

# 神経芽腫における外科的療法の役割

獨協医科大学越谷病院小児外科 池田 均

## KEY WORDS

- 神経芽腫
- 外科療法
- IDRF

## はじめに

神経芽腫を含む小児癌の治療成績は化学療法の進歩により格段に向上した。しかし治療は手術，化学療法，放射線療法の組み合わせによる集学的治療が原則で，各療法が的確に実施されることが生命予後はもちろん，治療合併症や晩期合併症を軽減し治療後の良好なQOLを保証するためにもきわめて重要である。本稿では神経芽腫の治療における外科療法の役割について概説する。

## I. 神経芽腫の特徴

神経芽腫の外科療法に際しては，神経芽腫の発生や生物学的特性，治療などについてその特徴をよく理解しておく必要がある。神経芽腫は外胚葉由来の神経堤細胞から発生する腫瘍で，80%は副腎または腹部の交感神経組織が原発巣となる。残る20%は縦隔の交感神経組織に原発し，頸部や骨盤の交感神経組織に発生する神経芽腫もまれ

にある。すなわち神経芽腫の原発部位は頸部から骨盤まで広く分布し，原発部位ごとに腫瘍の局在，進展などに特徴がある。たとえば，頸部原発の例では腫瘍による頸部血管の巻き込みや気道圧迫の危険があり，頸部から上縦隔原発の場合には腫瘍摘除によりHorner徴候が必発と考えてよい。下部胸椎に接する神経芽腫ではしばしば腫瘍が横隔膜の上下に連続して進展することがあり，また摘除に際しては脊髄栄養血管を損傷する可能性もある。交感神経幹に発生した腫瘍が椎間孔から脊椎管内へ進展する場合にはdumbbell型と呼ばれ，腫瘍摘除のために椎弓切除を行うと脊椎変形の原因となる。腹部原発の場合にはしばしば腫瘍が大動脈や腹腔動脈，上腸間膜動脈，腎動脈などを巻き込んでおり，一次的摘除が困難なことが多い。また副腎，後腹膜いずれの原発でも腎や横隔膜への直接浸潤を認めることがあり，これも腫瘍の一次的摘除を困難とする要因となる。

このように神経芽腫，特に周囲に進

Surgical treatment of  
neuroblastoma.

Hitoshi Ikeda (教授)

表. 神経芽腫のIDRFs(一部抜粋)<sup>3)</sup>

---

|  |
|--|
| Ipsilateral tumor extension within two body compartments                                 |
| Neck   |
| ・ Tumor encasing carotid and/or vertebral artery and/or internal jugular vein            |
| ・ Tumor extending to base of skull   |
| ・ Tumor compressing the trachea  |
| Cervico-thoracic junction  |
| ・ Tumor encasing brachial plexus roots   |
| ・ Tumor encasing subclavian vessels and/or vertebral and/or carotid artery               |
| ・ Tumor compressing the trachea  |
| Thorax   |
| ・ Tumor encasing the aorta and/or major branches   |
| ・ Tumor compressing the trachea and/or principle bronchi                                 |
| ・ Lower mediastinal tumor, infiltrating the costo-vertebral junction between T9 and T12  |
| Thoraco-abdominal  |
| ・ Tumor encasing the aorta and/or vena cava  |
| Abdomen/pelvis   |
| ・ Tumor infiltrating the porta hepatis and/or the hepatoduodenal ligament                |
| ・ Tumor encasing branches of the superior mesenteric artery at the mesenteric root       |
| ・ Tumor encasing the origin of the celiac axis, and/or of the superior mesenteric artery |
| ・ Tumor invading one or both renal pedicles  |
| ・ Tumor encasing the aorta and/or vena cava  |
| ・ Tumor encasing the iliac vessels   |
| ・ Pelvic tumor crossing the sciatic notch  |
| Intraspinal tumor extension  |
| Infiltration of adjacent organs/structures   |

---

注) 詳細は文献<sup>3)</sup>を参照のこと。

展や浸潤した例では、その外科的摘除は決して容易でない。しかし神経芽腫は一般に化学療法によく反応するため、化学療法後の二期手術であれば一期手術に比し合併症の危険を回避し、腫瘍摘除が可能となる例も多い。また神経芽腫では乳児など一部の症例に自然退縮が認められ、良性の神経節腫への分化をうかがえる例があることも事実で、特に侵襲の大きい摘除術の適応に関しては慎重な判断が必要となる<sup>1)2)</sup>。近年、一期的腫瘍摘除により合併症を引き起こす可能性の高い画像所見を image defined risk factors (IDRFs) (表) と規定し、IDRFの有無を腫瘍摘除可否の共通の判断基準に用いることが提唱されており<sup>3)</sup>、わが国でも治療合併症の軽減という観点からその有用性を検証

すべく、前向きของกลุ่ม研究が行われている。

一方、神経芽腫の治療はリスクによりその基本方針を異にする。現在、神経芽腫は病期、年齢、癌遺伝子MYCNの増幅の有無、組織型、DNA ploidy などにより悪性度を低・中間・高の3つのリスクに分類し、リスクに応じた治療方針が選択される。したがって外科療法も腫瘍のリスクにより治療において担う役割やそのタイミングなどが異なる。前述のごとく、神経芽腫は化学療法によく反応し、特に高リスクの神経芽腫ではその多くが遠隔転移例や局所進展例であるため、手術より全身療法としての化学療法が治療の主体となる。しかし手術や放射線療法の組み合わせにより原発巣の確実なコント

ロールを得ることは生命予後の向上に寄与し<sup>4)-10)</sup>、同時に全身療法としての化学療法を必要最小限とし成長・発達障害、臓器機能障害、生殖機能障害、二次癌の発生などの晩期合併症の可能性を軽減すると期待される。したがって外科医は、治療全体における局所療法としての外科療法の役割などについて治療チームとの間に共通の理解や認識を有すべく討議を重ねておく必要がある。

## II. 外科手技の実際

### 1. 中心静脈ルートの確保

治療開始時に静脈栄養、薬剤投与、採血などを目的とする中心静脈カテーテルを挿入することも外科医の役割である。鎖骨下静脈や外頸静脈などを挿

入ルートとし、挿入法は穿刺またはカットダウンによる。カフ付きカテーテル、皮下埋め込み型ポートのいずれを用いてもよいが、乳幼児の場合には前者を用いることが多い。

## 2. 生検

神経芽腫のリスク判定および治療方針の決定には組織型や生物学的特性の診断が必須であり、無治療経過観察例などの一部の例外を除いて腫瘍の生検を行う。生検法には針生検、切除生検 (incisional biopsy) および摘出生検 (excisional biopsy) があるが、検体保存のための標本採取の意味も含めて十分量の腫瘍組織を採取すべきであり、患児の状態が許せば切除生検または摘出生検を選択する。全身状態がきわめて不良な場合には針生検による腫瘍採取、または骨髄穿刺による骨髄採取で確定診断を行い、治療を開始する場合もある。また切除生検は開創手術が原則であるが、十分量の腫瘍を採取し、かつ生検部位からの出血をコントロールできることを条件に鏡視下手術で行ってもよい。

## 3. 腫瘍摘除

神経芽腫の場合、腫瘍摘除は原発巣の摘除を意味し、単発の肝や皮膚転移などの例外を除いて通常、転移巣が摘除の対象となることは少ない。腫瘍摘除は一期または二期手術により行うが、前述のごとく化学療法への反応性や放射線療法の効果を考慮し、また特に乳児例では自然退縮や神経節腫への分化を期待し、腎や主要血管の合併切除や臓器機能障害を残すような侵襲の大きい手術は可及的に回避する。侵襲が大きくなると判断される例で摘除を行う

場合には、化学療法後の二期手術を選択する。リンパ節に関しては領域リンパ節の系統的郭清は行わず、腫大したリンパ節の摘除と病期診断のためのリンパ節生検 (サンプリング) を行うにとどめる。

## Ⅲ. リスクによる治療と外科療法

### 1. 低リスク

低リスクの治療成績は良好であり、治療合併症や晩期合併症を避けるべく治療を行う。1歳未満の乳児例で stage 1~3、かつMYCN非増幅の症例では腫瘍摘除と低強度の化学療法で治療を行う。腫瘍が完全摘除された stage 1では化学療法を省略できる。腫瘍が完全摘除できない stage 2, 3の場合でも、乳児では臓器や大血管を合併切除するような手術は適応としない。たとえ腫瘍が残存しても最小限の化学療法で治癒を期待できる。

stage 4Sの神経芽腫では自然退縮の可能性が高く、無症状の症例では積極的な治療を省略できる。しかし短期間のうちに腫瘍が増大し呼吸障害や臓器障害により死亡する例もしばしば経験され、本病期の治療方針の選択にはきわめて慎重な態度が必要である。ただしこのような例でも、腫瘍に対する最小限の治療と、呼吸障害、臓器障害に対する集中治療で治癒に導ける可能性が十分にある。一般に、stage 4Sにおいても原発巣の摘除が勧められるが、実際には肝腫大などにより摘除が困難で転移巣の生検のみで治療を開始する例も多い。肝腫大により呼吸困難のコントロールが難しく、化学療法や緊急照射の効果が間に合わない場合には、

緊急処置として腹壁の開創による腹腔の減圧術を行うこともある<sup>11)</sup>。一方、無症状で発見された新生児期の stage 4Sなどでは自然退縮を期待し、生検も含めて全く無処置、無治療で経過観察できる例もある<sup>12)</sup>。

### 2. 中間リスク

中間リスクの神経芽腫では主に腫瘍の摘除が困難な stage 3および遠隔転移を伴う stage 4の症例が対象になるので、生検により神経芽腫の確定診断を得た後、化学療法を先行させて治療を開始する。低リスクに比し治療強度の強い多剤併用療法を用いるが、通常、造血幹細胞移植を併用する超大量化学療法は用いない。手術は化学療法により腫瘍が縮小し、臓器損傷や機能障害を引き起こすことなく安全に摘除できると判断される時点で行うことが望ましい。

### 3. 高リスク

高リスクはMYCN増幅例や、非増幅でも骨や遠隔リンパ節に転移を伴う例が大部分を占める。1歳未満の乳児にも2~3%の頻度でMYCNの増幅例があり、これも高リスクとしての治療対象になる。高リスク神経芽腫に対しては外科療法、化学療法、放射線療法、さらに造血幹細胞移植を併用した超大量化学療法を組み合わせた強力な治療が行われる。通常、治療開始時の腫瘍摘除は困難で、生検の後に寛解導入を目的とする多剤併用化学療法を開始する。すなわち寛解導入療法の後に腫瘍の縮小を待って原発巣と腫大リンパ節を摘除する。腫大のないリンパ節は転移の有無を検索するサンプリングにとどめる。高リスク例でも手術と放射線

療法の組み合わせにより原発巣のコントロールと一定の生命予後, さらには化学療法による晩期合併症などの軽減を期待し得るため, 臓器損傷や機能障害を可及的に回避して腫瘍の摘除を行う。同時に手術のタイミングや侵襲が化学療法の実施を遅らせることのないようにも留意する。

#### IV. 外科的 oncologic emergency

脊髄横断障害の原因になる dumb-bell型の腫瘍進展およびstage 4Sの肝腫大による呼吸障害(前述)は神経芽腫に特徴的な oncologic emergencyである。いずれも化学療法あるいは放射線療法による対処が第1選択とされるが, 速やかな効果が期待できない場合には外科的対処が求められる。

#### 文 献

- 1) Ikeda H, Suzuki N, Takahashi A, et al : Surgical treatment of neuroblastomas in infants under 12 months of age. *J Pediatr Surg* 33 : 1246-1250, 1998
- 2) Hero B, Simon T, Spitz R, et al : Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression : results of the prospective trials NB95-S and NB97. *J Clin Oncol* 26 : 1504-1510, 2008
- 3) Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, et al : The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system : an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27 : 298-303, 2008
- 4) Ikeda H, August CS, Goldwein JW, et al : Sites of relapse in patients with neuroblastoma following bone marrow transplantation in relation to preparatory "debulking" treatments. *J Pediatr Surg* 27 : 1438-1441, 1992
- 5) Tsuchida Y, Yokoyama J, Kaneko M, et al : Therapeutic significance of surgery in advanced neuroblastoma : a report from the study group of Japan. *J Pediatr Surg* 27 : 616-622, 1992
- 6) Kaneko M, Ohkawa H, Iwakawa M : Is extensive surgery required for treatment of advanced neuroblastoma? *J Pediatr Surg* 32 : 1616-1619, 1997
- 7) Castel V, Tovar JA, Costa E, et al : The role of surgery in stage IV neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 37 : 1574-1578, 2002
- 8) Kuroda T, Saeki M, Honna T, et al : Clinical significance of intensive surgery with intraoperative radiation for advanced neuroblastoma : dose it really make sense? *J Pediatr Surg* 38 : 1735-1738, 2003
- 9) La Quaglia 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
- 10) Rich BS, McEvoy MP, LaQuaglia MP, et al : Local control, survival, and operative morbidity and mortality after re-resection, and intraoperative radiation therapy for recurrent or persistent primary high-risk neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 46 : 97-102, 2011
- 11) Schnauffer L, Koop CE : Silastic abdominal patch for temporary hepatomegaly in Stage IV-S neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 10 : 73-75, 1975
- 12) Nuchtern JD : Perinatal neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg* 15 : 10-16, 2006

■ 特集 小児腫瘍における多施設共同臨床試験の背景と進捗

# 神経芽腫低・中間リスク群に対する臨床研究における IDRF の評価と外科治療ガイドライン

日本神経芽腫研究グループ (JNBSG)

田尻 達郎\* 米田 光宏 家原 知子 常盤 和明  
 連 利博 菊田 敦 菊地 陽 金川 公夫  
 北村 正幸 中川原 章 中澤 温子 高橋 秀人  
 瀧本 哲也 福島 敬 金子 道夫 原 純一  
 池田 均

## はじめに

神経芽腫の病期分類としては、International Neuroblastoma Staging System (INSS) が長年使用されてきた<sup>1,2)</sup>。International Neuroblastoma Risk Group (INRG) においては、治療前の画像評価による staging が取り入れられようとしている<sup>3)</sup> (表 1)。このなかで用いられている image defined risk factors (IDRF) は、局所性神経芽腫の症例に対し、画像所見から手術のリスクを推定し、初期手術として摘出を試みるのか生検のみでとどめるのかを判定するための評価項目である。多施設共同で臨床試験を行う際に、生検か摘出かの方針を決める「共通の基準」を策定するのがその目的で、ヨーロッパの多施設共同研究により surgical risk factor (SRF) として提唱された<sup>4)</sup>。

2005 年に報告されたヨーロッパの他施設共同研究の結果によれば、評価可能であった 719 例の局所性神経芽腫症例のうち、352 例 (49%) において SRF が認められている。また、初期手術とし

表 1 INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System : 国際神経芽腫リスク分類)

| Stage |   |
|-------|---|
| L1    | Locoregional tumor not involving vital structures as defined by the list of Image Defined Risk Factors<br>(IDRF で定義される主要な臓器・構造を巻き込んでいない局所性腫瘍) |
| L2    | Locoregional tumor with presence of one or more Image Defined Risk Factors<br>(1 項目以上の IDRF を有する局所性腫瘍)  |
| M     | Distant metastatic disease (except Stage Ms)<br>〔遠隔転移例 (Stage Ms を除く)〕  |
| Ms    | Metastatic disease confined to skin and/or liver and/or bone marrow<br>(皮膚, 肝, 骨髄に局限した遠隔転移例)  |

て摘出を試みた 518 例のうち 45 例 (8.7%) に術後合併症を認めたが、155 例の SRF 陽性例においては 27 例 (17.4%)、363 例の SRF 陰性例においては 18 例 (5.0%) に合併症が認められ、統計学的に有意に SRF 陽性例において術後合併症の頻度が高かった<sup>4)</sup>。したがって、SRF 陽性例においては術後合併症が発生する可能性が高く、この場合、術前化学療法を選択し、腫瘍の縮小を待って摘出を行うべきであるとされる。

この結果に基づいて国際的に IDRF を局所性神

Tatsuro Tajiri Akihiro Yoneda Tomoko Iehara  
 Kazuaki Tokiwa Toshihiro Muraji Atsushi Kikuta  
 Akira Kikuchi Kimio Kanegawa Masayuki Kitamura  
 Akira Nakagawara Atsuko Nakazawa Hideto Takahashi  
 Tetsuya Takimoto Takeshi Fukushima Michio Kaneko  
 Junichi Hara Hitoshi Ikeda

\* 九州大学大学院医学研究院小児外科  
 [〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1]

表 2 IDRf—Image Defined Risk Factors

|  |
|--|
| <p>Ipsilateral tumor extension within two body compartments<br/>(以下 2 つの部位に進展している片側性腫瘍)<br/>Neck-chest, chest-abdomen, abdomen-pelvis<br/>(頸部-胸部, 胸部-腹部, 腹部-骨盤)</p>  |
| <p>Neck (頸部):<br/>Tumor encasing carotid and/or vertebral artery and/or internal jugular vein<br/>(頸動脈, 椎骨動脈, 内頸動脈を巻き込んでいる腫瘍)<br/>Tumor extending to base of skull<br/>(頸蓋部に浸潤している腫瘍)<br/>Tumor compressing the trachea<br/>(気管を圧迫している腫瘍)</p>  |
| <p>Cervico-thoracic junction (頸胸部):<br/>Tumor encasing brachial plexus roots<br/>(腕神経叢根を巻き込んでいる腫瘍)<br/>Tumor encasing subclavian vessels and/or vertebral and/or carotid artery<br/>(鎖骨下胸静脈, 頸動脈, 椎骨動脈を巻き込んでいる腫瘍)<br/>Tumor compressing the trachea<br/>(気管を圧迫している腫瘍)</p>  |
| <p>Thorax (胸部):<br/>Tumor encasing the aorta and/or major branches<br/>(大動脈またはその分枝を巻き込んでいる腫瘍)<br/>Tumor compressing the trachea and/or principal bronchus<br/>(気管または主気管支を圧迫している腫瘍)<br/>Lower mediastinal tumor, infiltrating the costo-vertebral junction between T9 and T12<br/>(Th9-Th12 の肋椎関節に浸潤する下部縦隔腫瘍)</p>   |
| <p>Thoraco-abdominal (胸腹部):<br/>Tumor encasing the aorta and/or vena cava<br/>(大動脈または下大静脈を巻き込んでいる腫瘍)</p>   |
| <p>Abdominal/pelvic (腹部/骨盤):<br/>Tumor infiltrating the porta hepatica and/or the hepatoduodenal ligament<br/>(肝門部または肝十二指腸靱帯に浸潤している腫瘍)<br/>Tumor encasing the branches of the superior mesenteric artery at the mesenteric root<br/>(腸間膜根部で上腸間膜動脈の分岐を巻き込んでいる腫瘍)<br/>Tumor encasing the origin of the celiac axis, and/or of the superior mesenteric artery<br/>(腹腔動脈幹起始部または上腸間膜動脈起始部を巻き込んでいる腫瘍)<br/>Tumor invading one or both renal pedicles<br/>(片側または両側腎莖部に浸潤している腫瘍)<br/>Tumor encasing the aorta and/or vena cava<br/>(大動脈または下大静脈を巻き込んでいる腫瘍)<br/>Tumor encasing the iliac vessels<br/>(腸骨血管を巻き込んでいる)<br/>Pelvic tumor crossing the sciatic notch<br/>(大坐骨切痕を越える骨壁腫瘍)</p> |
| <p>Intraspinal tumor extension whatever the location provided that<br/>(椎管内腫瘍浸潤: 何れのレベルでも):<br/>More than one third of the spinal canal in the axial plane is invaded<br/>(横断像で椎管内の 1/3 以上を腫瘍が占めている)<br/>and/or the paravertebral epidural spaces are not visible<br/>(または脊髄周囲クモ膜下腔が腫瘍浸潤により消失している)<br/>and/or the spinal cord signal is abnormal<br/>(または脊髄の異常信号が認められる)</p>  |
| <p>Involvement of adjacent organs/structures (隣接する臓器・構造に浸潤している):<br/>Pericardium (心膜), diaphragm (横隔膜), kidney (腎臓), liver (肝臓), duodenum-pancreatic block<br/>(膵頭十二指腸) and mesentery (腸間膜)</p>  |
| <p>Conditions to be recorded but not considered IDRf (IDRf の範囲に含まれないが, 記憶すべき事項):<br/>Multifocal primary tumors (多中心性腫瘍)<br/>Pleural effusion, with or without malignant cells (胸水: 悪性細胞を含む場合も含まない場合も)<br/>Ascites, with or without malignant cells (腹水: 悪性細胞を含む場合も含まない場合も)</p>   |

(Monclair ら<sup>3)</sup>, 2009 より改変抜粋)

経芽腫のリスク分類に取り入れることが決定されている。そこで、国際的な流れに沿ってわが国における神経芽腫臨床研究を行うため、JNBSGにおいては局所性神経芽腫症例に IDRF を適用し、その妥当性を評価することとなり、神経芽腫低・中間群に対する臨床研究「IDRF に基づき手術時期の決定を行う神経芽腫低リスク群の観察研究」と「IDRF に基づく手術適応時期の決定と段階的に強度を高める化学療法による神経芽腫中間リスク群に対する第Ⅱ相臨床試験」においては、局所性神経芽腫の治療方針を決定する際に IDRF を用いてリスク評価を行い、手術適応を決定する方針とした<sup>5)</sup>。本稿においては、神経芽腫低・中間リスク群に対する臨床研究における IDRF の評価と外科治療ガイドラインについて紹介する。両臨床研究の全体的なプロトコールについては次の家原先生の総説にてご説明していただく。

## I. IDRF の定義と評価方法および注意点

治療前の画像所見（造影 CT または MRI）を用い、IDRF の有無を判定する。この際、放射線専門医による読影が行われることが望ましい。

それぞれの原発巣の占拠部位に応じて、表 2 に示すような IDRF の項目について判定する。原発巣の部位に対応した項目すべてについて臨床研究の「治療開始時報告書」における「治療開始時 IDRF checklist」にて評価を行い、1 項目でも該当すれば、IDRF 陽性と判断する。

最近、IDRF に関するガイドラインに関して、INRG のプロジェクトとして「Guidelines for Imaging and Staging of Neuroblastic Tumors: Consensus Report from the International Neuroblastoma Risk Group Project」という論文が雑誌 Radiology に発表された<sup>6)</sup>。低中間リスク群臨床研究における IDRF の判定も、この論文を参考にしているが、とくにもっとも重要となる血管系に対する判定規準は、encased であれば IDRF 陽性、そのほかの項目では yes であれば IDRF 陽性とする。血管に対する contact, encased の判定基準を示す画像（図 1）とシエーマ（図 2）を提示する。すなわち、動脈に関しては、血管が全周性に腫瘍に取り囲まれていた場合（total encasement）、あるいは、動

脈管腔の半周以上腫瘍に取り囲まれていた場合（contact $\geq$ 50%）を encased（+）として IDRF 陽性とし、動脈管腔の半周未満しか腫瘍に取り囲まれていない場合は contact（+）として IDRF 陰性とする。また、静脈に関しては、腫瘍に圧迫されて、内腔がつぶれて同定できない場合（no visible lumen）が encased（+）として IDRF 陽性であり、内腔が同定できる場合は、contact（+）として IDRF 陰性とする。

IDRF 判定における注意点を以下に記載する。

### 1. Tumor compressing the trachea

画像上気道への圧迫があれば陽性とする。したがって厳密に trachea への圧迫はなくても、上気道の閉塞をもたらす腫瘍があれば陽性と判断する。

### 2. Lower mediastinal tumor, infiltrating the costo-vertebral junction between T9 and T12

これは切除により脊髄への血行障害が生じる可能性がある腫瘍に適用される。したがって、たとえ腫瘍径が小さくても、Adamkiewicz 動脈を切離す可能性があるれば、脊髄の虚血から術後対麻痺を生じるリスクがある。

### 3. Pelvic tumor crossing the sciatic notch

これは骨盤内からのアプローチだけでは腫瘍切除が不可能である場合に IDRF 陽性と判断する。したがって、大きく坐骨切痕を越えて背側に伸展する腫瘍が該当する。

### 4. Dumbbell tumors with symptoms of spinal cord compression

Dumbbell 腫瘍は、以下の①～③のうち 1 つでも該当すれば IDRF 陽性と判断する。

- ① 横断像で脊椎管内の 1/3 以上を腫瘍が占めている。
- ② 脊髄周囲くも膜下腔が腫瘍浸潤により消失している。
- ③ 脊髄の異常信号が認められる。

### 5. 筋肉への浸潤について

後腹膜腫瘍が腸腰筋に浸潤する場合など筋肉への浸潤がみられることがあるが、筋肉は合併切除可能と考え、筋肉への浸潤は IDRF 陽性とはみなさない。

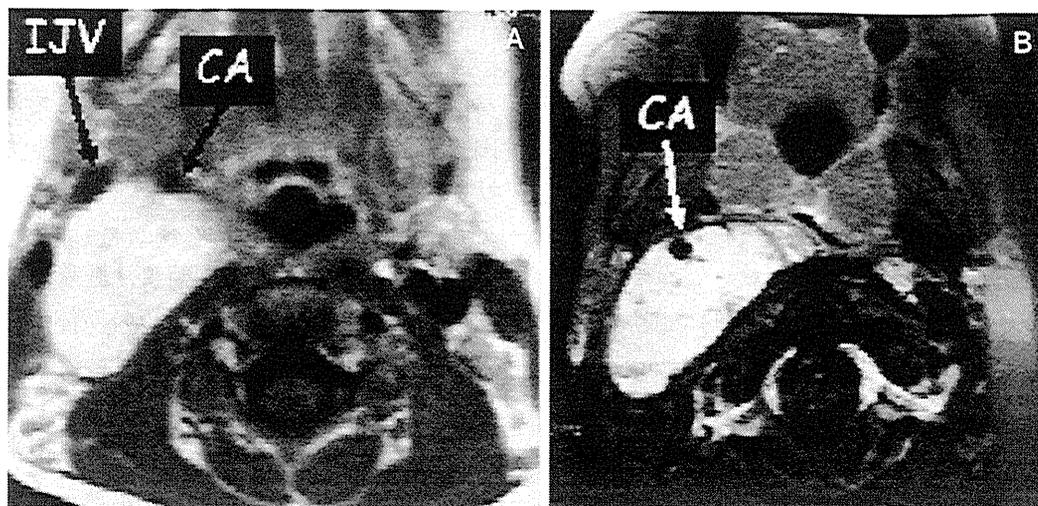


図 1 IDRF 判定基準画像 (MRI)

A. Contact (+) (IDRF 陰性), B. Encased (+) (IDRF 陽性)。

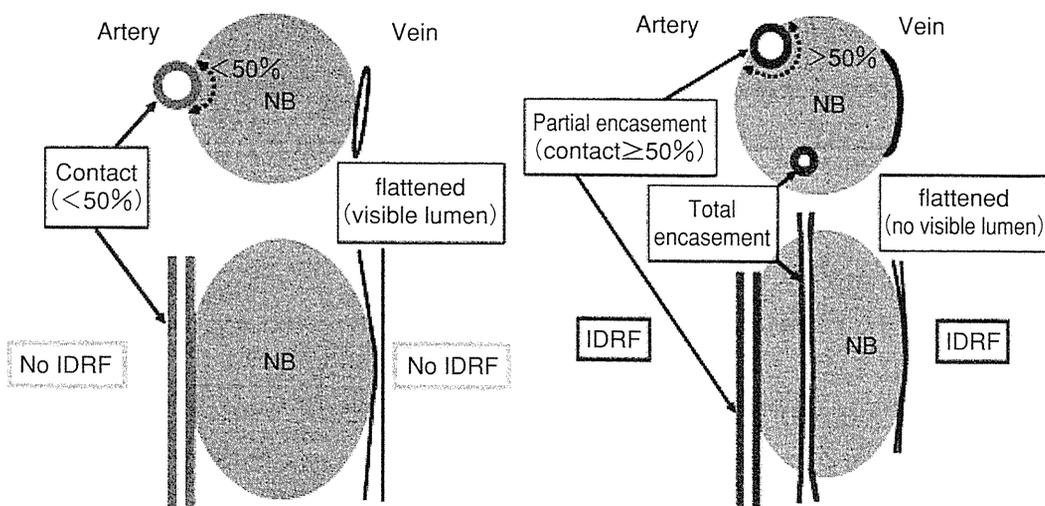


図 2 IDRF 判定基準シェーマ

動脈に関しては、血管が全周性に腫瘍に取り囲まれていた場合 (total encasement), あるいは、動脈管腔の半周以上腫瘍に囲まれていない場合 (contact  $\geq 50\%$ ) を encased (+) として IDRF 陽性とし、動脈管腔の半周未満しか腫瘍に取り囲まれていない場合は contact (+) として IDRF 陰性とする。また、静脈に関しては、腫瘍に圧迫されて、内腔がつぶれて同定できない場合 (no visible lumen) が encased (+) として IDRF 陽性であり、内腔が同定できる場合は、contact (+) として IDRF 陰性とする。  
(Brisse ら<sup>6)</sup>, 2011より抜粋)

## 6. 陽性率について

ヨーロッパの報告によれば、局所性神経芽腫のうち約 50% の症例において IDRF 陽性であった<sup>4)</sup>。わが国の施設内検討では、30% 弱の症例において IDRF 陽性であったが、これはマスキリング発見例を多く含んでいたためと考えられ、スクリーニング休止後のわが国においては、

ヨーロッパの報告に近い陽性率になるとと思われる<sup>5)</sup>。

## II. 低中間リスク群における外科治療ガイドライン

低中間リスク群における外科治療のガイドラインを以下に示す。

## 1. 初期手術適応について

- (1) 術前画像評価（造影 CT または MRI）による IDRF を有しない症例  
一期的手術を行う。
- (2) 術前画像評価（造影 CT または MRI）による IDRF を 1 つでも有する症例  
生検のみとする。

※IDRF による初期手術適応は、原則的に限局性神経芽腫に対して用いられるものであり、stage 4/4S 症例の原発腫瘍の初期手術適応と手法については施設判断とする。

## 2. 一期的初期手術ガイドライン（限局性神経芽腫）

限局性神経芽腫（stage 3）に対して原発部位にかかわらず、IDRF が陰性であれば、原則として周囲臓器を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一塊としての切除を目指す。IDRF 陰性でも術中の所見で、腫瘍を摘出するために臓器合併切除や主要血管の損傷を回避できない場合は、生検にとどめる。

### (1) 副腎、後腹膜原発

① 肝、腎、膵、脾臓を温存して腫瘍を摘出する。腎動脈の攣縮にはキシロカインに浸したガーゼで包み、攣縮を軽減しつつ手術を施行し、腎温存に留意する。

### (2) 縦隔（ダンベル型）

① 腫瘍は椎間孔入口部のレベルまで切除し、神経損傷を避ける。

② また、椎弓切除は原則的には行わない（後腹膜原発の場合も同様とする）。

③ ただし、脊髄圧迫症状出現後、短期間（通常 72 時間以内）で手術が可能な場合は脊椎管内腫瘍摘出を行ってもよい。

### (3) 頸部

① 頸動脈、鎖骨下動脈などの主要血管、神経の損傷は避けて腫瘍の切除を行う。

### (4) 仙骨前

① 内外腸骨動脈などの主要血管の損傷を避けて腫瘍の切除を行う。

② 神経根の温存に留意する。

### (5) リンパ節の郭清

① 原則として系統的リンパ節郭清は行わず、臨

床病期決定のためのサンプリングのみを行う。

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、触診上で活動的な腫瘍があると考えられるリンパ節は切除する。

## 3. 生検ガイドライン

(1) 組織学的診断と同時に、腫瘍の生物学的特性の評価や遺伝子検索のための検体も確保できるよう、安全性に十分配慮したうえで可能な限り十分量の組織の採取を行う。

(2) すなわち少なくとも 1 cm 角相当の腫瘍を採取することが望ましく、針生検による腫瘍採取は本ガイドラインでは推奨しない。

(3) 生検部位としては原発巣が望ましいが、明らかに転移を有する大きなリンパ節からでもよい。

(4) 腫瘍塊をみて肉眼的に性状が異なる（白色部と赤色部）と判断される場合には、両者から生検を行う。

(5) 中心壊死している場合があるので、被膜直下の部をできるだけ鋭的に（腫瘍挫滅を避けるため）採取する。

(6) これらの作業は鏡視下で行える場合は、その侵襲度の軽減というメリットから鏡視下生検を考慮してもよいが、現時点では腹腔鏡下生検術は、推奨できる証拠がない。

## 4. Second look operation の適応とガイドラインについて

(1) 限局性神経芽腫（stage 3）に対して

所定の化学療法が終了し、IDRF 陰性で、腫瘍マーカー陽性、あるいは MIBG シンチ陽性の場合には second look operation の適応となる。ただし、IDRF 陰性で、腫瘍マーカー陰性かつ MIBG シンチ陰性の場合の second look operation の施行に関しては施設判断とする。診断時に IDRF 陽性であった症例は、たとえ化学療法後に IDRF が陰性となったとしても、外科的合併症について十分注意して second look operation を行うべきである。所定の化学療法が終了後に IDRF 陽性の場合、原則的には治療スケジュールにあるように second look operation の適応ではないが、外科合併症を十分考慮したうえで、施設の判断により経過観察を

行うか、または部分摘出の選択が可能。すなわち、所定の化学療法終了後の各施設判断による second look operation の施行の有無によって本研究の治療スケジュールに適合しているかどうかを判定されることはない。また second look operation の施行の有無にかかわらず、IDRF の有効性の評価もこの研究の目的の範囲であるので、化学療法後の IDRF 評価を CRF として報告する。

切除に関しては一期的初期手術と同じく、原発巣の摘出に関しては、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。リンパ節郭清に関しても、一期的初期手術と同様であるが、2.0 cm 以上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。

(2) stage 4 症例の second look operation のガイドラインについて

stage 4 症例に関しての原発巣の second look operation に関しては、原則的に、高リスク群の外科療法ガイドラインに準ずることとする。

### III. 手術報告書と手術関連合併症の調査

低リスク群における観察研究、中間リスク群における臨床試験のいずれにおいても、評価項目の1つに手術関連合併症の発生割合があることから手術関連合併症を含む手術報告書を提出していただくことになっている。適格・不適格を問わず、手術が施行された患者数(全治療例)を分母とし、「外科的切除に関連した有害事象/手術合併症」の記載にしたがって術中、術後早期、術後後期の合併症ごとに頻度を求める。術中合併症としては、術中出血/血管損傷/尿管損傷/そのほか(リドカイン中毎など)、術後合併症としては早期；肺合併症/術後出血/創感染/術後感染症/下痢/腸閉塞/腸重積/乳び腹水/乳び胸水/Horner 症候群/そのほか(胆嚢炎、膵炎、腸管穿孔など)、後期；癒着性

腸閉塞/腎萎縮/腎性高血圧/神経麻痺などの調査を行う。

### おわりに

JNBSG におけるリスク分類は現在、Children's Oncology Group (COG) のリスク分類に基づいているが、今後、わが国における臨床研究を世界に向けて発信していくためには、現在も流動中の国際的なリスク分類である INRG staging を常に意識しながら、わが国の臨床研究を進めるべきである。そのような観点からも、INRG staging の基本骨格の一つである IRDF に基づいた JNBSG の低中間リスク群に対する臨床研究はもっとも期待すべき、また、発展させるべき研究であり、今後、神経芽腫の治療を行っている多くの施設の参加をお願いしたい。

### 文 献

- 1) Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, et al : International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 6 : 1874-1881, 1988
- 2) Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al : Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11 : 1466-1477, 1993
- 3) Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, et al : The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system : an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27 : 298-303, 2009
- 4) Cecchetto G, Mosseri V, De Bernardi B, et al : Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma : the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group. *J Clin Oncol* 23 : 8483-8489, 2005
- 5) 米田光宏, 西川正則, 上原秀一郎, 他 : 神経芽腫における IDRF の概念. *小児外科* 42 : 627-632, 2010
- 6) Brisse HJ, McCarville MB, Granata C, et al : Guidelines for Imaging and Staging of Neuroblastic Tumors : Consensus Report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Radiology*. 2011 (Epub ahead of print)

\* \* \*

■ 特集 小児腫瘍における多施設共同臨床試験の背景と進捗

## 神経芽腫低リスク群・中間リスク群

日本神経芽腫研究グループ (JNBSG)

|       |      |      |      |
|-------|------|------|------|
| 家原知子* | 菊田敦  | 菊地陽  | 田尻達郎 |
| 米田光宏  | 常盤和明 | 連利博  | 金川公夫 |
| 北村正幸  | 柳生茂希 | 中川原章 | 中澤温子 |
| 高橋秀人  | 瀧本哲也 | 福島敬  | 金子道夫 |
| 原純一   | 池田均  |      |      |

### はじめに

小児がんの予後改善と合併症回避のためには、リスクに応じた治療戦略の確立が必須である。過去のわが国における多施設共同研究は、基盤整備が不足し、治療には医師の裁量が多々みられる不十分な内容であった。神経芽腫においては、年長児を対象とした高リスク群と乳児を対象とした低リスク群を中心とした治療法の開発が行われたが、いずれも新たな治療開発研究にいたる結果は得られなかった。日本神経芽腫研究グループ (JNBSG) の発足に伴い、神経芽腫でのリスクに応じた治療法の開発研究が始まった。リスク分類は国際的に広く採用され、信頼性のある米国小児腫瘍グループ (COG) 分類を採用することとなった。

JNBSG 発足当初の JNBSG 参加 107 施設での患者発生数の実態を 2008 年に調査した。107 施設のうち 84 施設 (78.5%) から回答があった。2004 年 4 月 1 日から 2008 年 3 月 31 日までの 4 年間

に 399 例の発生があり、その内訳は高・中間・低リスク各群がそれぞれ 206 例、62 例、121 例であった。年間平均発生総数は 100 例、高リスク 50.5 例、中間リスク 15.5 例、低リスク 30.3 例であった。この調査患者数が、今回のリスク別臨床研究の基礎データとなった。ご協力いただいた関係施設にはこの場を借りて感謝の意を表したい。

### I. 低リスク観察研究

#### 1. 背景

低リスク群の限局例の大部分は手術のみで治療が可能であり、摘出不能や残存腫瘍がある場合には化学療法が追加されることが一般的である。近年の海外の報告では、米国 CCG 3881 研究<sup>1,2)</sup>とヨーロッパの LNESG 94.01 研究<sup>3,4)</sup>では 3 年または 5 年生存率は、88~100%とわけて良好であった。わが国の乳児神経芽腫プロトコル<sup>5)</sup>での限局性腫瘍の 5 年無病生存率は 94~99%と良好であった。一方で、ヨーロッパにおける LNESG 研究<sup>4)</sup>では 8.7%、ドイツの GPOH NB 97 研究<sup>6)</sup>では 19%に手術関連合併症を認めている。わが国の乳児神経芽腫プロトコルの成績では手術関連合併症は 8.3%に認められた。合併症のなかには、手術後死亡をはじめ腎萎縮、消化管閉塞、血栓症など重篤なものも存在していた。上記の現状から、低リスクに関しては手術合併症を減らし、良好な予後を維持した治療戦略の確立が必要となっている。

Tomoko Iehara Atsushi Kikuta Akira Kikuchi Tatsuro Tajiri  
Akihiro Yoneda Kazuaki Tokiwa Toshihiro Muraji  
Kimio Kanekawa Masayuki Kitamura Shigeki Yagyu  
Akira Nakagawara Atsuko Nakazawa Hideto Takahashi  
Tetsuya Takimoto Takashi Fukushima Michio Kaneko  
Junichi Hara Hitoshi Ikeda

\* 京都府立医科大学大学院医学研究科小児発達医学  
〔〒602-8566 京都市上京区河原町広小路上ル  
梶井町 465〕

## 2. 対象

低リスク群の対象となる腫瘍は生物学的予後不良因子を有しない (MYCN 非増幅) 限局性腫瘍と stage 4S であり, COG 分類の低リスク腫瘍を対象とする。さらに COG 分類中間リスク群に分類されている MYCN 増幅がない 12 カ月未満の stage 3 の患者は, わが国における乳児神経芽腫の治療成績で 5 年無病生存率 93.9% と予後良好であった実績により, これらの症例も本低リスク研究の対象とした。したがって, 本低リスクの対象症例は下記のとおりとなる。

- stage 1 かつ日齢が 0 日以上年齢 18 歳未満, かつ MYCN 非増幅
- stage 2 A/2B かつ日齢 0 日以上年齢 18 歳未満, かつ MYCN 非増幅
- stage 3 かつ日齢 0 日以上 364 日以下, かつ MYCN 非増幅,
- stage 4S かつ日齢 0 日以上 364 日以下, かつ Favorable Histology, かつ DNA index > 1, かつ MYCN 非増幅

## 3. 研究目的と計画

低リスク群の生存率は, わが国におけるマスキュークリーン症例や海外からの臨床症例の報告でも 90~100% と予後良好である。したがって, 今後の治療開発の主眼は, 治療成績の向上を目指すことではなく, 治療軽減によって治療の副作用を減らしても, 良好な治療成績を維持できることになる。これまで一定の基準で治療の副作用を評価した試験はほとんどなく, 比較検討も困難であった。以上のような実情をふまえて, 本研究ではこれまで施行されてきた手術摘出術および化学療法に加えて, image define risk factors (IDRF)<sup>7)</sup> に基づく手術時期の決定を行うことで, 安全性と治療合併症の軽減をはかる。この方針によって, 現時点での治療成績と合併症の発症率を確認することを目的とする観察研究とした。

## 4. 期間と対象数

低リスク研究は観察研究であるため, 信頼区間の幅と登録期間を考慮して登録数を設定した。3 年累積生存率を 90~95%, 有害事象発生割合を 10~15% と見積もった場合の信頼区間の幅 (片側分) は, 登録期間の年数が経つにつれて, 次第に

減少するが, 4 年以降登録期間を延長しても信頼区間の減少幅はそれ以前に比べて小さくなる傾向にある。したがって, 登録期間を 3 年とし, 前述の調査より算出した 3 年間で症例集積可能な全 60 症例を登録数と設定した。

## 5. 治療指針

低リスクの基本的な治療法は手術摘出である。初回手術前の画像検査所見において, 手術リスク, つまり IDRF を判定し, IDRF 陰性であれば手術合併症は低いと予想して摘出術を行う。腫瘍が限局している症例での術後の化学療法は不要である。

一期的摘出術が不可能と判定された症例では, 低用量の化学療法 LI-A (ビンクリスチン・シクロホスファミド) または LI-B (ビンクリスチン・シクロホスファミド・ピラルビシン) を施行し, 3 コースごとに腫瘍の縮小を評価して摘出可能となった時点で, 二期的摘出術を行う。

**限局例 IDRF 陰性:** 全摘出術施行

**IDRF 陽性 (摘出不能例):** 3 コースごとの化学療法後に画像評価して摘出可能となれば全摘出術施行

**Stage 4S 摘出可能例:** 原発巣全摘後に代諾者の同意に基づき, 化学療法なしで転移巣の経過観察も可能であるが, 経過観察中に腫瘍の増大, 再燃を認める場合は化学療法を開始する。

**摘出不能例:** 3 コースごとの化学療法後に画像評価して摘出可能となれば全摘出術

## 6. 実施状況

2010 年 9 月より登録開始しており, 順次登録をいただいている。今後 IDRF 判定により, 合併症率の発現が抑えられ, 安全な治療法の確立ができるものと期待している。

## II. 中間リスク群第 II 相臨床試験

中間リスク群は前述のわが国の調査結果でも明らかのように, 発生数が少ない。さらに, 限局性腫瘍と遠隔転移を有する腫瘍という, 非常に多様性のある腫瘍群が含まれるため, 標準治療とされるエビデンスのある治療法は確立されていない。

わが国においては, 過去の乳児神経芽腫プロトコール<sup>5)</sup>で stage 4 の乳児例が対象症例の一部に

相当し、これらの症例に対する、治療レジメンは存在したが、臨床試験としてのエビデンスにはいたっていない。海外の報告について限局性腫瘍と遠隔転移腫瘍に分けて述べる。

限局例は米国 CCG 3881<sup>8)</sup>ではエトポシドを含む 2-4 剤の抗がん剤を周期的に投与する治療法を 35 週間行い、腫瘍縮小後に手術摘出を行う。本治療法では、予後不良因子のない腫瘍群では 4 年無病生存率が 90~100%と予後良好であったが、1 歳以上の病理学的予後不良群では生存率 54%と治療成績は不良であった。フランス SFOP の報告<sup>9)</sup>でもエトポシドを含む 4 剤の抗がん剤を 12~15 週間投与し、手術摘出を行う。3 年無病生存率は 89%と良好であった。

遠隔転移例のある乳児例に対しては、米国では上記と同様の 36 週間の治療を行い、3 年無病生存率は 93%と良好であった<sup>10)</sup>。フランスの報告では、4 剤の化学療法を 4~6 コース行い、骨転移なしの症例では 5 年無病生存率が 90%と良好であったが、骨転移がある症例では 27%と不良であった<sup>11)</sup>。一部の症例では大量治療が行われている。

12~18 カ月の遠隔転移例に対しては、米国では 4 剤の抗がん剤を用いた臨床試験が各種行われているが、生物学的特性などによって生存率は 67~92%と幅のある報告である。CCG 3891 研究では強化療法として大量治療と維持療法の無作為割り付けを行ったが、大量治療の有効性は示されていない<sup>12)</sup>。

わが国の乳児神経芽腫プロトコールでは、治療関連死亡はみられていないが、米国 CCG, フランス SFOP 研究では複数例の化学療法関連死亡や二次がんの発生が報告されている。

### 1. 対象

COG 分類で中間リスクと判定されたうちの下記の患者を、本臨床試験の対象とする。1 歳未満の stage 3 症例については、わが国の乳児神経芽腫に対する治療プロトコールの結果により、低リスク症例として扱う。stage 3 症例では、1 歳以上の MYCN 非増幅と 12~18 カ月の unfavorable histology を示す症例が含まれる。stage 4 症例では、1 歳未満の MYCN 非増幅と 12~18 カ月の予

後不良因子を持たない症例が含まれる。stage 4s 症例では、MYCN 非増幅であるが、なんらかの予後不良因子を持つ症例が含まれる。したがって、中間リスクの対象症例は下記のとおりとなり、限局性腫瘍と転移性腫瘍が混在した、非常に多種多様の腫瘍群からなる。

- stage 3 年齢 365 日以上, favorable histology, MYCN 非増幅

- stage 3 年齢 365 日以上 546 日以下, unfavorable histology, MYCN 非増幅

- stage 4 年齢 364 日以下, MYCN 非増幅

- stage 4 年齢 365 日以上 546 日以下, favorable histology, DNA index > 1, MYCN 非増幅

- stage 4S 年齢 364 日以下, unfavorable histology, MYCN 非増幅群

- stage 4S 年齢 364 日以下, favorable histology, DNA index = 1, MYCN 非増幅群

### 2. 研究目的と計画

中間リスクは前述のとおり、非常に多様な腫瘍群であり、これらの症例に対して、低用量の術前化学療法と手術前画像評価に基づく安全な手術時期の決定により、治療合併症の軽減と良好な予後を得ることを目的として、わが国での臨床試験を計画した。化学療法剤としては、二次がんの発症の可能性のあるエトポシドを使用せず、治療合併症を回避するため化学療法は反応性をみながら、段階的に強度を高めることとし、大量化学療法を併用しない治療計画とした。手術合併症のリスクを抑える目的で、手術前評価については IDRF に基づく手術時期の決定を行うこととした。臨床試験名称は「image defined risk factors (IDRF) に基づく手術適応時期の決定と、段階的に強度を高める化学療法による、神経芽腫中間リスク群に対する第 II 相臨床試験」とした。

前述のとおり、中間リスク群に対する標準治療に関するエビデンスは得られていない。諸外国における中間リスク神経芽腫に対する臨床成績は現在 70%程度となっており、国際神経芽腫リスクグループ (INRG) では 5 年無増悪生存率 50~75%と設定している<sup>13)</sup>。また、中間リスク群腫瘍の発生数はわが国では年間 15 例程度と非常に少ないことが予想されるため、無作為割り付けの比較試

験は困難である。したがって、本研究は、中間リスク患者（限局群，遠隔群）について，3年累積無増悪生存率を探索的に推定し，過去の中間リスク群の閾値生存率70%と比較し，有効性と安全性を評価する。

### 3. 期間と対象数

過去の集積症例状況より，限局群10例/年，遠隔群5.5例/年と考えられる。

累積生存率85%，70%の差を有意水準5%，検出力80%でlogrank検定するためには，freedman式で32例必要となる。中間リスク患者全体で必要症例32例が集積した場合に先の集積状況から，限局群21例，遠隔群11例が見込まれる。しかし限局群，遠隔群の治療成績はわかっておらず，もし治療成績が大きく異なる場合，限局群と遠隔群と分けた治療方法を確立するためには，それぞれに検討する必要がある。

したがって，必要な症例数を64例以上とする。このとき限局群41例，遠隔群22例の登録が予想され，遠隔群の期待3年累積無増悪生存率85%の95%信頼区間は，(66.5%，95.8%)となる。先の集積状況から登録期間を5年，観察期間を3年，研究期間を8年とする。

### 4. 治療指針

限局性腫瘍に対しては，寛解導入療法のビンクリスチン・シクロホスファミド・ピラルビシン(LI-B)またはビンクリスチン・シクロホスファミド・カルボプラチン(LI-C)を行い，レジメン3コースごとに手術摘出可能かの画像および腫瘍マーカーでの評価を行う。評価時の効果が不十分と判定された際には，治療強度を上げたレジメンビンクリスチン・シクロホスファミド・ピラルビシン・シスプラチン(LI-D)またはビンクリスチン・シクロホスファミド・ピラルビシン・シスプラチン(LI-E)に変更する。転移性腫瘍に対しては，寛解導入療法(LI-D)を行い，3コース終了以降に評価を行い，外科療法を施行する。その後術後の化学療法を計5コース，最高6コースとなるように追加施行する。

初回外科手術は生検術となり，生検ガイドラインにしたがって安全に施行されるべきである。化学療法後の評価でIDRFを参考に，安全な腫瘍摘

出術が可能と判断された場合はsecond look operationの適応とガイドラインにしたがい，腫瘍摘出術を施行する。

中間リスク群のstage 4症例の残存骨転移部に対する放射線療法の有効性については，統一した見解はない。本試験においては，乳児のstage 4症例について，最終化学療法後に転移残存がある時点で，本プロトコールはプロトコール中止とし，サルベージ治療としての放射線ガイドラインにしたがい放射線治療を行ってもよい。また，呼吸障害を伴うstage 4sの肝転移巣については放射線ガイドラインにしたがい，緊急照射の適応となる。

### 5. 実施状況

本臨床試験は2010年12月から登録を開始している。本臨床試験が中間リスク群に対する標準治療として確立できることを期待している。上記臨床研究に参加希望の施設は，JNBSGに参加のうえ，各臨床試験プロトコールを自施設で倫理審査通過後に登録開始が可能となる。

#### <JNBSG事務局>

筑波大学医学系棟 CREIL センター内  
〒305-8575 つくば市天王台1-1-1  
TEL・FAX 029-853-3326  
E-mail: jnbsg@md.tsukuba.ac.jp

#### <低リスク研究事務局>

田尻達郎  
九州大学病院小児外科  
〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1  
TEL 092-642-5573 FAX 092-642-5580  
E-mail: taji@pedsurg.med.kyushu-u.ac.jp

#### <中間リスク研究事務局>

家原知子  
京都府立医科大学小児科  
〒602-8566 京都市上京区河原町広小路上ル梶井町465  
TEL 075-251-5571 FAX 075-252-1399  
E-mail: iehara@koto.kpu-m.ac.jp

文 献

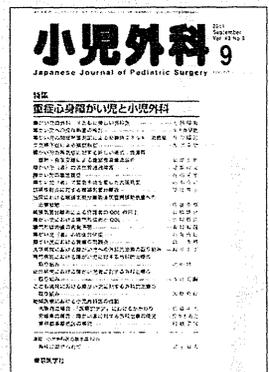
- 1) Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB, et al : Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy : a children's cancer group study. J Clin Oncol 18 : 18-26, 2000
- 2) Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, et al : Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy : a Children's Cancer Group study. J Clin Oncol 18 : 477-486, 2000
- 3) Navarro S, Amann G, Beiske K, et al : Prognostic value of International Neuroblastoma Pathology Classification in localized resectable peripheral neuroblastic tumors : a histopathologic study of localized neuroblastoma Eruopean Study Group 94.01 Trial and Protocol. J Clin Oncol 24 : 695-699, 2006
- 4) Cecchetto G, Mosseri V, Bernardi B, et al : Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma : the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblasotma Group. J Clin Oncol 23 : 8483-8489, 2005
- 5) 家原知子 : 乳児神経芽腫統一治療プロトコールのこれまでと今後. 小児がん 41 : 35-38, 2004
- 6) Simon T, Hero B, Benz-Bohm G, et al : Review of image defined risk factors in localized neuroblastoma patients : Results of the GPOH NB97 trial. Pediatr Blood Cancer 50 : 965-969, 2008
- 7) Brisse HJ, McCarville MB, Granata C, et al : Guidelines for Imaging and Staging of Neuroblastic Tumors : Consensus Report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. Radiology 2011 May 17. [Epub ahead of print]
- 8) Matthay KK, Perez C, Seeger RC, et al : Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging : a Children's Cancer Group study. J Clin Oncol 16 : 1256-1264, 1998
- 9) Rubie H, Michon J, Plantatz D, et al : Unresectable localized neuroblastoma : improved survival after primary chemotherapy including carboplatin-etoposide. Br J Cancer 77 : 2310-2317, 1998
- 10) Schmidt ML, Lukens JN, Seeger RC, et al : Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma : a prospective Children's Cancer Group study. J Clin Oncol 18 : 1260-1268, 2000
- 11) Minard V, Hartmann O, Peyroulet MC, et al : Adverse outcome of infants with metastatic neuroblastoma, MYCN amplification and/or bone lesions : results of the French society of pediatric oncology. Br J Cancer 83 : 973-979, 2000
- 12) Schmidt ML, Lal A, Seeger RC, et al : Favorable prognosis for patients 12 to 18 months of age with stage 4 nonamplified MYCN neuroblasotoma : a Children's Cancer Group study. J Clin Oncol 23 : 6474-6480, 2005
- 13) Cohn SL, Pearson AD, London WB, et al : The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system. J Clin Oncol 27 : 289-297, 2009

雑誌『小児外科』43巻9号(2011年9月号) 定価2,835円

特集 重症心身障がい児と小児外科

障がい児の外科—子どもに優しい外科医  
 障がい児への投与熱量の検討  
 障がい児の間接熱量測定による安静時エネルギー消費量  
 空気嚥下症による腸捻転症  
 障がい児の吞気症に対する新しい術式：食道胃離断・有茎空腸による腹部食道瘻造設術  
 障がい児(者)の消化管通過障害  
 障がい児の急性腹症  
 障がい児(者)で緊急手術を要した大腸病変  
 誤嚥性肺炎に対する喉頭気管分離術  
 当院における喉頭気管分離術後気管腕頭動脈瘻への治療戦略  
 喉頭気管分離術による介護者のQOLの向上  
 障がい児における噴門形成術とQOL

噴門形成術後の再発予防  
 障がい児(者)の術後合併症  
 障がい児における胃瘻の問題点  
 大学病院における障がい児への外科的治療の取り組み  
 専門病院における障がい児に対する外科的治療の取り組み  
 総合病院における障がい児者に対する外科治療の取り組み  
 こども病院における障がい児に対する外科的治療の取り組み  
 地域医療における小児外科医の役割  
 大阪府の場合：「医療的ケア」におけるかかわり  
 宮城県の場合：障がい者に対する外科治療の現況  
 東京都多摩地区の場合



好評発売中

東京医学社

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町 2-20-13 Y's コーラルビル TEL 03-3265-3551 FAX 03-3265-2750

E-mail : hanbai@tokyo-igakusha.co.jp URL : http://www.tokyo-igakusha.co.jp/



ORIGINAL ARTICLE

## CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification

H Takenobu<sup>1</sup>, O Shimosato<sup>2</sup>, T Nakamura<sup>3</sup>, H Ochiai<sup>1,4</sup>, Y Yamaguchi<sup>1</sup>, M Ohira<sup>5</sup>,  
A Nakagawara<sup>6</sup> and T Kamijo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Biochemistry and Molecular Carcinogenesis, Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba, Japan; <sup>2</sup>Laboratory of Anti-tumor Research, Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba, Japan; <sup>3</sup>Core Facility for Therapeutic Vectors, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; <sup>4</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan; <sup>5</sup>Laboratory of Cancer Genomics, Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba, Japan and <sup>6</sup>Division of Biochemistry and Innovative Cancer Therapeutics, Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba, Japan

CD133 (prominin-1) is a transmembrane glycoprotein expressed on the surface of normal and cancer stem cells (tumor-initiating cells), progenitor cells, rod photoreceptor cells and a variety of epithelial cells. Although CD133 is widely used as a marker of various somatic and putative cancer stem cells, its contribution to the fundamental properties of cancer cells, such as tumorigenesis and differentiation, remains to be elucidated. In the present report, we found that CD133 was expressed in several neuroblastoma (NB) cell lines/tumor samples. Intriguingly, CD133 repressed NB cell differentiation, for example neurite extension and the expression of differentiation marker proteins, and was decreased by several differentiation stimuli, but accelerated cell proliferation, anchorage-independent colony formation and *in vivo* tumor formation of NB cells. NB cell line and primary tumor-sphere experiments indicated that the molecular mechanism of CD133-related differentiation suppression in NB was in part dependent on neurotrophic receptor RET tyrosine kinase regulation. RET transcription was suppressed by CD133 in NB cells and glial cell line-derived neurotrophic factor treatment failed to induce RET in CD133-expressing cells; RET overexpression rescued CD133-related inhibition of neurite elongation. Of note, CD133-related NB cell differentiation and RET repression were mainly dependent on p38MAPK and PI3K/Akt pathways. Furthermore, CD133 has a function in growth and RET expression in NB cell line- and primary tumor cell-derived tumor spheres. To the best of our knowledge, this is the first report of the function of CD133 in cancer cells and our findings may be applied to improve differentiation induction therapy for NB patients. *Oncogene* (2011) 30, 97–105; doi:10.1038/onc.2010.383; published online 6 September 2010

**Keywords:** CD133; neuroblastoma; differentiation; RET p38MAPK; PI3K/Akt

Correspondence: Professor T Kamijo, Division of Biochemistry and Molecular Carcinogenesis, Chiba Cancer Center Research Institute, 666-2 Nitona, Chuo-ku, Chiba 260-8717, Japan.  
E-mail: tkamijo@chiba-cc.jp

Received 2 March 2010; revised 5 July 2010; accepted 14 July 2010; published online 6 September 2010

### Introduction

CD133 (AC133; human prominin-1) belongs to a family of cell-surface glycoproteins harboring five transmembrane domains (Corbeil *et al.*, 2001) and was originally found as a hematopoietic stem cell marker (Yin *et al.*, 1997). CD133 was subsequently shown to be expressed by a number of progenitor cells, including those of the epithelium, where it is expressed on the apical surface (Corbeil *et al.*, 2000). Previously, it was found that CD133-expressing cells in brain tumors have the capacity for unlimited self-renewal, as well as the ability, in small numbers, to initiate tumor formation and progression in immuno-deficient mice (Singh *et al.*, 2004), suggesting that CD133-expressing cells satisfy the important criteria required for tumor-initiating cells (TICs) (Reya *et al.*, 2001; Jordan *et al.*, 2006). Using similar methods, CD133 has recently been designated as a marker associated with TICs in the colon (O'Brien *et al.*, 2007; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007), pancreatic (Olempska *et al.*, 2007), liver (Yin *et al.*, 2007), skin (Monzani *et al.*, 2007) and prostate (Collins *et al.*, 2005; Miki *et al.*, 2007) cancers. Maw *et al.* (2000) reported homozygosity for a 1-bp deletion (1878delG) in exon 16 of the CD133 gene predicted to cause a frameshift at codon 614 and a prematurely truncated protein lacking about half of the second extracellular loop, the final membrane-spanning segment and the cytoplasmic-C-terminal domain; this missense mutation caused retinal degeneration in four affected members of a consanguineous Indian family. This finding was further confirmed by an article describing that loss of Prom-1 in genetically modified mouse results in the progressive degeneration of mature photoreceptors with complete loss of vision (Zacchigna *et al.*, 2009); however, to the best of our knowledge, no reports have studied the function of CD133 in tumorigenesis.

Neuroblastoma (NB) is the most common pediatric solid malignant tumor derived from the sympathetic nervous system. Unlike the many childhood malignancies for which survival has been improved by recent therapies, high-risk NB is still one of the most difficult tumors to cure, with only 30% long-term survival despite intensive multimodal therapy (Maris *et al.*,

2007). The clinical presentation and treatment response of advanced NB, which results in relapse and a refractory state after a good response to the initial chemotherapy, suggest that TICs likely exist in NB tumors. A previous report indicated the isolation and characterization of putative TICs using primary-sphere formation with tumors and bone marrow metastases from NB patients, although CD133 expression was not detected in a bone marrow-derived high-risk NB tumor-sphere sample (Hansford *et al.*, 2007). On the other hand, it was reported that sub-cloned NB cells (designated 'intermediate type'), which have a significantly more malignant phenotype, with four- to fivefold greater plating efficiencies in soft agar and sixfold higher tumorigenicity in athymic mice, expressed high amounts of CD133 mRNA compared with less malignant sub-clones (Walton *et al.*, 2004); therefore, the function of CD133 in NB tumorigenesis and aggressiveness remains unresolved.

Previous reports about CD133 expression in NB and its function as a stem cell marker in several tumors prompted us to study the function of CD133 in NB cells (Walton *et al.*, 2004; Hansford *et al.*, 2007). Our results clearly indicated that CD133 also seems to regulate cell proliferation and tumorigenesis in NB cells. Importantly, CD133 represses NB cell differentiation and is decreased by several differentiation stimulators. We studied the molecular mechanism of CD133-related differentiation inhibition in NB cells and found that it was in part dependent on RET tyrosine kinase receptor regulation via signal pathway modification. Furthermore, CD133 is expressed in NB cell spheres and has a function in sphere growth and RET regulation.

In specific malignancies, for example NB and acute promyelocytic leukemia, differentiation induction therapy using retinoic acid is clearly effective. *In vitro* experiments indicated that all-*trans*-retinoic acid (ATRA) treatment induced morphological and biochemical differentiation in these cancer cells, suggesting that the induced differentiation seems to repress the tumorigenic activity of cancer cells (Brodeur *et al.*, 2000; Weinberg, 2006). Together, CD133 may regulate NB tumorigenesis and proliferation by preventing differentiation.

## Results

### *CD133 has a function in NB cell proliferation*

First, we checked the expression of CD133 in NB cell lines and found its expression in 7 out of 20 (53%) cell lines (Figure 3d and Supplementary Figure 1S). A high level of cell-surface expression of CD133 was detected in TGW and SK-N-DZ cells, and modest expression was found in IMR32 (Figure 1a; Supplementary Figure 1Sa). Next, we knocked down CD133 in highly expressing NB cells and analyzed the knockdown-induced phenotype. Figure 1b shows that infection of shRNA-reduced CD133 mRNA and protein and CD133 knockdown in TGW cells effectively resulted in significant growth retardation. Inhibition of cell

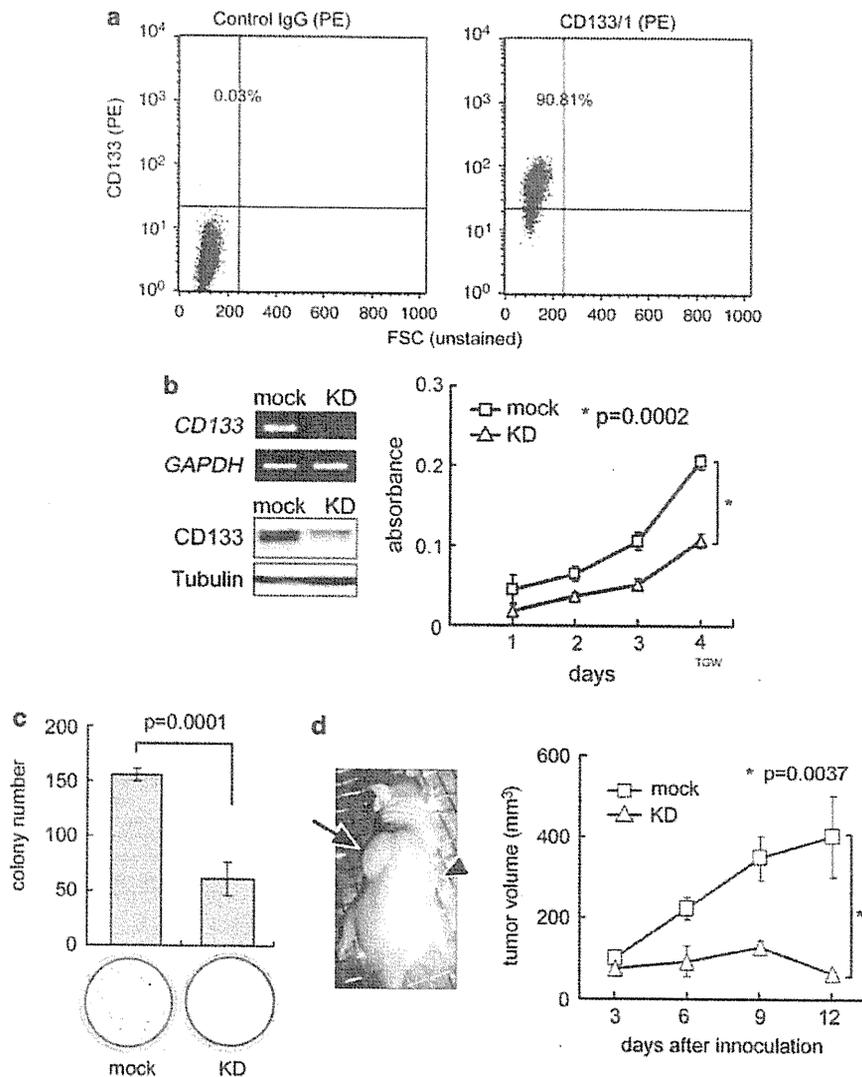
proliferation by CD133 small-interference RNA was also observed in SK-N-DZ cells (Supplementary Figure S1). Furthermore, stable knockdown of CD133 in TGW cells suppressed cell proliferation under anchorage-independent conditions (Figure 1c). To test tumorigenicity *in vivo*, CD133-silenced TGW cells were injected subcutaneously into nude mice. Mock shRNA lentivirus-infected cells formed large tumors within 9 days post-injection; CD133 shRNA lentivirus-infected cells formed very small tumors (Figure 1d). Next, we examined the effect of CD133 on NB cell proliferation (Supplementary Figure 2S). CD133 was successfully expressed in SH-SY5Y cells by lentivirus. The proliferation rate of CD133-expressing SH-SY5Y cells was 2–2.5-fold greater than mock cells. Moreover, a soft agar colony formation assay showed that CD133-expressing cells formed more and bigger colonies than mock-control cells.

### *CD133 knockdown induces NB differentiation*

In NB cells, differentiation into a neuronal phenotype is induced when cells are treated with several stimulations. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induced neurite outgrowth in TGW cells (Figure 2a, center). In CD133 knocked-down TGW cells, neurite formation was observed even under normal culture conditions (Figure 2a, KD). We scored cells with neurite length longer than the cell body diameter as neurite positive (Figure 2b). CD133 knocked-down cells showed intensified neurite extensions when compared with mock cells. Mock-infected and CD133 knocked-down cells were collected at the end of the experiment, and mRNA was extracted and subjected to RT-PCR (Figure 2c). With *GAP43/neurofilament (NF) 68* as neuronal differentiation markers, these expressions were constitutively upregulated in CD133 knocked-down cells. Along with differentiation induced by treatment with ATRA or phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) in parental TGW cells, CD133 expression was suppressed at both protein and mRNA levels (Supplementary Figure 3S). These results indicated that CD133 may suppress the differentiation of NB cells.

### *CD133 regulates RET expression in NB cells*

To identify the mechanism of CD133-related cellular differentiation, we studied the expression of several neurotrophic receptors and RET receptors because they are the important signal transduction pathway molecules, which have important functions in sympathetic nerve and NB cell differentiation (Kaplan *et al.*, 1993; Klein, 1994; D'Alessio *et al.*, 1995; Enomoto *et al.*, 2001). We introduced CD133 cDNA into several NB cell lines (Figure 3a), and checked the effect of CD133 overexpression on RET expression using a primer pair recognizing all RET isoforms, RET51, RET9 and RET43, formed by alternative splicing of C-terminal exon cassettes (Myers *et al.*, 1995; Enomoto *et al.*, 2000). Intriguingly, in RET and all RET isoforms, transcriptions were suppressed in CD133-overexpressing NB cells (RET reduction was 1.3–3.8-fold by qPCR); however,



**Figure 1** *CD133* knockdown inhibits the growth of human neuroblastoma (NB) cells. (a) Flow cytometric analysis of *CD133* expression profiles in TGW cells. *CD133* fluorescence is depicted on the y axis, and the percentage of *CD133*-positive cells is shown in the left upper corner of each plot. (b) Stable knockdown of *CD133* by lentivirus-mediated shRNA was performed as described in Materials and methods. *CD133* expression was detected by semi-quantitative RT-PCR and western blotting analysis in TGW cells. Growth curves were obtained by WST-8 assay. Anchorage-independent colony formation (c) and *in vivo* tumorigenic assay (d). TGW cells were stably transduced with shRNA against mock or *CD133* (KD). (c) Colonies were stained with MTT dye and directly counted under a phase contrast microscope. (d) Tumor development in BALB/c AJcl *nu/nu* mice on injection of TGW cells stably infected with shRNA against mock (arrow) and *CD133* (KD, arrowhead) cells. Tumor volume was measured every 3 days. Data are presented as the mean  $\pm$  s.d. of tumors in four mice.

the effects of *CD133* on *TrkA/B/C*, *p75NGFR* and *GDNF* expressions did not show a specific tendency. *CD133* knockdown clearly increased *RET* mRNA (*RET* induction was 2.5–3.0-fold by qPCR). *CD133*-mediated *RET* downregulation was also observed at the protein level (Figure 3b). Furthermore, *CD133* expression in primary NB spheres resulted in transcriptional suppression of *RET* (Figure 3c). These results suggest that *CD133* suppresses *RET* gene transcription in NB cells.

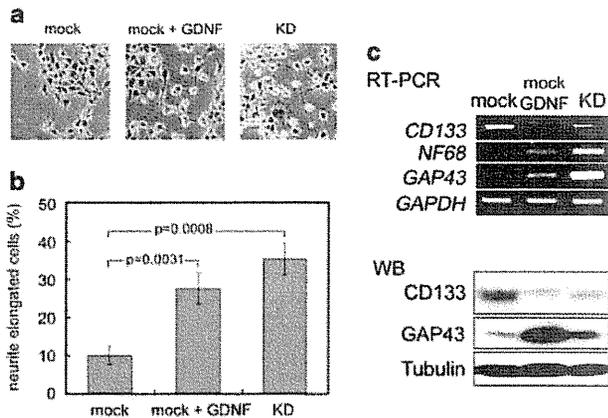
To study the expression pattern of *CD133* and *RET* mRNA in human NBs, we performed semi-quantitative RT-PCR. *CD133* was expressed in 7 of 20 NB cell lines tested (Figure 3d), and only 1 NB cell line was *RET* positive in the 7 cell lines. We further studied *CD133*

and *RET* expression in unfavorable patient-derived tumors (stages 3 and 4, *TrkA*(–), *MYCN* amplified). Again, *RET* expression was profoundly repressed in *CD133*-expressing NB tumors (Figure 3e). Finally, we studied the transcriptional activity of *RET* promoter in *CD133*-expressing cells. *RET* promoter reporter-derived luciferase activity was significantly suppressed in *CD133*-expressing cells (Figure 3e).

*CD133 regulates NB cell differentiation in a RET-dependent manner*

We investigated the biological effects of *CD133* over-expression on *RET* downregulation in SH-SY5Y cells.

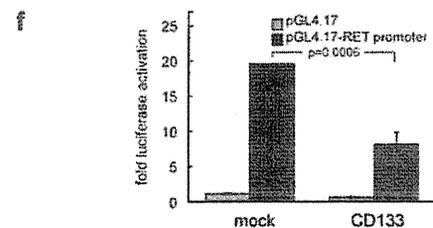
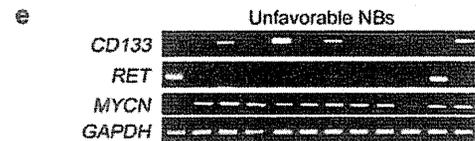
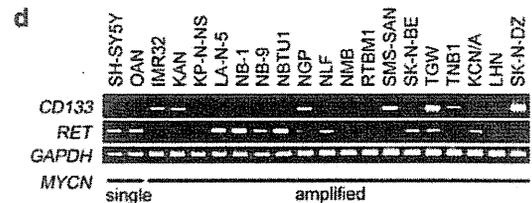
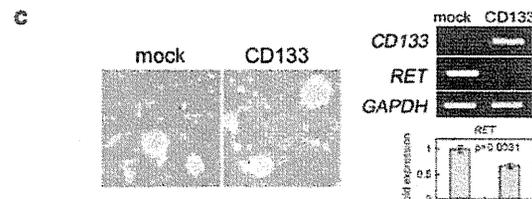
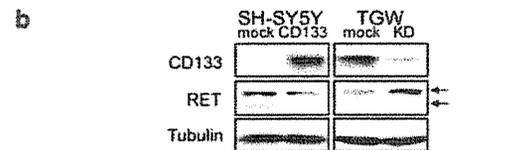
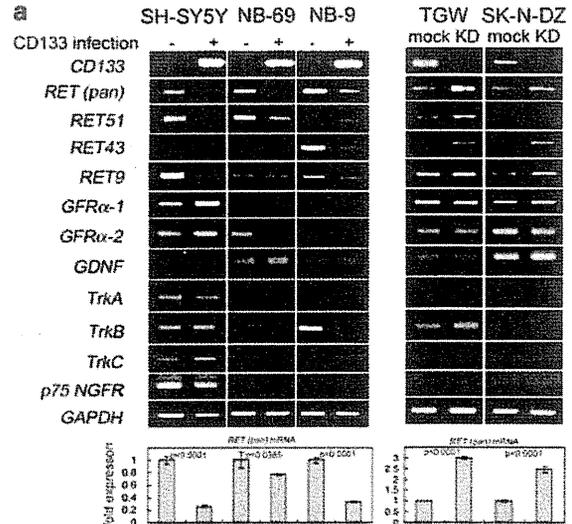
Significant neurite outgrowth was observed when mock-infected cells were stimulated with GDNF (Figure 4a). At the same time, no obvious difference was observed between mock- and GDNF-treated CD133-expressing cells. These results implied that CD133 overexpression inhibited NB cell differentiation.



**Figure 2** CD133 silencing induces differentiation in TGW cells. TGW cells were infected with lentivirus vectors encoding shRNA against *CD133* (right) or a mock (left) as a negative control. Ten days after infection, cells were treated with buffer (mock and KD) or GDNF (10 ng/ml, middle). Cells were scored for the presence of neurites longer than one cell diameter 72 h after treatment (photo: (a), bar graphs: (b)). Data are presented as the mean  $\pm$  s.d. from at least three independent experiments. Statistical analysis was performed by Student's *t*-test. (c) NB differentiation-related molecule *neurofilament 68* (*NF68*) and *GAP43* expressions in RT-PCR and WB. *NF68* protein was not detected by WB in TGW cells.

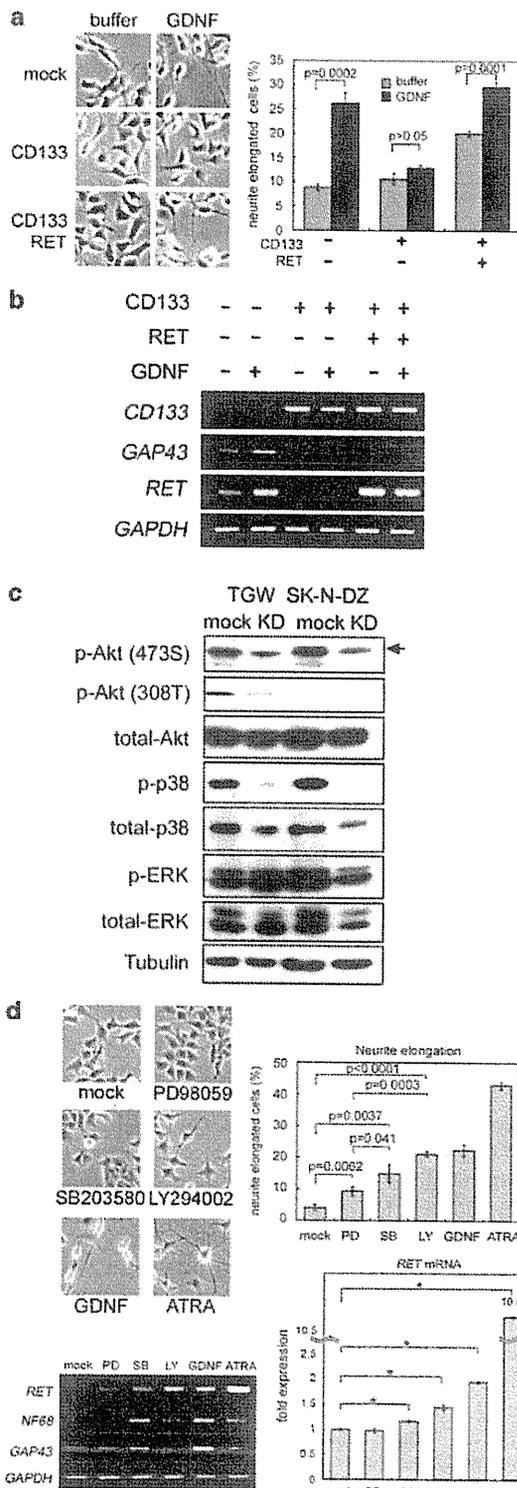
**Figure 3** CD133 inhibits RET expression in NB cells. (a) SH-SY5Y, NB-69 and NB-9 cells were infected with mock or CD133-expressing lentivirus, and TGW and SK-N-DZ cells were stably infected with shRNA against mock or CD133 (KD) lentivirus. Semi-quantitative RT-PCR analyses were performed with CD133-modified NBs using specific primers against each *RET* isoform, *Trk* families, *GFR $\alpha$ -1/2* and *GDNF*. *GAPDH* was used as a loading control. Expression level of *RET* (pan) was analyzed by qPCR. In qPCR, relative *RET* values were normalized by *GAPDH*. Data are representative results of at least three independent experiments. (b) CD133-expressing SH-SY5Y or CD133 knocked-down TGW cell lysates were subjected to western blotting for CD133 and pan-RET expression. Pan-RET antibody detected two bands corresponding to RET isoforms (arrows). (c) Primary sphere from a stage 4 NB patient was infected with mock or CD133-expressing lentivirus. Five days after infection, RNA was extracted for semi-quantitative RT-PCR of *CD133/RET* and qPCR of *RET*. *GAPDH* was used as an internal control. Data are representative of three tumor samples. (d) Expression of *CD133* and *RET* mRNA in NB cell lines. In all, 18 NB cell lines with amplified *MYCN* and 2 cell lines with a single copy of *MYCN* were used for semi-quantitative RT-PCR analysis. (e) Semi-quantitative RT-PCR analysis in unfavorable primary NBs. The results of 12 NBs are shown. Unfavorable NBs: International NB Staging System (INSS) stage 3 or 4, *TrkA* (-), with *MYCN* amplified. (f) Effects of CD133 on *RET* promoter (0.8 kb) activity in SH-SY5Y cells. pGL4.17-*RET* promoter-driven luciferase activities were normalized to pRL-SV40 early enhancer/promoter-driven *Renilla* luciferase activities as the transfection control and expressed as relative values.

We examined the effect of the co-expression of CD133 and RET (RET9) on SH-SY5Y cells. RET-expressing lentivirus was co-infected into stably CD133-expressing SH-SY5Y cells. Ten days after infection, ectopic RET and CD133 expressions were observed both at protein



and mRNA levels (Figure 4b and data not shown). As seen in Figure 4a, GDNF significantly induced neurite outgrowth of CD133/RET co-expressing SH-SY5Y cells. CD133 single-infected cells did not respond to GDNF, suggesting that the response was dependent on RET receptor expression. However, the expression

of neuronal cell differentiation markers induced by GDNF was not recovered by RET in CD133-expressing cells (Figure 4b). These findings indicated that CD133 inhibits GDNF-promoted neuronal differentiation via not only by RET but also by the other signal pathways.



*CD133 regulates RET expression and NB cell differentiation by modification of signaling pathways*

To identify the mechanism of RET downregulation in CD133-expressing cells, we studied the signaling molecule status in CD133 knocked-down cells (Figure 4c) and found a strong suppression of Akt (473S, 308T) and p38MAPK phosphorylation, but not ERK1/2 in both TGW and SK-N-DZ cells. To confirm the Akt and p38MAPK phosphorylation status caused by CD133 downregulation, we treated TGW cells with kinase inhibitors. MEK1 inhibitor (PD98059, PD), p38MAPK inhibitor (SB203580, SB) and PI3K inhibitor (LY294002, LY) induced neurite elongation in NB cells, and SB and LY were more effective for neurite elongation than PD. RET induction by kinase inhibitors was correlated with neurite elongation; however, differentiation markers *NF68* and *GAP43* were significantly induced by SB treatment. These results suggest that downregulation of p38MAPK and PI3K/Akt pathways has a function in CD133-related neurite elongation and differentiation marker expression is affected mainly by the p38MAPK pathway.

*CD133 has a function in tumor-sphere growth and cell survival*

It was previously reported that NB TICs were accumulated in NB spheres in serum-free media (SFM) (Hansford et al., 2007). These observations prompted us to study the function of CD133 in tumor-sphere formation of NB cells. In IMR32 cells, only a small fraction of cells expressed CD133 (Supplementary Figure 1Sa). IMR32 cells were cultured in SFM with epidermal growth factor and fibroblast growth factor for a week, and sphere formation, upregulation of *CD133* (11.8-fold induction) and suppression of *RET* (2.8-fold reduction) were observed (Figure 5a). In primary NB cells from bone marrow metastasis,

**Figure 4** NB cell differentiation was regulated by CD133-dependent RET suppression via signal pathway modification. (a) Mock, CD133 and/or RET9 co-expressing SH-SY5Y cells were treated with GDNF (50 ng/ml) for 72 h. Cells were scored for the presence of neurites longer than one cell diameter after GDNF treatment. (b) CD133 and/or RET9 co-infected SH-SY5Y cells were cultured with or without GDNF treatment. Semi-quantitative RT-PCR analyses of *CD133*, *GAP43*, *RET* and *GAPDH* were performed. (c) The levels of phospho-Akt (p-Akt(473S) and p-Akt(308 T)), total-Akt, phospho-p38MAPK (p-p38), total-p38MAPK, phospho-ERK (p-ERK), total-ERK and tubulin were analyzed by western blot analysis. (d) TGW cells were cultured with DMSO (mock, 0.1%), PD98059 (PD, 5 μM), SB203580 (SB, 5 μM), LY294002 (LY, 5 μM), GDNF (50 ng/ml) or ATRA (5 μM) for 96 h. Cells were scored for the presence of neurite longer than one cell diameter after treatments. Semi-quantitative RT-PCR analysis of *RET/NF68/GAP43/GAPDH*, and qPCR of *RET* were performed.