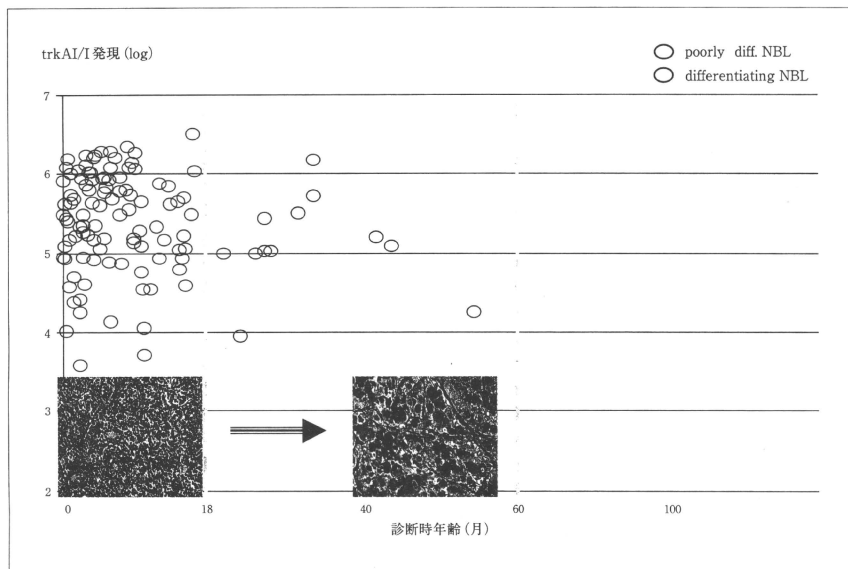


図1 TrkA 発現と組織像 (poorly diff. NBL, differentiating NBL) 18ヵ月未満では、TrkAが高発現であっても組織学的には低分化である。18ヵ月以上になるとTrkA高発現腫瘍はより分化したdifferentiating NBLの像を呈する。

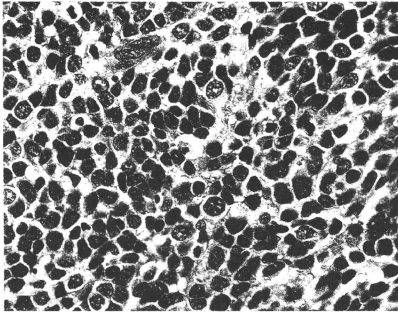


図2 unfavorable histology (UH)群MYCN増幅腫瘍(2歳2ヵ月男児の副腎腫瘍) neuroblastoma, poorly diff. subtype, high MKIの像である。

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像が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

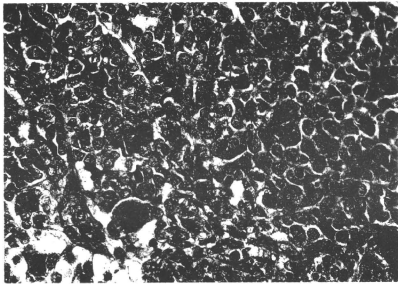


図3 anaplasiaを伴うWilms腫瘍 anaplasiaでは、多極性の核分裂像がみられる。

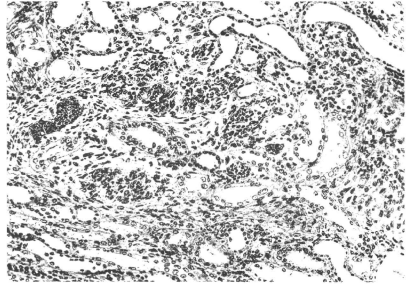


図4 葉内腎芽腫症 後腎芽細胞が、腎組織内に増生している。

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、腎実質に限局し、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ー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

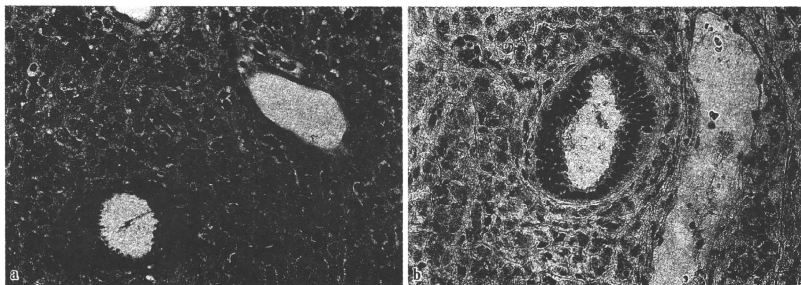


図5 腎ラブドイド腫瘍 a: HE染色. 大型核を有する腫瘍細胞が浸潤性に増殖している。ラブドイド細胞が目立たない領域も多い。b: BAF47染色. 腫瘍細胞の核は、BAF47陰性である。

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。定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、部分的にままと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., Wesserman, 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., Okamatsu, 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

## Ewing肉腫ファミリー腫瘍の臨床病理

大喜多 肇<sup>\*1</sup>  
秦 順一<sup>\*1,2</sup>

## I. Ewing肉腫ファミリー腫瘍の概念

Ewing肉腫は1921年にEwingが“diffuse endothelioma of bone”の名称のもとに、骨に発生し血管に富んだ明るい胞体を有する小円形細胞腫瘍を報告して以来の腫瘍である<sup>1)</sup>。その後、本腫瘍が軟部組織にも発生することが明らかとなり骨外性Ewing肉腫と呼ばれてきた。一方、末梢性未分化神経外胚葉腫瘍 peripheral primitive neuroectodermal tumor (PNET)は、1918年にStoutがロゼット構造を伴った小円形細胞からなる尺骨神経の腫瘍を peripheral neuroepithelial tumor として報告して以来、その存在が認識されるようになった<sup>2)</sup>。その後、本腫瘍が神経組織と関連しない組織に発生すること、骨に発生することが報告された。また、1979年にAskinらは、胸壁に発生する神経形質を示す小円形細胞腫瘍を、独自の臨床病理学的な概念として報告した<sup>3)</sup>。これらの腫瘍は類似した特徴を有し、同一のentityに属する腫瘍か独立した腫瘍であるか長く論争されてきたが、近年では病理組織学的な類似点と共通した染色体転座(t(11;22)、それに由来する融合遺伝子(キメラ遺伝子)から同一のentityに属する腫瘍と考えられるようになり、Ewing肉腫ファミリー腫瘍 Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT)、Ewing family tumor (EFT)、Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor などと呼ばれるようになった<sup>4,5)</sup>。すなわちEwing肉腫は未熟ではつきりした分化形質を示さない腫瘍、PNETは神経形質を示す腫瘍で、一連のスペクトラムを有する腫瘍群との考え方が支配的である。本腫瘍の由来については、種々の説があり、古くは骨髄の血管内皮細胞ないしは細胞細胞由来とされたこともある。しかしながら、今

日ではこの見解は否定的で、未熟な間葉系細胞あるいは神経堤に由来するとの考え方が優勢である。

## II. Ewing肉腫ファミリー腫瘍の臨床像

Ewing肉腫ファミリー腫瘍は、小児あるいは若年成人に好発する。本邦における正確な頻度は不明であるが、欧米と比較すると低頻度であり日本での発生は年間100例に満たないと考えられる。本腫瘍は、様々な部位の骨、軟部組織に発生しうが、骨では骨盤や大腿骨に、軟部組織では四肢や軀幹の深部組織に好発する。しかしながら遺伝子診断法の導入により、様々な臓器(腎臓、膀胱、子宮、卵巣、食道、小腸、膵臓、胆道、髄膜、肺、心臓、副腎、耳下腺など)より発生することが報告されている。Ewing肉腫ファミリー腫瘍は骨や深部軟部組織に腫瘍を形成し、炎症症状が強いことが特徴で、骨に発生した場合、臨床的にしばしば骨髄炎との鑑別が必要とされている。

## III. Ewing肉腫ファミリー腫瘍の病理組織像

本腫瘍は軟らかい腫瘍を形成することが多く、しばしば広範な壊死を伴う。組織学的に特定の分化形質を示さない腫瘍から明瞭な神経形質を示す腫瘍まで様々である。典型的なEwing肉腫とされてきた腫瘍は、小型類円形で繊細なクロマチンをもつ核を有し、核小体は小型であるが、目立たない(図1)。細胞質はグリーコーゲンが豊富で明るく、細胞境界は不明瞭である(図2)。これらの腫瘍細胞が、繊細な血管性間質を伴って単調に増殖する。時にやや大型で不整な核と明瞭な核小体を有する腫瘍細胞があり atypical Ewing's sarcoma あるいは large cell Ewing's sarcoma と呼ばれる。一見、胞巣状のパターンを呈すること、紡錘形細胞がみられること、間質の硬化を伴うこともある<sup>6)</sup>。時に上皮様のパターンを呈することがあり adamantinoma-

\*1 国立成育医療センター 研究所発生・分化研究部

\*2 常盤大学人間科学部

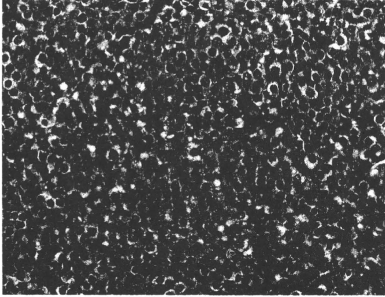


図1 Ewing肉腫の組織像 小型類円形で繊細なクロマチンを有する核をもつ腫瘍細胞が、特定の配列をとらずに増殖している。細胞質は明るい。

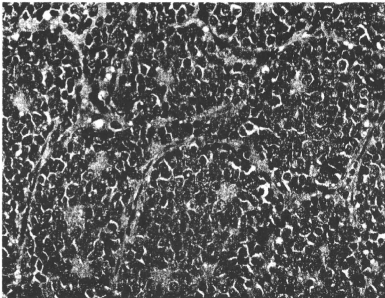


図3 PNETの組織像 図1と同様の腫瘍細胞が増殖するが、ロゼット形成が認められる。

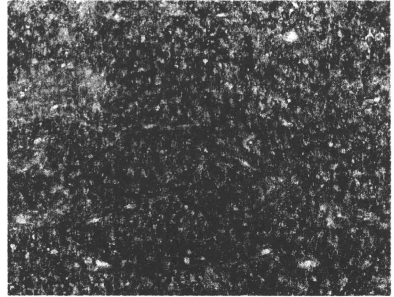


図2 Ewing肉腫のPAS染色 腫瘍細胞の細胞質にPAS染色陽性のグリコーゲンを認める。

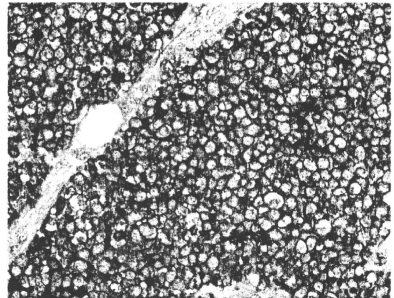


図4 Ewing肉腫のCD99染色 ほとんどの腫瘍細胞の細胞膜にCD99が陽性となる。

like Ewing肉腫と報告されている。典型的なPNETとされてきた腫瘍では、Homer Wright型ないしはFlexner-Wintersteiner型のロゼットがみられる(図3)。しかしながらEwing肉腫とPNETの組織像には、どちらも判別のつかない移行があり、両者を再現性高く区別することは困難である。また、軟骨や骨への分化を示すEwing肉腫ファミリー腫瘍も報告されているが、極めて稀である。

電子顕微鏡的には細胞質の電子密度が低い明るい細胞と暗調な2種類の細胞がみられ、いずれも円形ないし類円形の核を有している。特徴的に集簇したグリコーゲン顆粒を含んでいるが細胞内小器官の発達が悪い。PNETでは細胞突起を認めることがあり、二重膜に囲まれた小型(80~100 nm)の神経内分泌顆粒を極

めて稀に認める。

免疫組織化学的には、95%以上の症例でCD99(MIC2)に陽性、特に、細胞膜に強陽性となるのが特徴である(図4)。当初は本腫瘍に特異性が高いと考えられていたが、実際には多くの小円形細胞腫瘍において陽性となることが判明している。特にリンパ芽球性リンパ腫ではCD99が細胞膜に高率に陽性となる。また、滑膜肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、線維形成性小細胞腫瘍においても陽性となることがある。これらは形態学的にEwing肉腫ファミリー腫瘍と鑑別を要する腫瘍であり、CD99はEwing肉腫の感度の高いマーカーであるが、これに頼りすぎることなく、形態像、他の免疫染色所見、後に述べる融合遺伝子を併せて診断する必要がある。また、融合遺伝子の産物を検出す

表1 Ewing肉腫ファミリー腫瘍に認められる染色体転座と融合遺伝子

染色体転座	融合遺伝子	頻度
t (11;22)	<i>EWS-FLII</i>	80%程度
t (21;22)	<i>EWS-ERG</i>	15%程度
t (7;22)	<i>EWS-ETV1</i>	稀
t (17;22)	<i>EWS-E1AF</i>	稀
t (2;22)	<i>EWS-FEV</i>	稀
t (16;21)	<i>FUS-ERG</i>	稀
t (2;16)	<i>FUS-FEV</i>	稀

るFLII抗体の免疫染色にEwing肉腫ファミリー腫瘍の大部分が陽性となると報告されているが、こちらも特異的とはいえない。また、近年、本腫瘍の一部はサイトケラチン(AE1/AE3や高分子量ケラチン)に陽性となることが報告されている<sup>6)</sup>。多くの場合、一部の腫瘍細胞が陽性となるのみであるが、時にびまん性に陽性となることがあり、特に前述したadamantinoma-like Ewing肉腫では、サイトケラチン陽性となることが報告されている。

#### IV. Ewing肉腫ファミリー腫瘍に共通する染色体転座と融合遺伝子

Ewing肉腫ファミリー腫瘍では、約80%に特徴的な染色体転座t(11;22)とそれに由来する融合遺伝子*EWS-FLII*が存在する。(表1, 図5)<sup>7)</sup>。さらに約15%にはt(21;22)に由来する*EWS-ERG*融合遺伝子が存在する。この2つの融合遺伝子に加え、頻度は低いものの、*EWS-ETV1*, *EWS-E1AF*, *EWS-FEV*融合遺伝子が報告されている。これらはいずれも5'側が*EWS*遺伝子(*EWSRI*: Ewing sarcoma breakpoint region 1)で、3'側がETS familyに属する転写因子であり、*EWS-ETS*融合遺伝子とも呼ばれている。*EWS*遺伝子の産物は、RNA結合蛋白質と考えられ、FUS(fusion in malignant liposarcoma), TAFII68(TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa)と共にTET familyと呼ばれている。それぞれの融合遺伝子の産物には*EWS*のN末端側のtrans-activation domainとETS familyに属する転写因子のETS DNA binding domainが含まれることが共通した特徴であり、融合遺伝子は異常な転写因子として作用すると考えられている。さらに、近年、*EWS-ETS*融合遺伝子に加え、TETファミリーの一つである

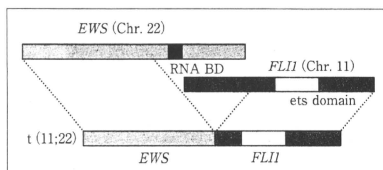


図5 融合遺伝子の模式図 *EWS*遺伝子の5'側と*FLII*遺伝子の3'側が融合し、*EWS-FLII*融合遺伝子が形成される。3'側には*FLII*遺伝子のets domainが含まれている。

*FUS*遺伝子とETSファミリーの転写因子による融合遺伝子(*FUS-ERG*, *FUS-FEV*)が報告された。

これらの融合遺伝子は、Ewing肉腫ファミリー腫瘍の発生に非常に重要な役割を演じていると考えられ、融合遺伝子が発現を調節する標的遺伝子が探索されてきた。融合遺伝子によって発現が上昇する遺伝子として、*c-Myc*, *cyclin D1*, *PDGFC*, *Nkx2.2*, *NR0B1*, *Id2*などが、発現が抑制される分子としてTGF- $\beta$  type 2 receptorやIGFBP-3などが報告されている。これらの分子に加えて、*EWS-ETS*融合遺伝子の産物はかなり多数の遺伝子の転写を直接的あるいは間接的に制御していると考えられており、融合遺伝子発現による遺伝子ネットワークの変化が腫瘍発生に必要と考えられている。

*EWS-FLII*の強制発現は、マウスの線維芽細胞であるNIH3T3細胞をトランスフォームする。さらに、Ewing肉腫ファミリー腫瘍細胞で*EWS-FLII*をノックダウンするとソフトアガー上でのコロニー形成能力が失われ、ヌードマウスでの腫瘍形成能が抑制されることが示され、*EWS-FLII*は腫瘍にとって必須であると考えられている。また、*EWS-FLII*をノックダウンした腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイルは、間葉系幹細胞に近づき、脂肪や骨への分化能を獲得することも示された<sup>8)</sup>。一方、ヒト間葉系幹細胞に*EWS-FLII*, *EWS-ERG*を発現させると、CD99の発現上昇と共に間葉系幹細胞がEwing肉腫様形態に変化し発現プロファイルもEwing肉腫ファミリー腫瘍に近づく<sup>9)</sup>。これらの結果から、間葉系幹細胞あるいはそれに近い間葉系幹細胞がEwing肉腫ファミリー腫瘍の発生母地であり、キメラ遺伝子がEwing肉腫ファミリー腫瘍様の形質を与えることが示唆される。

表2 EWS-ETS融合遺伝子における融合点の exon の組み合わせ

融合遺伝子	exon の組み合わせ	各融合遺伝子に占める割合
EWS-FLII	EWS exon 7-FLII exon 6 (type 1)	50~70% 程度
	EWS exon 7-FLII exon 5 (type 2)	20~30% 程度
	EWS exon 10-FLII exon 8	稀
	EWS exon 10-FLII exon 5	稀
	EWS exon 7-FLII exon 8	稀
	EWS exon 7-FLII exon 4	稀
EWS exon 10-FLII exon 6	稀	
EWS-ERG	EWS exon 7-ERG exon 7	多
	EWS exon 7-ERG exon 9	少
	EWS exon 7-ERG exon 6	稀
EWS-ETV1	EWS exon 7-ETV1 exon 11	
EWS-EIAP	EWS exon 7-EIAP exon 8	
EWS-FEV	EWS exon 10-FEV exon 2	
	EWS exon 7-FEV exon 2	

## V. Ewing肉腫ファミリ-腫瘍の遺伝子診断

Ewing肉腫ファミリ-腫瘍は、形態学的にも免疫組織化学的にも比較的特徴に乏しく、また、生検にてごく少量しか腫瘍成分が得られない場合もあり、病理組織学的診断の難しいことが少なくない。したがって、融合遺伝子の同定が確定診断を下すうえで、非常に有用である。筋と神経への分化を示す biphenotypic sarcoma で EWS-FLII が、線維形成小細胞腫瘍で EWS-ERG が検出されたとの報告があり、FUS-ERG が急性骨髄性白血病の一部で同定されるなど、EWS (あるいは FUS)-ETS 融合遺伝子は、Ewing肉腫ファミリ-腫瘍に100% 特異的とはいえない。しかしながら非常に特異性が高いと考えられており、病理組織学的所見と組み合わせで診断を行うことにより、より正確な診断を下すことが可能となる。一方、頻度は低いものの、融合遺伝子が検出されないが病理学的には Ewing肉腫ファミリ-腫瘍と考えざるをえない症例も存在する。このような場合は、リンパ芽球性リンパ腫や低分化型の滑膜肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍など病理組織学的鑑別診断を十分考慮した上で、Ewing肉腫ファミリ-腫瘍の診断を下すべきであろう。

### 1. RT-PCR法を用いた融合遺伝子の検出

RT-PCR法では、腫瘍組織(新鮮組織、凍結組織)よりRNAを抽出し、cDNAを合成し、PCRを行って融合遺伝子の発現を検出する。EWSとETS familyの転写因子が、様々な exon の組み合わせで融合するサブタイプが存在する(表2)。EWS-FLII融合遺伝子で

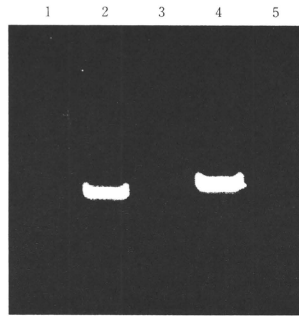


図6 RT-PCR法によるEWS-FLII融合遺伝子の検出。腫瘍(lane 2)はEWS exon 7とFLII exon 6の組み合わせ。陽性コントロール(lane 4: Ewing肉腫細胞株)はEWS exon 7とFLII exon 5の組み合わせである。FLIIのexon 5の長さの分だけ、陽性コントロールのほうがバンドが長い。lane 1: marker, lane 2: 腫瘍, lane 3: 陰性コントロール(逆転写反応無し), lane 4: 陽性コントロール, lane 5: 陰性コントロール。

は、現在知られている全ての組み合わせを検出するためには、EWS遺伝子のexon 6より上流とFLII遺伝子のexon 11より下流のプライマーを用いてPCRを行う必要がある。EWS-FLII融合遺伝子の場合、exonの組み合わせによって増幅されるバンドの長さが600塩基対以上異なり、増幅されたバンドの長さが陽性コントロールのバンドと必ずしも一致しない(図6)。パラフィン包埋ブロックを用いたRT-PCRも報告されているが、標的とする配列を100塩基程度に短くする必要があるため、それぞれのexonの組み合わせに応じたPCRプライマーの設計が必要であり、稀な組み合わせの検出は現実的には困難となる。

各融合遺伝子のサブタイプと予後には関連がないという報告もあるが、EWSのexon 7とFLIIのexon 6の融合遺伝子(type 1)とそれ以外の融合遺伝子を有する腫瘍では、前者のほうが予後が良いという報告もなされており、今後、さらに検討されるべき課題である<sup>10)</sup>。また、骨髄や末梢血における融合遺伝子の検出によって微小残存病変を感度よく検出できることが報告されているが、これらの臨床的意義は現時点では定まっていない。

### 2. FISH

捺印標本やホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いたFISH (fluorescence in situ hybridization) 法によ

り, *EWS* 遺伝子の転座を検出することが可能である。FISH法は, 蛍光顕微鏡など特殊な装置が必要であるが, 捺印標本など, ごく少量の腫瘍細胞を用いて行うことが可能という利点がある。また *EWS-FLI1*, *EWS-ERG* のみならず, 稀なタイプの転座であっても, *EWS* の再構成を示すことができる利点がある。一方で, *EWS* の転座のパートナーはわからず, 線維形成小細胞腫瘍や明細胞肉腫, 粘液型軟骨肉腫など *EWS* 遺伝子の関係する転座を有する腫瘍は, 病理組織像で鑑別する必要がある。

*EWS* 遺伝子の5'側と3'側にそれぞれ異なる蛍光色素で標識されたプローブが市販されている。転座のない染色体では, 2個のプローブ由来のシグナルはごく近接して(あるいは重なっているため黄色に)みえるが, *EWS* 遺伝子内に転座を有する細胞では, 2つのシグナルが離れ, 明瞭な緑と赤のシグナルとなる(図7)。ホルマリン固定パラフィン切片を用いたFISH法も可能であるが, 前処置が必要となること, バックグラウンドが高くなること, 感度が低下するなどの問題があり, 捺印標本のほうが望ましい。小さな腫瘍検体で凍結検体を保存できない場合も, ホルマリン固定前に, 捺印標本を製作しておくこと, 後になって転座の有無の判定に利用できる。

## おわりに

ここ数十年でEwing肉腫とPNETが同一のentityに属する腫瘍であるという概念がほぼ確立されてきた。しかしながら, Ewing肉腫ファミリー腫瘍と診断しうる最低限の要件は何であるか, CD99の陽性所見や*EWS-ETS*融合遺伝子が必須であるのかなどのコンセンサスは得られていないと思われる。いかなる単一のマーカーによっても腫瘍の確定診断をすることができないことを考えると, Ewing肉腫ファミリー腫瘍は, 臨床情報や画像情報, 病理組織像, 免疫組織化学, 遺伝子解析結果を総合して診断すべきであると考えられる。また, 融合遺伝子が腫瘍発生に果たす役割も解明されつつあり, 悪性度の高い本腫瘍の治療法開発も望まれる。

## 文 献

- 1) Ewing, J.: Diffuse endothelioma of bone. Proc NY Pathol Soc 1921, 21: 17-24
- 2) Stout, A.: Tumor of the ulnar nerve. Proc NY Pathol Soc 1918, 18: 2-12
- 3) Askin, F.B., Rosai, J., Sibley, R.K. et al.: Malignant



図7 *EWS* プローブによるFISH解析 転座のない染色体に由来するシグナルは, ごく近接して, あるいは重なっているため黄色にみえるが, 転座した染色体に由来するシグナルは, 緑と赤の2つに離れる。

small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. Cancer 1979, 43: 2438-2451

- 4) Delattre, O., Zucman, J., Melot, T. et al.: The Ewing family of tumors—a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. N Engl J Med 1994, 331: 294-299
- 5) Kovar, H.: Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union. Curr Opin Oncol 1998, 10: 334-342
- 6) Folpe, A.L., Goldblum, J.R., Rubin, B.P. et al.: Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. Am J Surg Pathol 2005, 29: 1025-1033
- 7) Urano, F., Umezawa, A., Yabe, H. et al.: Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, *EWS-EIAF*, available for diagnosis. Jpn J Cancer Res 1998, 89: 703-711
- 8) Tirode, F., Laud-Duval, K., Prieur, A. et al.: Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. Cancer Cell 2007, 11: 421-429
- 9) Miyagawa, Y., Okita, H., Nakajima, H. et al.: Inducible expression of chimeric *EWS/ETS* proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. Mol Cell Biol 2008, 28: 2125-2137
- 10) de Alava, E., Kawai, A., Healey, J.H. et al.: *EWS-FLI1* fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. J Clin Oncol 1998, 16: 1248-1255

## A study of rasburicase for the management of hyperuricemia in pediatric patients with newly diagnosed hematologic malignancies at high risk for tumor lysis syndrome

Akira Kikuchi · Hisato Kigasawa · Masahito Tsurusawa · Keisei Kawa · Atsushi Kikuta · Masahiro Tsuchida · Yoshihisa Nagatoshi · Keiko Asami · Keizo Horibe · Atsushi Makimoto · Ichiro Tsukimoto

Received: 24 February 2009 / Revised: 20 July 2009 / Accepted: 27 July 2009 / Published online: 22 August 2009  
© The Japanese Society of Hematology 2009

**Abstract** Tumor lysis syndrome (TLS), including hyperuricemia, is a frequent serious complication in patients with hematologic malignancies. This study in Japanese patients evaluated the efficacy, safety, and pharmacokinetic profile of rasburicase in pediatric patients with hematologic malignancies. Patients aged <18 years at high risk for TLS, with newly diagnosed hematologic malignancies, were randomized to intravenous rasburicase 0.15 mg/kg/day ( $n = 15$ ) or 0.20 mg/kg/day ( $n = 15$ ) for 5 days. Chemotherapy was started 4–24 h after the first rasburicase dose. Response was defined as a reduction in plasma uric acid to  $\leq 6.5$  mg/dL (patients <13 years) or

$\leq 7.5$  mg/dL (patients  $\geq 13$  years) by 48 h after the first administration, lasting until 24 h after the final administration. Response rates were 93.3 and 100% with rasburicase 0.15 and 0.20 mg/kg/day, respectively. Uric acid levels declined rapidly within 4 h of starting rasburicase administration in both groups. Most adverse events were related to the underlying chemotherapy regimens. Two hypersensitivity reactions, including grade 1/2 pruritus, were considered to be related to rasburicase. Rasburicase is effective and well tolerated for the management of hyperuricemia in Japanese pediatric patients at high risk of developing TLS.

A. Kikuchi  
Division of Hematology/Oncology,  
Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan

A. Kikuchi (✉)  
Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine,  
The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo Bunkyo-ku,  
Tokyo 113-8655, Japan  
e-mail: akikuchi-ky@umin.ac.jp

H. Kigasawa  
Department of Hemato-oncology/Regeneration Medicine,  
Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan

M. Tsurusawa  
Department of Pediatrics, Aichi Medical University Hospital,  
Aichi, Japan

K. Kawa  
Department of Hematology/Oncology,  
Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal  
and Child Health, Osaka, Japan

A. Kikuta  
Department of Pediatrics, Fukushima Medical University  
Hospital, Fukushima, Japan

M. Tsuchida  
Department of Pediatrics, Ibaraki Children's Hospital,  
Mito, Japan

Y. Nagatoshi  
Department of Pediatrics, National Kyushu Cancer Center,  
Fukuoka, Japan

K. Asami  
Department of Pediatrics, Niigata Cancer Center Hospital,  
Niigata, Japan

K. Horibe  
Department of Pediatrics, National Hospital Organization,  
Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan

A. Makimoto  
Department of Pediatrics, National Cancer Center Hospital,  
Tokyo, Japan

I. Tsukimoto  
Children's Center, Saiseikai Yokohamashi Tobu Hospital,  
Yokohama, Japan



**Keywords** Hematologic malignancies · Hyperuricemia · Pediatric · Rasburicase · Tumor lysis syndrome (TLS)

## 1 Introduction

Patients with hematologic malignancies are usually treated with aggressive chemotherapy regimens that result in the rapid destruction of tumor cells and the release of purine metabolites into the circulation [1]. This may lead to the development of tumor lysis syndrome (TLS), which is characterized by severe hyperuricemia, hyperphosphatemia, hyperkalemia, and hypocalcemia [2, 3]. Moreover, as a consequence of hyperuricemia, crystals of uric acid may form in the renal tubules and distal collecting system, leading to renal insufficiency and acute renal failure [4]. Patients with malignancies that have a high proliferation rate or a large tumor burden, such as acute lymphoblastic leukemia or Burkitt's lymphoma, have a particularly high risk of developing TLS. The metabolic disturbances resulting from TLS may lead to acute renal failure and rapidly become life threatening in pediatric patients. Appropriate management for metabolic abnormalities in these patients is therefore essential in order to reduce the risk of developing acute renal failure [5–7].

The current treatment of hyperuricemia in Japan includes urinary alkalinization, hydration, and allopurinol. Allopurinol inhibits xanthine oxidase and thus prevents the formation of uric acid and controls plasma uric acid levels during purine catabolism [4]. Allopurinol, however, cannot reduce the level of pre-existing uric acid and causes increases in serum levels of xanthine and hypoxanthine, which may lead to xanthine nephropathy [8, 9]. In addition, urinary alkalinization can cause renal precipitation of calcium phosphate [4].

Rasburicase is a recombinant form of the endogenous enzyme urate oxidase. It is produced following the proteolytic hydrolysis of *Aspergillus flavus* urate oxidase, which permits the formation of oligodeoxynucleotide probes that are used to obtain DNA fragments from *Aspergillus flavus* cDNA and genomic libraries [10]. Rasburicase is approved for the prevention and treatment of hyperuricemia in children with leukemia or lymphoma in the USA and the EU. This agent oxidizes uric acid, converting it to allantoin, a substance that is approximately 5–10 times more soluble than uric acid and is easily excreted in the urine [8]. Rasburicase is administered intravenously, making it more convenient to administer to patients with chemotherapy-associated gastrointestinal toxicities than the oral drug allopurinol. Moreover, rasburicase can reduce pre-existing uric acid levels [11].

In a US open-label, randomized study in 52 children with leukemia or lymphoma at high risk for TLS,

administration of rasburicase (0.20 mg/kg/day) for 5–7 days during induction chemotherapy achieved significantly more rapid control of uric acid and lower levels of plasma uric acid than allopurinol (300 mg/m<sup>2</sup>/day) for 5–7 days [12]. This led the investigators to conclude that rasburicase is a safe and an effective alternative to allopurinol during initial chemotherapy in pediatric patients.

The aim of this study was to investigate the efficacy, safety, and pharmacokinetic profile of rasburicase as a single agent in Japanese pediatric patients with hematologic malignancies at high risk for TLS. In particular, the safety of rasburicase administered before chemotherapy was evaluated in this patient population.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study design and patients

This was a multicenter, open-label, randomized, parallel-group study of repeated doses of rasburicase in Japanese pediatric patients with newly diagnosed hematologic malignancies at high risk of developing TLS.

The study protocol was approved by the institutional review boards of all participating centers. Written informed consent was obtained from the legally authorized representative of each patient before randomization to one of two doses of rasburicase (0.15 or 0.20 mg/kg).

Japanese pediatric patients (aged <18 years) were eligible for study entry if they had newly diagnosed hematologic malignancies with hyperuricemia (uric acid >7.5 mg/dL for patients aged ≥13 years; uric acid >6.5 mg/dL for patients aged <13 years) or newly diagnosed hematologic malignancies presenting with a high tumor burden, regardless of uric acid level [defined as non-Hodgkin's lymphoma (NHL) stage IV; NHL stage III with at least one lymph node or mass >5 cm in diameter or lactate dehydrogenase (LDH) three or more times the upper limit of normal (ULN)]; or acute leukemia with a white blood cell (WBC) count ≥50,000/mm<sup>3</sup> and LDH three or more times ULN. Patients were required to have a performance status of 3 or less on the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) scale (or 30 or more on the Lansky score) and a minimum life expectancy of 45 days. Patients received induction chemotherapy between 4 and 24 h after the first administration of rasburicase.

Exclusion criteria included the administration of allopurinol within 72 h before the start of rasburicase administration; known history of severe allergy and/or severe asthma; low birth weight (<2,500 g) or gestational age (<37 weeks); previous therapy with urate oxidase; known positive tests for hepatitis B surface antigen, hepatitis C virus antibodies, or HIV-1 or HIV-2 antibodies; severe

disorders of the liver or kidney [alanine aminotransferase (ALT) levels more than five times ULN, total bilirubin more than three times ULN, creatinine more than three times ULN]; or uncontrollable infection (including viral infection). The enzymatic conversion of uric acid to allantoin by rasburicase produces hydrogen peroxide [13]. This can lead to methemoglobinemia and hemolysis in certain “at-risk” populations such as those with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, and hence G6PD deficiency contraindicates the use of rasburicase. Therefore, patients with a known family history of G6PD deficiency, and known history of methemoglobinemia and hemolysis, were also excluded.

Randomization was performed centrally, and patients were stratified by baseline weight (<10 or ≥10 kg) until 15 patients had been enrolled in each dose group. To ensure the exact evaluation of pharmacokinetics, at least 10 patients weighing ≥10 kg were included in each dose group. The protocol did not require that a minimum number of patients weighing <10 kg should be enrolled.

## 2.2 Treatment

Rasburicase (SR29142) was supplied by sanofi-aventis (Tokyo, Japan). Patients were randomized to one of two dose groups of rasburicase (0.15 or 0.20 mg/kg). Rasburicase 0.20 mg/kg has been approved in 50 countries worldwide, but in the USA, the doses of rasburicase 0.15 and 0.20 mg/kg have been approved. Given that the efficacy of rasburicase 0.15 and 0.20 mg/kg was recently demonstrated in a previous study in adult Japanese patients [14], both these doses were selected for use in this pediatric trial. Rasburicase was administered intravenously for 30 min once daily for 5 consecutive days.

Chemotherapy, including cytoreductive corticosteroids, was started 4–24 h after the first dose of rasburicase. Separate lines were used for administration of chemotherapy and infusion of rasburicase to prevent drug–drug interactions. When this was not possible, the line was flushed with isotonic saline (≥15 mL) before and after infusion of rasburicase. Other anti-hyperuricemic agents (e.g. allopurinol) or treatment with sodium bicarbonate for urine alkalization were not permitted until the final blood sampling for plasma uric acid was completed on day 6.

## 2.3 Efficacy assessments

The primary efficacy endpoint was response rate (RR), as determined by assays of plasma uric acid concentration. Treatment was considered to be successful and the patient considered to be a responder if the plasma uric acid level decreased to ≤7.5 mg/dL in patients aged ≥13 years or

≤6.5 mg/dL in patients aged <13 years by 48 h after the start of the first rasburicase administration, and lasting until 24 h after the start of the final rasburicase administration (day 5).

Secondary endpoints included plasma uric acid concentration and change in concentration from baseline. The rate of plasma uric acid inhibition over time versus baseline was also evaluated at 4 and 48 h after the first rasburicase administration and at 24 h after the last rasburicase administration. The rate of uric acid inhibition (%) was calculated as the concentration of plasma uric acid at baseline minus the concentration of plasma uric acid at each timepoint divided by the concentration at baseline multiplied by 100. Blood samples were collected for the plasma uric acid levels ≤10 min before and 4 h (±10 min) after the first rasburicase administration on day 1; samples were also collected before rasburicase administration (±10 min) on days 2–5, and 24 h (±10 min) after the last rasburicase administration on day 6.

## 2.4 Safety assessments

Safety was assessed by clinical observations (including vital signs), standard laboratory tests, and the occurrence of adverse events (AEs). AEs were summarized by type of event and toxicity grade according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0 (translated into Japanese by the Japan Clinical Oncology Group/Japan Society of Clinical Oncology). These events were classified by each investigator as either rasburicase-related or other (related to underlying hematologic malignancies or chemotherapy). Rasburicase-related AEs were defined as all events excluding events due to the underlying disease or chemotherapy. Renal function (creatinine, potassium, phosphorus, and calcium levels) was also assessed at baseline (7 days before starting the first administration of rasburicase), and on day 3, 5, 8, 15, 22, 29, and 36.

## 2.5 Evaluation of anti-rasburicase antibodies

To evaluate the relationship between hypersensitivity reactions and the appearance of anti-rasburicase antibodies, the antibodies were assessed by qualitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at baseline and on day 29. The results were expressed qualitatively due to the lack of immunopurified reference human antibody directed against rasburicase, with the conventional properties of antibodies utilized to detect antibodies directed against rasburicase. The range of anti-human immunoglobulin calibration was between 0 and 1,000 ng/mL and plasma samples from healthy volunteers were used as reference controls. Plasma collected from healthy volunteers was assayed by ELISA

to determine background interference in the detection of anti-rasburicase immunoglobulin. If the samples were positive for anti-rasburicase antibodies on day 29, then further blood samples were collected from the patient at 6 months ( $\pm 2$  weeks) and every 6 months ( $\pm 2$  weeks) thereafter until the sample was negative. Samples that were antibody positive were analyzed for inhibition of rasburicase uricolytic activity. Anti-*S. cerevisiae* protein (SCP) antibodies were also assessed by ELISA at baseline.

## 2.6 Pharmacokinetics

The pharmacokinetic assay was performed in 10 patients (weight  $\geq 10$  kg) in each dose group at the following 10 timepoints: Day 1, before rasburicase administration (within 10 min of the start of administration), at the end of the first administration (within 10 min following completion of administration), 4 and 8 h ( $\pm 10$  min) after the start of administration; day 2, before rasburicase administration (within 10 min of the start of administration); and day 5, before rasburicase administration (within 10 min of the start of administration), at the end of administration, 4, 8, and 24 h ( $\pm 10$  min) after the last administration. A total sample of 10 mL from each patient was immediately centrifuged at  $<4^{\circ}\text{C}$  and then frozen until assay. Frozen samples were sent to the laboratories (SBI-BIO, Paris, France), where they were assayed concomitantly.

The following pharmacokinetic parameters were determined: area under the rasburicase plasma concentration–time curve from 0 to 24 h ( $\text{AUC}_{0-24}$ ) on days 1 and 5; minimum rasburicase plasma concentration observed before treatment administration during repeated dosing ( $C_{\text{min}}$ ) on days 1 and 5; plasma concentration of rasburicase at the end of infusion ( $C_{\text{eoi}}$ ) on days 1 and 5; terminal half-life ( $t_{1/2\alpha}$ ) on day 5; and accumulation ratio for  $\text{AUC}_{0-24}$  and  $C_{\text{eoi}}$  (defined as the ratio of day 5 to day 1 for  $\text{AUC}_{0-24}$  and  $C_{\text{eoi}}$ ). Rasburicase plasma concentrations were determined by ELISA.

## 2.7 Statistical analysis

All patients who received at least one dose of rasburicase were evaluated for efficacy and safety. The RR, with 95% exact binomial confidence intervals (CIs), was calculated as the number of responding patients divided by the number of evaluable patients multiplied by 100. Patients who failed to complete days 1–5 of treatment, for reasons other than hyperuricemia, were considered as nonevaluable for RR. Descriptive statistics were used to summarize uric acid concentrations, and change from baseline and the rate of plasma uric acid concentration decline over time.

For the purposes of the statistical analysis, the study had a planned sample size of 30 patients, i.e. 15 in each dose group (0.15 and 0.20 mg/kg). Assuming that the true RR would be 95% in each dose group, the probability of at least one failure among 15 patients treated with each dose of rasburicase would be 79%, with an expected lower 95% CI of 71%. Based on a sample size of 15 patients per dose group, it could therefore be concluded with 95% confidence that the true RR would be at least 71%.

Pharmacokinetic parameters for rasburicase were determined using WinNonlin Professional Edition software (version 3.3 Pharsight Corp, Mountain View, CA, USA) using a noncompartmental method. To assess drug accumulation from day 1 to day 5, the parameters  $\text{AUC}_{0-24}$  and  $C_{\text{eoi}}$  were analyzed using the linear mixed-effects model:

$$\text{Log (parameter)} = \text{dose} + \text{day} + \text{dose} \times \text{day} \\ + \text{patient (dose)} + \text{error}$$

Fixed-effect terms included dose (0.15 and 0.20 mg/kg), day (1 and 5), and the interaction term dose by day. The random-effect term was patient within dose. The model was estimated using generalized least squares (GLS) with restricted maximum likelihood (REML) estimates of random effects, using SAS<sup>®</sup> PROC MIXED.

The 95% CIs for the variance estimates were computed using the simple chi-squared method for within-patient variance, the Modified Large Sample procedure for between-patient variance, and the Graybill–Wang procedure for the total-patient variance [15].

## 3 Results

### 3.1 Patients

Between June 2005 and April 2006, 31 patients were enrolled and 30 patients were subsequently randomized and treated (rasburicase 0.15 mg/kg,  $n = 15$ ; rasburicase 0.20 mg/kg,  $n = 15$ ). One enrolled patient was not randomized to treatment because of an ineligible ALT level. This patient was excluded from the efficacy and safety analyses.

Patient baseline characteristics were similar between the rasburicase dose groups (Table 1). The median age was 8.8 years, and over half of the patients (53.3%) were aged between 6 and 12 years. Overall median weight was 30.8 kg, and one patient weighed  $<10$  kg. Most patients had an ECOG performance status of 0 (40%) or 1 (40%). A total of 43.3% of patients were hyperuricemic, and 73.3% of patients had acute leukemia. All patients were classified as high risk for TLS in accordance with the inclusion criteria (i.e. had a newly diagnosed hematologic malignancy with hyperuricemia or a high tumor burden).

**Table 1** Baseline characteristics of randomized patients

	Rasburicase		Total (n = 30)
	0.15 mg/kg (n = 15)	0.20 mg/kg (n = 15)	
Age (years)			
Median	11	7	9
Range	1–17	0–16	0–17
Age group, n (%)			
<2 years	1 (6.7)	1 (6.7)	2 (6.7)
2–5 years	2 (13.3)	4 (26.7)	6 (20.0)
6–12 years	7 (46.7)	9 (60.0)	16 (53.3)
13–17 years	5 (33.3)	1 (6.7)	6 (20.0)
Male/female, n (%)	9/6 (60.0/40.0)	10/5 (66.7/33.3)	19/11 (63.3/36.7)
Weight (kg)			
Median	44.7	25.5	30.8
Range	10.2–70.3	5.7–49.7	5.7–70.3
ECOG performance status, n (%)			
0	7 (46.7)	5 (33.3)	12 (40.0)
1	5 (33.3)	7 (46.7)	12 (40.0)
2	0 (0.0)	3 (20.0)	3 (10.0)
3	3 (20.0)	0 (0.0)	3 (10.0)
Hyperuricemic, n (%) <sup>a</sup>			
Yes	8 (53.3)	5 (33.3)	13 (43.3)
No	7 (46.7)	10 (66.7)	17 (56.7)
Diagnosis, n (%)			
Malignant lymphoma	6 (40.0)	2 (13.3)	8 (26.7)
Acute leukemia	9 (60.0)	13 (86.7)	22 (73.3)

ECOG Eastern Cooperative Oncology Group

<sup>a</sup> Defined as uric acid >7.5 mg/dL in patients ≥13 years or uric acid >6.5 mg/dL in patients <13 years at baseline

### 3.2 Administration of rasburicase

Twenty-nine of 30 patients completed days 1–5 of treatment; one patient in the rasburicase 0.20 mg/kg group withdrew from the study on day 1 after the first administration of rasburicase due to the lack of WBC count at baseline. Another patient (0.15 mg/kg group) completed 5 days of treatment but withdrew from the study on day 8 to avoid life-threatening complications due to three concomitant grade 4 AEs (cerebral hemorrhage, brain edema, and brain herniation). Fifteen patients in the 0.15 mg/kg group and 14 patients in the 0.20 mg/kg group were therefore evaluable for response.

### 3.3 Efficacy

The overall RR for all patients was 96.6% (95% CI 82.2–99.9%) (Table 2). The RR was slightly higher in the rasburicase 0.20 mg/kg group than in the 0.15 mg/kg group (100% [95% CI 76.8–100.0%] vs. 93.3% [95% CI 68.1–99.8%]).

RRs for patients with hyperuricemia at baseline were 87.5 and 100.0% in the rasburicase 0.15 and 0.20 mg/kg groups, respectively (Table 2).

Mean plasma uric acid concentrations by dose of rasburicase over time are presented in Fig. 1. Rasburicase produced a rapid decrease in plasma uric acid concentrations in both dose groups. Uric acid levels remained low throughout treatment in all patients except one non-responder in the 0.15 mg/kg group. Uric acid levels declined rapidly within 4 h of the first rasburicase dose in both dose groups and remained low up to 120 h after the first administration of rasburicase (Fig. 1). Mean plasma uric acid concentrations were reduced by 84.8% (95% CI 76.7–92.9%) and 92.9% (95% CI 88.7–97.0%) compared with baseline at 4 h after the first rasburicase administration for the 0.15 and 0.20 mg/kg groups, respectively. Reductions in the level of plasma uric acid were similar between the two groups at 24 h after the last administration of rasburicase on day 6 (approximately 88%).

### 3.4 Safety

Owing to the severity of the underlying disease, all patients experienced at least one grade 3/4 AE, regardless of rasburicase treatment. The most common grade 3/4 AEs were leukopenia (86.7% of patients), neutropenia (83.3%), lymphocytopenia (80.0%), and increased ALT levels