

る「登録症例に基づく神経芽細胞腫マスマスクリーニングの効果判定と医療体制の確立」を研究課題とした研究班が平成16年-18年にかけて行われた。研究班の報告書では、日本小児外科学会、日本小児がん学会、乳児神経芽腫スタディの登録データに加えて、人口動態調査死亡票による死亡確認データと照合し、解析した結果、マス受診群における神経芽腫による累積死亡率の低下が認められている。また、後ろ向き研究の成果や、無治療経過観察症例の尿中カテコラミンの推移などから前向き研究の実施時期は生後18ヶ月を提唱している。今後、このような報告書を受けて、行政がどのような方針をとるかが注目される。

2. 乳児神経芽腫統一プロトコール

乳児神経芽腫の大部分は限局性で予後良好であることは、以前よりわかっていたが、日本での治療法は施設毎にさまざまであり、しかも、治療が過剰となる傾向にあった。そのような背景から、乳児神経芽腫に対する治療の軽減を行い、適正な治療法を確立する目的で、前向きのグループスタディとして1994年から全国統一プロトコールが開始された⁶⁾。最初のプロトコールの#9405の結果から、原発腫瘍全摘後の化学療法は、病期Iのみでなく、病期IIに対しても有効性を示す結果は得られなかった。また、治療軽減に伴う生存率の低下は認められなかった。そして、生存率には、MYCN増幅、1p LOH、Shimada分類が有意に関与していた。これらの結果を受けて改訂されたプロトコールである#9805の主な改良点としては、国際的評価に対応するため、INSSに従い治療基準を変更した。また、病期2に対しては全例を化学療法なしとし、さらに病期3に対しては、化学療法なし群とあり群の無作為割り付けとなったその結果、2003年5月までの症例は350例以上となり、全生存率は#9405と変わらず、98%と良好であり、病期3の化学療法の有無による予後への影響は認められなかった⁷⁾。

3. 乳児神経芽腫に対する外科治療の概念

乳児神経芽腫は、stage 4Sを除けば、その大部分が限局性腫瘍であることから、その外科治療の概念は、予後良好な限局性神経芽腫に対する外科治療のアプローチ法にほぼ等しいと言って良いと言える。九州大学小児外科における1985年から2003年までに治療を開始した乳児神経芽腫症

例82例において85%にあたる70例がstage 1, 2, 4S症例で、MYCN増幅例はわずか2例であり、98%が非増幅であった。死亡例は3例で、腫瘍死は1例のみであった。85例の原発巣の外科切除率と予後の関係では、98%が生存していることから、全摘出例と非全摘出例において有意差を認めなかった⁸⁾。乳児神経芽腫統一治療プロトコールの結果から、病期1, 2, 3までの乳児限局性神経芽腫における化学療法の有無による予後への影響が認められなかったことから乳児神経芽腫における治療の主体は無理のない臓器温存に努めた一次的外科的根治術であり、化学療法、放射線照射を避けることが可能であると思われる。

4. JNBSGにおける低・中間リスク群に対する臨床研究

現在、神経芽腫の病期分類としては、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⁹⁾(表1)。この中で用いられているIDRF (Image Defined Risk Factors)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留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⁹⁾。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¹⁰⁾。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本邦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

表1 INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System)

Stage	
L1	Locoregional tumor not involving vital structures as defined by the list of Image Defined Risk Factors (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 (1項目以上のIDRFを有する局所性腫瘍)
M	Distant metastatic disease (except Stage Ms) (遠隔転移例 (Stage Msを除く))
Ms	Metastatic disease confined to skin and/or liver and/or bone marrow (皮膚, 肝, 骨髄に限局した遠隔転移例)

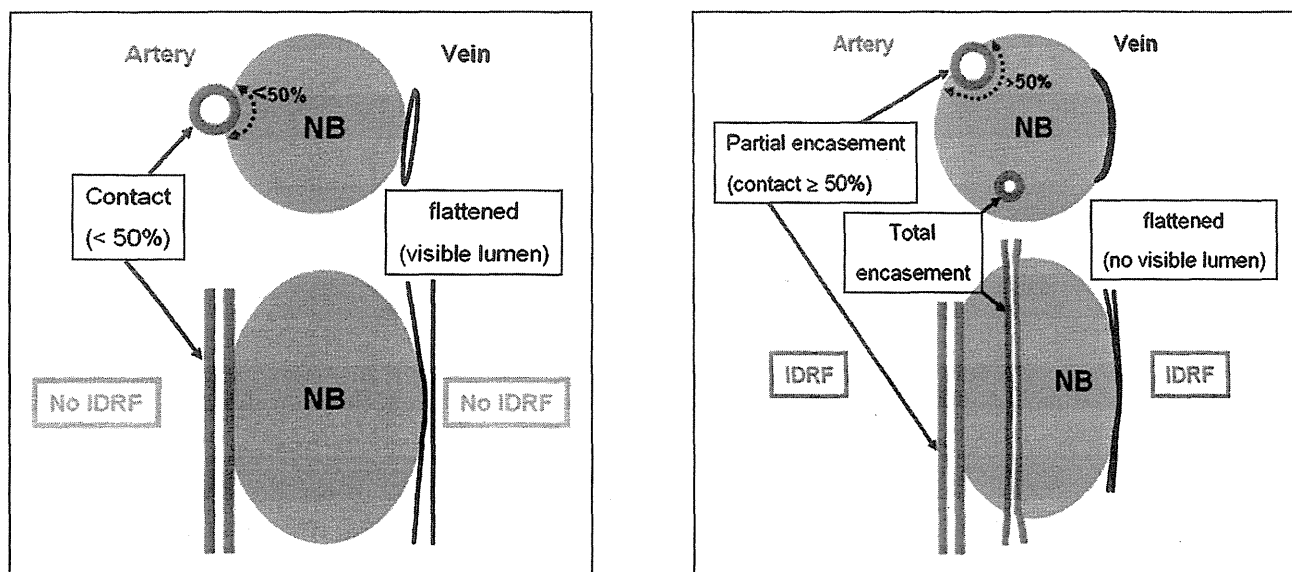


図1 IDRF 判定基準

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, 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. 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, 内腔が同定できる場合は、contact(+) として IDRF 陰性.

臨床研究「IDRF (Image Defined Risk Factors) 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 (Image Defined Risk Factors) 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¹¹⁾.

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」という論文が発表された¹²⁾. 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、特に最も重要となる血管系に対する判定基準は、encased であれば IDRF 陽性、その他の項目では yes であれば IDRF 陽性とする. 血管に対する contact, encased の判定基準を示すシェーマ (図1: 文献 11, 12 より抜粋) 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. 低中間リスク群における臨床研究においては、IDRF に

基づいて、1) 初期手術適応について、2) 一次的初期手術ガイドライン (限局性神経芽腫)、3) 生検ガイドライン、4) Second look operation の適応とガイドラインについての4項目に関して外科治療ガイドラインを提示している.

III 年長児神経芽腫の臨床

1. 厚生労働省研究班進行神経芽腫プロトコール

本邦における年長児進行神経芽腫における全国的な治療プロトコールは、1985年の厚生省研究班プロトコール (JANB85) として、独自の治療レジメンに基づいて開始された¹³⁾. 当時としては非常に強力な初期治療レジメンにより、1才以上の病期 III の5年無病生存率は約75%、病期 IV では、5年無病生存率は34%と以前の本邦における治療成績に比較して優れた治療効果が得られた. 1980年代に MYCN 遺伝子増幅が強力な予後因子であることが、報告されたために、1991年の改訂プロトコール (JANB91) では、進行症例の中でも MYCN 遺伝子が増幅した、最も悪性度が高い群の治療成績向上を目指して、治療前の腫瘍生検を義務付け、サザンブロット法にて10倍以上に増幅した症例に対しては、2クール目以降の導入化学療法を強化した. また、このころから、各施設にて幹細胞移植を伴う大量化学療法が可能となったことから、導入化学療法後に根治術と局所放射線照射を施行し、最終的な治療として幹細胞移植を推奨した. この結果、MYCN 増幅症例の治療成績は、MYCN 非増幅症例とほぼ、同等のレベルまで向上したが、

JANB85 と JANB91 全体では、ほとんど治療成績に差が認められなかった¹⁴⁾。これらの結果を踏まえて、1998年に改訂されたプロトコル (JANB98) では、1) MYCN 増幅の有無に関わらず、初期治療は、JANB91の MYCN 増幅群への化学療法 (91A3) を基本とした 98A3 を当初から 6 コース施行する。2) MYCN 非増幅の病期 3 には幹細胞移植を伴う大量化学療法は行わない。などを骨子として施行された。2003年9月までの適格症例は147例であり、病期4は、127例で2年生存率が71%、3年生存率が52%と短期の生存率は良好であったが、長期のフォローアップの結果は出ていない¹⁵⁾。JANB85, 91, 98 を通じて1才以上の病期4における幹細胞移植を受けた群 (SCT+) 210例と受けてない群 (SCT-) 127例の5年生存率は、SCT+ (51%) に対してSCT- (41%) と有意に ($P < 0.05$) 幹細胞移植が有効であったという解析結果が出ており¹⁶⁾、特にMYCN増幅群においては、SCTの有効性が示された。SCT+群とSCT-群は、ランダムスタディではないので、症例のバイアスがかかっていることは、否めないが、この成績は、初期治療でいかに腫瘍をコントロールして幹細胞移植までもっていきけるかが、治療成績向上につながっていると言えた。

2. JNBSGにおける高リスク神経芽腫群の臨床試験

このように、本邦における1985年からの全国規模の年長児神経芽腫に対する多施設共同治療研究は、その成績において国際的にひけをとらない結果をあげているが、登録時にバイアスがあった可能性や、プロトコル逸脱例が、多かった点、副作用報告システムの整備が不十分であった点などの問題があり、国際的な臨床試験に比較してその臨床研究体制から非常に遅れている。そこで、神経芽腫全体を包括するデータセンターをもち、臨床試験とリンクした中央病理診断やトランスレーショナルリサーチを可能とする検体センターをそなえた全国的組織であるJNBSGにおいて以下のような2つの臨床試験が行われた¹⁷⁾。

1) 「進行神経芽腫に対し原発巣切除術を含む局所療法を大量化学療法後に遅延させて行う治療計画 (遅延局所療法 delayed local treatment) の早期第II相臨床試験」

目的：遠隔転移を有する1才以上の神経芽腫患者に対して、寛解導入化学療法及び自家造血幹細胞救済療法を併用した骨髄破壊の大量化学療法を先行させ、局所療法としての外科療法及び放射線療法を大量化学療法後に遅延させて行う治療 (遅延局所療法 {delayed local therapy} と呼ぶ) の安全性と有効性を評価する。

治療：寛解導入化学療法としてCPA/VCR/THP/CDDP かなるレジメンを計5コースの投与と、自家造血幹細胞救済を併用したL-PAM/VP-16/CBDCAの大量化学療法のと、外科療法及び放射線療法を施行する。

2) 「高リスク神経芽腫に対する標準的集学的治療の後期第II相臨床試験」

目的：Children's Oncology Group リスク分類にて高リスクと判定される1歳以上、18歳未満の神経芽腫患者に対して、寛解導入化学療法と外科療法、自家造血幹細胞救済療法を併用した骨髄破壊の大量化学療法、及び放射線療法を施行することの安全性と有効性を評価する。

治療：寛解導入化学療法としてCPA/VCR/THP/CDDP かなるレジメンを3 or 4コースの投与の後、外科療法を行い、寛解導入療法を2 or 1コース追加した後、自家造血幹細胞救済を併用したL-PAM/VP-16/CBDCAの大量化学療法及び放射線療法を施行する。ただし、ステージ3、日齢547日以上、MYCN増幅なし、予後不良組織型のサブグループに関しては、大量化学療法+自家造血幹細胞移植を行わず、代わりに寛解導入化学療法と同じレジメンを1コース強化療法として追加して施行する。

1) の臨床試験に関しては、限定7施設において2005年11月から臨床試験が開始されたが、PD症例や試験中止症例が、当初の10例ほどで、複数認められたため、一旦、登録中止となった。原因を解析した結果、登録症例においてバイオロジーに関して非常に悪性度の高い症例が多く存在していたことがわかった。そこで、現在は、施設限定を解除した全国的な臨床試験が、2011年5月より開始され、進行中である。2) の臨床試験に関しては、当初より全国多施設で2007年3月から登録開始され、2009年2月に登録終了、2012年2月末で追跡も終了した。解析結果は、2012年の国際学会、及び、日本小児血液・がん学会学術総会でも発表予定である。

高リスク群における現在の国際的な治療のトピックは、GD2抗体を用いた免疫治療である。COGのグループにおいて、高リスク群に対してGD-2抗体+IL-2+レチノイン酸による臨床試験において驚異的な治療効果が報告されている¹⁸⁾。SIOPENにおいても、種類の異なるGD-2抗体において、有効な治療効果を得ている。副作用の改善などが必要であるが、今後、本邦の高リスク群に対する臨床試験へのGD-2抗体の導入は最重要課題である。

3. 年長児進行神経芽腫における外科治療の概念

進行神経芽腫における外科治療に関しては系統的リンパ節郭清の有無を含めて必ずしも統一した見解は得られていない。もともと神経芽腫は後腹膜腫瘍で大動脈やその主要分岐、下大静脈を巻き込んでいることも多く、厳密な意味での全摘は非常に困難である。また、腫瘍の切除度合は、生命予後の改善及び局所再発を防ぐために限界までの完全摘出 (CR) が必要であるのか、それとも外科手技による周囲臓器の侵襲を少なくし、治療の早期継続を目指すし、正常臓器の障害を少なくして後障害をなくすため、血

管周囲の少量の遺残腫瘍は許容してもよいか (<CR) という点である。CR群の方が生存率が優れているとするのは、HasseによるCCSGからの報告¹⁹⁾、La QuagliaによるMemorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) からの報告²⁰⁾があり、また我が国ではTsuchidaによるJANB-85研究からの報告²¹⁾、Kurodaによる国立成育医療センターからの報告²²⁾がある。一方、金子らによる筑波大学における報告では、年長児進行神経芽腫において手術はできるだけ周囲臓器、血管を温存するようにして全摘し、リンパ節も周囲組織を損傷しないようにサンプリングするにとどめ、術中照射を併用するという方針で行った結果、局所再発が死亡の原因となった症例はなかったと報告している²³⁾。九州大学においても金子らとほぼ同様な手術法と体外照射による局所放射線療法を行ってきたが、1985年から2003年までに治療を開始した九州大学小児外科における年長児 (1才以上) 症例41例において原発巣の外科切除率と予後との関係では全摘出例 (19例) と非全摘出例 (22例) に有意差を認めず、また、stage 3, 4の進行症例 (32例) に限っても、原発巣の外科的切除率と予後との関係において、全摘出例 (11例) と非全摘出例 (21例) に有意差を認めなかった。当施設では腫瘍非全摘出例において、より強力な化学療法が施行されたわけではなく、むしろ、腫瘍全摘出例に対して積極的に骨髄移植を伴う大量化学療法を選択する方針であったにも関わらず、全摘出例と非全摘出例に予後の差を認めなかったと言える⁸⁾。

術式と局所放射線照射に関しても、まだ一定の見解は得られていない。また、術中照射と術後体外照射の選択に関しても同様である。Kurodaらはstage 3, 4の進行神経芽腫に対してIntensive Operationと10 Gy～15 Gyの術中照射を施行し、良好な予後を得ていると報告している²²⁾。一方、Simonらは1才以上のstage 4の症例に対して手術後にMIBGシンチにて陽性である局所残存腫瘍に対して36 Gy～40 Gyの局所放射線照射を施行した結果、完全摘出した症例とほぼ同等の良好な予後を得ることができたことを報告している²⁴⁾。術中照射と体外照射の功罪についてであるが、まず、効果的には術中照射10 Gyが体外照射の30 Gyにはほぼ等しいと言われている。術中照射の利点としては手技が1回で済むことから術後体外放射線照射がほぼ毎日約1ヶ月間継続して行うことの患児への負担と管理上の煩雑さが少ないことが挙げられる。ただ、短所としては、小児の場合、スペースが狭く、照射したい範囲を十分に確保できるかどうかの問題であり、術中照射の範囲外から局所再発したという報告も認められる²²⁾。また、血管周囲のリンパ節郭清を伴うような侵襲の高い根治術の場合、術中照射の方が血管狭窄などの長期的な副作用などが、体外照射よりリスクが高いことが懸念されている。九州大学においては、1才以上のINSS stage 3, 4の進行神経芽腫に対しては、

1985年より一貫した治療方針として生検による初期手術を行い、腫瘍縮小後に、系統的リンパ節郭清を行わない臓器温存のsecond look operationを施行してきた。その際、腎合併切除により腫瘍全摘が可能であれば、原則的に腎合併切除を行い、腎合併切除を行っても、主要血管浸潤等により腫瘍全摘が不可能の考えられた場合は、腎温存の腫瘍全摘を目標とした。その後、原則的には、腫瘍全摘であれば、約30 Gy (原則として1.5 Gyを20回) の体外放射線照射に加えて骨髄移植を伴う大量化学療法を行って治療を終了とし、また、腫瘍非全摘であれば、体外放射線照射に加えて地固め化学療法を続行してきた⁸⁾。1994年以降のstage 4症例で原発腫瘍全摘出した10例の臨床経過において4例が再発しているが、再発形式は全て遠隔転移再発である。末梢血幹細胞移植に伴う大量化学療法は、このうち7例に施行したが、施行症例、非施行症例において再発形式及び転帰に差異を認めなかった。現行の統一進行神経芽腫プロトコールに基づいた導入化学療法と系統的リンパ節郭清までは行わない腫瘍摘出術に放射線照射を加えた治療により局所腫瘍のコントロールは良好であると言え、また、遠隔転移のコントロールを含めて考えた場合、治療の主体は化学療法であり、外科治療はその前後の化学療法の妨げになるような手法は避けるべきと考えられる。

以上のような背景から、JNBSGにおける年長児進行神経芽腫に対する臨床試験においては、局所療法のquality controlを統一するために外科治療ガイドラインを作成し、手術記録の提出を求めている。

IV マスクリーニング休止後の本邦における神経芽腫の臨床像

マス休止後 (2004年3月以降) に発症して九州大学で治療を受けた症例は、2008年3月までに16例存在し、そのうち6ヶ月以降に発症した症例13例に対してその臨床像と生物学的予後因子を検討した²⁵⁾。年齢は8ヶ月から5歳7ヶ月まで病期はstage 4の症例が8例と進行症例を多く認めた。また、発見契機については、検診や偶然の胸写異常で4例が発見されていたが、それらの病期はstage 1が3例、stage 2Aが1例と早期発見されていた。原発巣は2例が縦隔で、1例が後腹膜であり、その他は副腎原発であった。現在治療中が5例あるが、腫瘍死した症例は今のところ存在しない。また、この13例に関しては、いずれも尿中VMA、HVAのいずれかまたは両方が高値を示していた。Brodeur分類²⁶⁾による悪性度分類では、aneuploidであったtype 1の症例は4例であった。検診などで偶然発見された4例はtype 1が3例でtype 2Aが1例であった。Type 2Bの症例、つまりMYCN増幅があった症例は症例6の1例のみであった。その他にMYCNが微増しているMYCN gainの症例を

症例9の1例に認めた。この症例9を含めて8例がtype 2Aであった。これらの臨床像と悪性度分類の結果から、13例におけるマス休止の影響について検討してみた。1歳前後までに見つかった症例については、6ヶ月時に腫瘍があったと仮定し、13例全部が、尿中VMA、HVAのいずれかまたは両方が高値を示していたことから考察した結果、マスが施行されていれば、6ヶ月時に発見されていたと思われる症例が、8例存在し、6例はdown stagingや術後化学療法の必要がなかった可能性があると考えられた。type 2Aの5例は発見時期が遅く、6ヶ月マスで発見されていたかは不明である。

マス休止が神経芽腫の臨床像と悪性度にどのような影響を与えたかを考察するために、マス休止後に発症した症例(6ヶ月以降に発見された症例)とマス施行時期の症例(マス症例を含め6ヶ月以降に発見された症例で予後因子解析によりBrodeur分類可能症例)をBrodeur分類と臨床病期に関して比較してみた。その結果、type 1の症例は、マス休止後に減少していた。一方、type 2A症例の割合がマス休止後に明らかに増加傾向(19%→62%)にあり、type 2A症例の臨床病期は、マス施行時期に比べてマス休止後では、stage 4症例の割合が明らかに増加していた(50%→88%)。さらにマス施行時期のデータをマス発見群(MS positive cases)、マス陰性後発症群(MS negative cases)、マス未受診群(Non screened cases)に分けて悪性度分類を検討してみたところ、マス発見例の大部分を占めていたtype 1症例は、マス休止後は、発見される割合が激減(89%→31%)していた。また、マス施行時期のマス未受診群は、マス休止後症例と同等の悪性度の割合が予想されるが、やはり、type 2Aの割合は、マス未受診群:59%に対してマス休止後群:62%とほぼ同じ割合を占めていた。これらの解析結果から考察すると、1. マス発見例の大部分を占めていたtype 1症例が、マス休止後では、大部分が自然退縮して発見される割合が減少している。2. マスで発見されていたtype 2A症例は、マス休止後では、年長児において進行病期で発見される割合が増加している。3. 組織学的に証明されていないが、マス発見例でtype 1と判定されていた腫瘍内にtype 2Aの細胞が部分的に存在し、マス休止後において、そのような症例のtype 2Aの細胞が選択的に増殖して、発見時には、type 2Aの進行症例として判定される可能性があると考えられた。

マス休止後症例がまだ少ないため、明らかなことは言えないが、6ヶ月マスで発見されていた症例は、大部分が自然退縮するような予後良好群であり、治療する必要がなかった症例が存在している一方で、放置していた場合、年長児で進行症例として発見されていた症例が一部、含まれていた可能性があり、そのような症例の予後には、マスは貢献したと考えられる。今後、多くのマス休止後症例の臨床像

と悪性度解析の蓄積が必要である。

V 終わりに

日本における今までの神経芽腫に対する臨床の治療成績は、国際的水準といっても過言ではなかったといえる。しかしながら、これまで、マスキューニングの効果判定を含む乳児神経芽腫の治療にしても年長児進行神経芽腫の治療にしても、きちんとした臨床試験の形式をとっていなかったことや、スタディグループの基盤整理がなされていなかったことから、その優れた治療成績が国際的に十分に評価されていなかった。今後、JNBSGにおける臨床試験を中心に日本の神経芽腫の治療法そして治療成績、及び、トランスレーショナルリサーチを国際的に発信していくことが望まれる。

文 献

- 1) Sawaguchi S, Michio K, Uchino J, et al: Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy: A report from the Study Group of Japan. *Cancer*, 66: 1879-1887, 1990.
- 2) Matsumura T, Sawada T, Shikata T, et al: Management for neuroblastoma infants in Japan. *The Korean J Pediatr Hematol/Oncol*, 18-28, 1997.
- 3) 家原知子, 澤田 淳, 松村隆文, 他: 神経芽腫マス・スクリーニング発見例における治療法の変遷と予後. *小児がん*, 34: 228-232, 1997.
- 4) Suita S: Stephen L. Gans overseas lecture. Mass screening for neuroblastoma in Japan: lessons learned and future directions. *J Pediatr Surg*, 37: 949-954, 2002.
- 5) Woods WG, Tuchman M, Robison LL, et al: A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet*, 348: 1682-1687, 1996.
- 6) Matsumura T, Sawada T, Shikata T, et al: New trend in treatment strategy for neuroblastoma infants in Japan. *Proceedings of the 32 nd Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol*, 15: 461, 1996.
- 7) 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.
- 8) 田尻達郎, 木下義晶, 高橋由紀子, 他: 神経芽腫における外科治療の役割(一施設症例の解析からの考察) *The role of surgical intervention in the treatment for neuroblastoma. 小児がん*, 42: 64-68, 2005.
- 9) 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: 298-297, 2009.
- 10) 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.
- 11) 田尻達郎, 米田光宏, 家原知子, 他: 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. *小児外科*, 43: 1173–1178, 2011.
 - 12) 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*, 261: 243–257, 2011.
 - 13) Kaneko M, Tsuchida Y, Uchino J, et al: Treatment results of advanced neuroblastoma with the First Japanese Study Group Protocol. *J Pediatr Hematol/Oncol*, 21: 190–197, 1999.
 - 14) Kaneko M, Tsuchida Y, Mugichima H, et al: Intensified chemotherapy increases the survival rates in stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol/Oncol*, 24: 613–621, 2002.
 - 15) 金子道夫, 平井みさ子: これまでの進行神経芽腫の治療と将来の展望. *小児がん*, 41: 39–43, 2004.
 - 16) Suita S, Tajiri T, Kaneko M, et al: Implications of MYCN amplification in patients with stage 4 neuroblastoma who undergo intensive chemotherapy. *J Pediatr Surg*, 42: 489–493, 2007. Gurney JG, Davis S, Severson RK, et al: Trends in cancer incidence among children in the U.S. *Cancer*, 78: 532–541, 1996.
 - 17) 七野浩之: 神経芽腫高リスク群に対する JNBSG 臨床試験. *小児外科*, 43: 1184–1189, 2011.
 - 18) Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, et al: Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*, 363: 1324–1334, 2010.
 - 19) Haase GM, O’Leary MC, Ramsay NKC, et al: Aggressive surgery combined with intensive chemotherapy improves survival in poor-risk neuroblastoma. *J Pediatr Surg*, 26: 1119–1124, 1991.
 - 20) La Quaglia MP, Kushner BH, Heller G, et al: Stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age: gross total resection and clinical outcome. *J Pediatr Surg*, 29: 1162–1166, 1994.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) 金子道夫: 神経芽腫の手術—これまでとこれから. *日外会誌*, 106: 418–421, 2005.
 - 24) Simon T, Hero B, Bongarts R, et al: Intensified external-beam radiation therapy improves the outcome of stage 4 neuroblastoma in children >1 year with residual local disease. *Strahlenther Oncol*, 182: 389–394, 2006.
 - 25) 田尻達郎, 宗崎良太, 木下義晶, 他: 生物学的予後因子解析からみたマスキリーニングの功罪. *小児外科*, 40: 1047–1053, 2008.
 - 26) Brodeur GM: Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, 3: 203–216, 2003.

臨床医の観点からの小児がんにおける トランスレーショナルリサーチ

田 尻 達 郎*

京都府立医科大学大学院医学研究科小児外科学

Translational Research for Pediatric Cancer by the Clinician

Tatsuro Tajiri

*Department of Pediatric Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine,
Graduate School of Medical Science*

抄 録

小児がんは症例毎にその腫瘍の悪性度が様々であることから、その治療にあたっては、まず腫瘍の生物学的悪性度を判定することが必要不可欠である。主に分子生物学的手法を使ったトランスレーショナルリサーチを実際に小児がんの治療を行う臨床医自身が携わることは、症例毎の高度なテーラーメイド型治療につながる。本稿においては、臨床医の観点に立ってこれまで行ってきた神経芽腫を中心とした悪性度を判定する予後因子解析の内容を紹介し、また、最近、難治性小児がんに対する新規治療法の開発を目指して樹状細胞を用いた免疫遺伝子治療の開発を行っているのを併せて紹介する。

キーワード：小児がん、予後因子、トランスレーショナルリサーチ、神経芽腫、免疫治療。

Abstract

Pediatric cancers have the heterogeneity of biology. In order to select the optimal treatment according to the degree of malignancy, it is essential to accurately identify any biology associated with the prognosis. The translational research for pediatric cancer using the method of molecular biology by the clinician will result in the tailor-made treatment. In this manuscript, we will introduce the analysis of prognostic factors in neuroblastomas, and the establishment for Dendritic cell-based immunotherapy for neuroblastomas.

Key Words: Pediatric Cancer, Prognostic factor, Translational Research, Neuroblastoma, Immunotherapy.

平成24年 10月 1日 受付

*連絡先 田尻達郎 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地

taji@koto.kpu-m.ac.jp

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

はじめに

小児がんは、神経芽腫をはじめとして症例毎にその腫瘍の悪性度が様々であることから、その治療にあたっては、まず腫瘍の生物学的悪性度を判定することは必要不可欠である。小児がんにとっては、このような悪性度解析がいわゆるトランスレーショナルリサーチと言われる研究の主役であると考えられるが、主に分子生物学的手法を使ったこのトランスレーショナルリサーチを実際に小児がんの治療を主に行う臨床医自身が携わることは、症例毎の高度なテーラーメイド型治療につながると思われる。本稿においては、臨床医の観点に立ってこれまで行ってきた神経芽腫を中心とした悪性度を判定する予後因子解析の内容を紹介し、また、最近、難治性小児がんに対する新規治療法の開発を目指して樹状細胞を用いた免疫遺伝子治療の開発を行っているのを併せて紹介したい。

神経芽腫予後関連遺伝子の 数的変化の高感度解析

神経芽腫は神経堤由来の細胞が腫瘍化したもので副腎髄質、交感神経幹に多く発生する。神経芽腫の生物学的特性は多岐にわたり、予後と関連した臨床的あるいは分子生物学的因子の研究が盛んになされてきた。悪性度の程度に合わせた至適治療を行うため、分子生物学的手法を用いて予後と関連した遺伝学的異常を迅速かつ正確に同定することが重要である。

神経芽腫の臨床的予後因子としては、年齢(1才未満は予後良好)、臨床病期、原発部位(副腎原発は、その他の部位に比較して予後不良)、組織分類(Shimada分類)などがあげられる。生物学的予後因子には、MYCN 遺伝子増幅、DNA ploidy、1p LOH、11q LOH、17q gainなどがあげられるが、その中でも最も強力な予後関連遺伝子として、その数的変化の測定が悪性度判定に必要不可欠であったものがMYCN 遺伝子の増幅である¹⁾。1991年以降、日本の進行神経芽腫のスタディグループではMYCN 増幅の有無(MYCN 増幅が10コピー以上か否か)にも

とづき、2つの化学療法のレジメが用いられてきた²⁾。そのため、MYCN 増幅の状況を迅速かつ正確に判定することが治療上求められる。その解析法は、従来、サザンブロット法による解析が一般的であり、10コピーを境界として悪性度の判定を行っていた。これは腫瘍組織全体の解析法であり、腫瘍内のheterogeneityは評価できない。一方、FISH法(fluorescence in situ hybridization)は個々の神経芽腫細胞のMYCN 増幅の状況を評価できるが定量性に欠く。また、定量的PCRは、FISH法のように個々の細胞における評価はできないが、組織全体における遺伝子数量の測定に関しては、サザンブロット法より簡便に短時間で施行可能で感度が高い手法と言われている³⁾。我々は、以前よりFISH法のようにin situで個々の細胞を検索できる手法を併用することにより、腫瘍組織内におけるMYCN 増幅細胞を高感度に把握することができることを報告してきたが⁴⁾、神経芽腫における定量的PCR法によるMYCN 増幅解析の臨床的意義を確定させるために、さらに多数の神経芽腫検体において本法による解析を行い、サザンブロット法、及びFISH法による解析結果と比較検討した。

その結果、サザンブロットにてMYCNがsingle copyであった54例中内46例はMYCN gene dosage(MYCN/p53)は2.0未満だった。2.0以上を示したのは8例ですべてstage 3, 4症例、そのうち3例は腫瘍死している。また、サザンブロットでMYCNが2コピー以上の12例において定量的PCRでのMYCN gene dosageの値は全て10.0以上で、そのほとんどが、サザンブロットの値より高値を示した。サザンブロットにてsingle copyであった症例で、FISHを用いてMYCN 増幅を検索できた23例のMYCN gene dosageをclinical stage別に見ると、非進行症例(stage 1, 2, 4S)は18例、進行症例(stage 3, 4)は5例で、gene dosageが2.0以上を示したものは進行症例の2例のみで、その2例だけがFISHにてMYCN 増幅細胞を検体中に認めた。Case 1は、検体中の有核細胞の15%、Case 2は29%にそれぞれMYCN 増幅細胞を認め、腫瘍内のheterogeneityが疑われた(図1)。これら

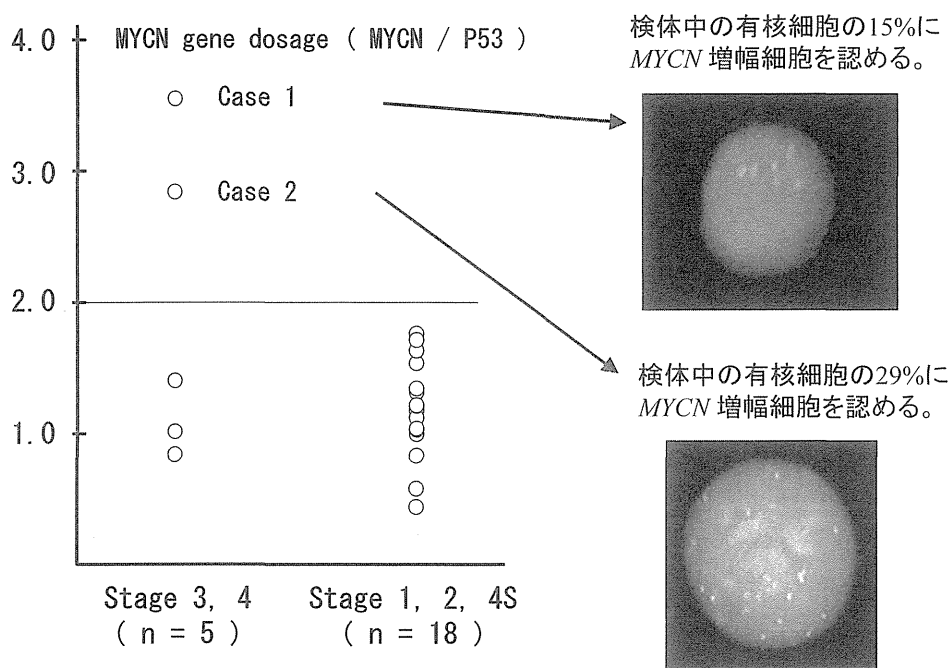


図1 サザンプロット MYCN 1 copy 症例における定量的 PCR と FISH 法による MYCN 遺伝子増幅

の結果から、MYCN 増幅解析は、定量的 PCR と FISH 法の組み合わせが最も高感度であり、治療方針の選択に最も有用であると考えられた⁵⁾⁶⁾⁷⁾。現在、国際的にもこの組み合わせによる判定法が標準的とされている。

また、検体中に MYCN 増幅細胞が部分的に存在する (腫瘍内 heterogeneity) 症例をさらに検討するために、定量的 PCR は微量な sample からでも解析可能であるため、マイクロダイセクション法を用いて顕微鏡下に腫瘍組織の多数の部分から腫瘍細胞を採取し、定量的 PCR にて解析した。その結果、腫瘍組織全体から抽出した DNA による定量的 PCR にて MYCN 遺伝子量の微量増加した症例の中に数か所の MYCN 遺伝子量の増幅した細胞集塊と MYCN 遺伝子量が正常の細胞集塊を認めるような症例も存在していた⁸⁾。今後、検体中に MYCN 増幅細胞が部分的に存在するような症例に対して、どの程度の治療法を選択すべきかを検討するためにさらにマイクロダイセクションによる解析数を増やす必要があると思われる。

発現量変化による神経芽腫新規予後関連遺伝子の検討

発現量が神経芽腫の予後に関与する遺伝子としては、神経成長因子受容体ファミリーの TrkA (Tropomyosin-Related Kinase A) 遺伝子が最も知られているが、我々は新規予後関連遺伝子の検討として、c-MYC 蛋白に結合してアポトーシスを誘導する蛋白として同定されていた BIN1 (Bridging integrator 1) 遺伝子の神経芽腫における役割に注目した。BIN1 は神経組織において高発現しており、c-MYC の BIN1 結合部位 (MB1) は、MYCN と 100% のホモロジーがあり、また、MYCN が増幅した神経芽腫細胞株において発現が低下していることがわかっていった。これらの背景から、神経芽腫において BIN1 蛋白は MYCN 蛋白と協調してアポトーシスを誘導していると予想されたので、我々は、まず、神経芽腫 56 検体における BIN1 遺伝子発現を定量的 PCR にて解析した。その結果、BIN1 遺伝子発現は、神経芽腫の既知の複数の予後良好因子群において有意に高発現であり、神経芽腫細胞株における強制発現の結果、

MYCN 蛋白と協調してアポトーシスを誘導することが明らかになった⁹⁾。

次に、我々は、マイクロアレイシステムを用いて新規予後関連遺伝子の検討を行った。既知の予後因子が全て予後良好である神経芽腫検体3検体と全て予後不良である神経芽腫検体3検体からそれぞれ、mRNA をプールし、cDNA マイクロアレイにて両群間の遺伝子発現差異を解析した。その結果、予後不良群に優位に発現している遺伝子群を約 400 抽出し、また、予後良好群に優位に発現している遺伝子を約 40 抽出した。その中で、胎生期の脳神経系に特異的に発現している Neuronatin (Nnat) 遺伝子に注目した。Nnat は 1994 年にはじめて哺乳動物の新生児の脳からクローンされた。哺乳動物種で高度に保存されており、発生途上の哺乳類の神経系で認められる。マウスを用いた研究にて、Nnat の発現はまず胎生 8.5 日に後脳に認められ、その後、中枢神経から末梢神経へと広がっていき、出生後に徐々に消失する。交感神経系、副腎にも、マウスの胎生 15 日目に認められている。この遺伝子は 20 番染色体長腕 11.2-12

に存在しており、3973 鎖長である。3つのエキソンと2つのイントロンを含み、スプライシングバリエーションとして2つの発現型 Nnat α , β がある。 α フォームは3つのすべてのエキソンを含み、 β フォームは α フォームの中央のエキソンを除く2つのエキソンを含む。神経発生における Nnat の機能はまだ明らかではない。神経芽腫 70 検体にてその発現量を定量的 PCR にて測定した結果、Nnat α , β のいずれのアイソフォームにおいても、BIN1 遺伝子と同様に既知の複数の予後良好因子群においてに高発現であり、特に Nnat β は、既知の予後良好因子群、全てにおいて有意に高発現であった(表1)。これらの結果から神経芽腫における新規予後関連遺伝子の可能性が示唆された¹⁰⁾。Neuronatin 遺伝子の神経芽腫における機能は、まだ、不明であるが、神経芽腫細胞株 (IMR32) において強制発現させると神経突起の延長が認められることから、神経芽腫の成熟・分化に関与していることが予想され、今後、その機能についてさらなる解析を行う予定である。

表1 70 神経芽腫検体における Nnat β 発現量と予後因子

分類		Nnat β /18s rRNA (%TILE 50%)	P value (Mann-Whitney U test)
年齢	1才未満	1.72	P < 0.01
	1才以上	0.36	
病期	stage 1, 2, 4S	1.11	P < 0.01
	stage 3, 4,	0.36	
DNA ploidy	aneuploid	0.96	P < 0.05
	diploid	0.33	
Shimada分類	Favorable	1.79	P < 0.01
	Unfavorable	0.14	
MYCN 増幅	なし	1.01	P < 0.01
	あり	0.06	
転帰	生存	1.01	P < 0.01
	死亡	0.37	

神経芽腫予後関連遺伝子解析の 組み合わせによる悪性度判定システム

FISH法と定量的PCRを用いた遺伝子数的解析 (MYCN増幅) と、定量的RT-PCRを用いた遺伝子発現量解析 (既知予後因子のTrkA, 新規予後因子のBIN1, Neuronatin β (Nnat β)) を組み合わせることによる悪性度判定システムの確立を検討した。その結果, TrkA, BIN1, Nnat β 発現量の3因子の組み合わせと臨床病期及び

転帰との解析の結果, 3不良因子は神経芽腫の悪性度と有意に相関していた(図2)⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。さらにこの3因子にMYCN増幅の高感度解析を加えた4因子の組み合わせ解析の結果, 不良因子を0~4個有する症例のそれぞれの5年生存率は, 92%, 88%, 78%, 40%, 0% ($P < 0.001$, trend test by Kruskal-Wallis exact test) であり, この分類にて神経芽腫悪性度に関して5群の層別化が可能であった(表2)。このシステムにおけるExtremely high risk群(4不良因子)には新規

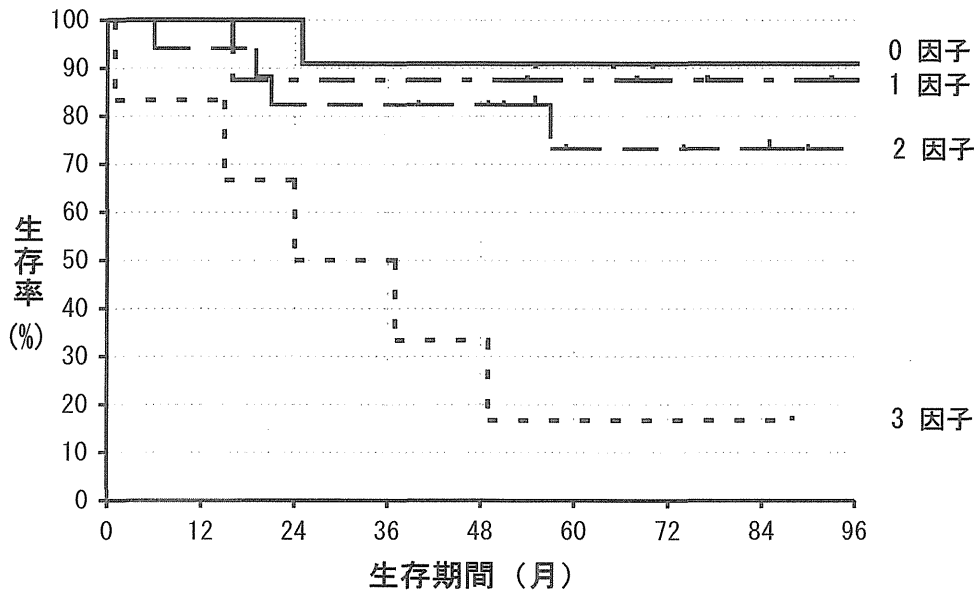


図2 3予後不良因子 (TrkA 低発現, BIN1 低発現, Nnat β 低発現) の保有数と生存率曲線

表2 4つの予後不良因子 (MYCN増幅, TrkA 低発現, BIN1 低発現, Nnat β 低発現) の保有数と5年生存率

	4 factors	3 factors	2 factors	1 factor	0 factor
Risk 分類	Extremely High	Secondly High	Intermediate	Low 1	Low 0
5年生存率	0%	40.1%	78.2%	88.3%	92.2%

($P < 0.001$, trend test by Kruskal-Wallis exact test)

治療法の開発が望まれ、Secondly high risk 群 (3 不良因子) には、現行の強力な集学的治療法の適正な遂行、その他の群には、治療合併症を極力避けた臨床プロトコルの確立と遂行が望ましいと考えられた。

乳児神経芽腫マスキング 休止後における神経芽腫の臨床像

本邦における乳児神経芽腫の臨床は、乳児神経芽腫マスキング (マス) を抜きにして述べることでできない。マスは、神経芽腫が1才以上の年長児が予後不良であることから、早期に発見し、できるだけ早く治療を行うことにより、治療成績を向上させることを目的として、生後6ヶ月の全ての乳児を対象にして尿中VMA, HVAによるスクリーニングを行う事業が、全国的には1985年から開始された¹³⁾。しかし、マス施行後に明らかに神経芽腫の罹患率が増加し、マスで発見された症例は、大部分が生物学的良好な神経芽腫であり、自然退縮するようなものも含まれていた。また、マス受診時に結果が陰性で、その後に年長児で臨床的に発症してくる症例が存在し、そのような症例の多くは進行症例で悪性度も高いことから多くが予後不良であった¹⁴⁾。また、欧米の短期間の研究から死亡率の低下が明らかでなく¹⁵⁾、マスの有効性が疑問視されたことなどを受けて、行政は2004年3月に全国でマスを休止とした。

マス休止後 (2004年3月以降) に発症して九州大学で治療を受けた症例は、2008年3月までに16例存在し、そのうち6ヶ月以降に発症した症例13例に対してその臨床像と生物学的予後因子を検討した¹⁶⁾。年齢は8ヶ月から5歳7ヶ月まで病期はstage4の症例が8例と進行症例を多く認めた。また、発見契機については、検診や偶然の胸写異常で4例が発見されていたが、それらの病期はstage1が3例、stage2Aが1例と早期発見されていた。原発巣は2例が縦隔で、1例が後腹膜であり、その他は副腎原発であった。現在治療中が5例あるが、腫瘍死した症例は今のところ存在しない。また、この13例に関しては、いずれも尿中VMA, HVAのいずれか

または両方が高値を示していた。Brodeur分類¹⁷⁾による悪性度分類では、aneuploidであったtype1の症例は4例であった。検診などで偶然発見された4例はtype1が3例でtype2Aが1例であった。Type2Bの症例、つまりMYCN増幅があった症例は症例6の1例のみであった。その他にMYCNが微増しているMYCN gainの症例を症例9の1例に認めた。この症例9を含めて8例がtype2Aであった。これらの臨床像と悪性度分類の結果から、13例におけるマス休止の影響について検討してみた。1歳前後までに見つかった症例については、6ヶ月時に腫瘍があったと仮定し、13例全部が、尿中VMA, HVAのいずれかまたは両方が高値を示していたことから考察した結果、マスが施行されていれば、6ヶ月時に発見されていたと思われる症例が、8例存在し、6例はdown stagingや術後化学療法の必要がなかった可能性があると考えられた。type2Aの5例は発見時期が遅く、6ヶ月マスで発見されていたかは不明である。

マス休止が神経芽腫の臨床像と悪性度にどのような影響を与えたかを考察するために、マス休止後に発症した症例 (6ヶ月以降に発見された症例) とマス施行時期の症例 (マス症例を含め6ヶ月以降に発見された症例で予後因子解析によりBrodeur分類可能症例) をBrodeur分類と臨床病期に関して比較してみた。その結果、type1の症例は、マス休止後に減少していた。一方、type2A症例の割合がマス休止後に明らかに増加傾向 (19%→62%) にあり、type2A症例の臨床病期は、マス施行時期に比べてマス休止後では、stage4症例の割合が明らかに増加していた (50%→88%)。さらにマス施行時期のデータをマス発見群 (MS positive cases)、マス陰性後発症群 (MS negative cases)、マス未受診群 (Non screened cases) に分けて悪性度分類を検討してみたところ、マス発見例の大部分を占めていたtype1症例は、マス休止後は、発見される割合が激減 (89%→31%) していた。また、マス施行時期のマス未受診群は、マス休止後症例と同等の悪性度の割合が予想されるが、やはり、type2Aの割合は、マス未受診群: 59%

に対してマス休止後群：62%とほぼ同じ割合を占めていた。これらの解析結果から考察すると、1. マス発見例の大部分を占めていたtype1症例が、マス休止後では、大部分が自然退縮して発見される割合が減少している。2. マスで発見されていたtype2A症例は、マス休止後では、年長児において進行病期で発見される割合が増加している。3. 組織学的に証明されていないが、マス発見例でtype1と判定されていた腫瘍内にtype2Aの細胞が部分的に存在し、マス休止後において、そのような症例のtype2Aの細胞が選択的に増殖して、発見時には、type2Aの進行症例として判定される可能性がある。と考えられた。

マス休止後症例が、まだ、少ないため、明らかかなことは言えないが、6ヶ月マスで発見されていた症例は、大部分が自然退縮するような予後良好群であり、治療する必要がなかった症例が存在している一方で、放置していた場合、年長児で進行症例として発見されていた症例が一部、含まれていた可能性があり、そのような症例の予後には、マスは貢献したと考えられる。今後、多くのマス休止後症例の臨床像と悪性度解析の蓄積が必要である。

難治性小児がんに対する樹状細胞を用いた免疫遺伝子治療の開発

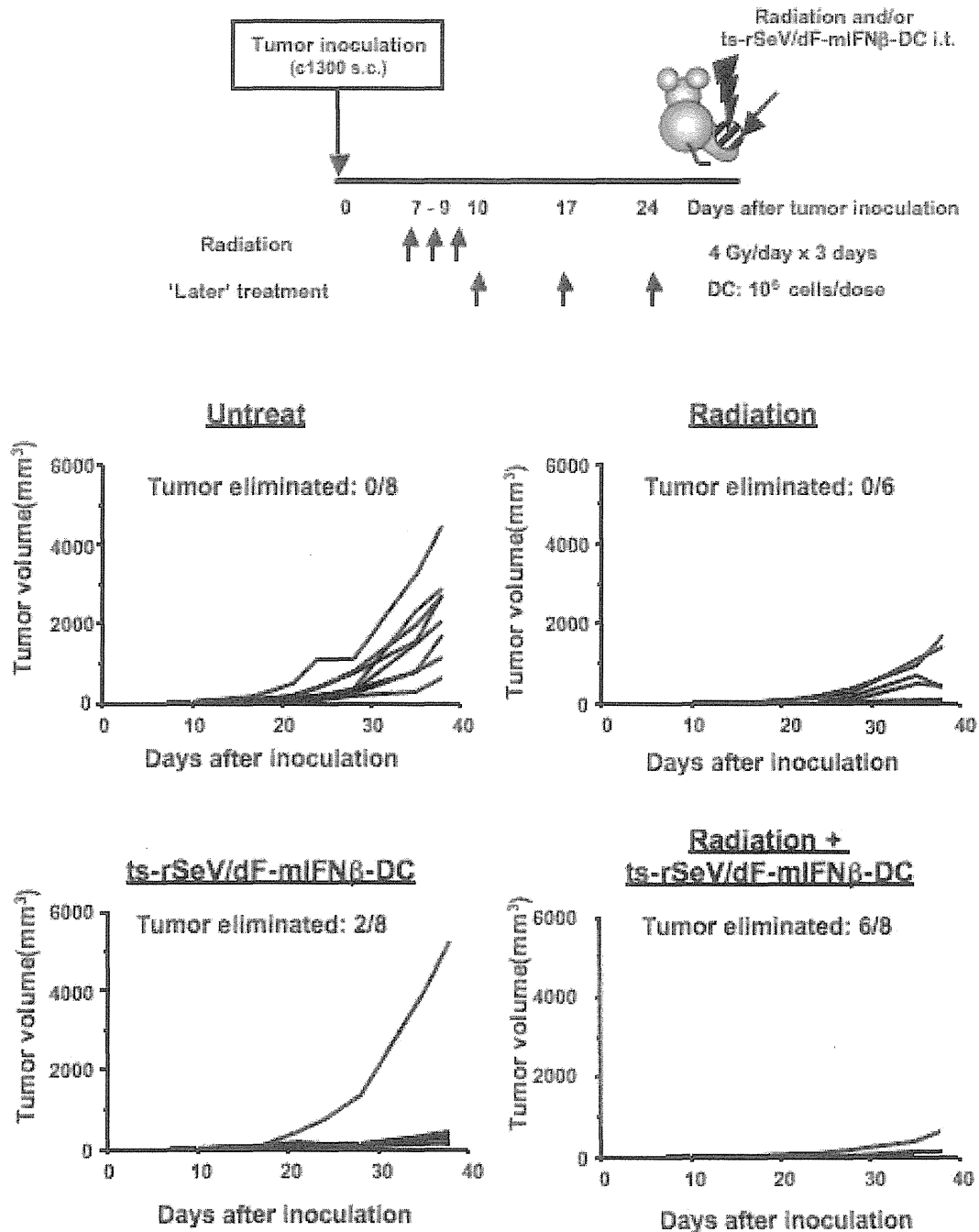
神経芽腫は、ガングリオシドの産生、ケモカインの産生抑制、MHC class 1 発現抑制などによって宿主免疫より逃れていると考えられる。新規治療法の開発として我々は、樹状細胞による免疫治療に注目し、センダイウイルスベクター (SeV) によって活性化された樹状細胞 (ts-rSeV/dF-DCs) を用いた免疫遺伝子治療を臨床応用することを目的としたマウスにおける前臨床試験を行った¹⁸⁾。

A/Jマウスにマウス神経芽細胞腫 C-1300 を 10^6 個皮下接種し、生着後、骨髄由来 DC を SeV にて活性化し治療に用いた。腫瘍生着後3日目より治療開始する群を早期治療群、10日目より治療開始する群を後期治療群とした。ts-rSeV/dF-mIFN β (前研究で B16 メラノーマにおいて抗

腫瘍効果を効率よく増強することのできたマウス IFN- β 遺伝子を、ts-rSeV/dF を用いて樹状細胞へと導入した) を用いた場合、早期治療群では60%の個体で腫瘍の完全消失を認め、後期治療群においても抗腫瘍効果の増強を認めた。

臨床試験に向かう前に腫瘍が十分、生着、増大した後期治療群におけるさらなる抗腫瘍効果を得るために SeV/DC 投与を行う3日前から、3日間 (7, 8, 9日目)、4 Gy/day の X 線を腫瘍局所的に前照射を行う実験を行った。図3に示すごとく、 γ 放射線単独治療、および ts-rSeV/dF-mIFN β -DCs 単独治療のみでも効果的に腫瘍体積を減少させることはできるものの、確立された腫瘍を完全排除することは困難であった。(腫瘍の完全排除は γ 放射線単独治療では6頭中0頭、ts-rSeV/dF-mIFN β -DCs 単独治療では8頭中2頭であった) 一方、この2つの治療を組み合わせた場合、8頭中6頭において腫瘍接種後38日目には、確立された腫瘍の完全排除が可能となった。結果としては、 γ 放射線と ts-rSeV/dF-mIFN β -DCs を組み合わせた治療においては8頭中5頭が無腫瘍状態で200日を超える生存を認めた¹⁹⁾。

いずれの実験においても、抗腫瘍効果を認めたマウスにおいて腫瘍特異的な CTL の誘導を認めた。また、腫瘍接種後186日目に、c1300 と Muss を同時に接種する再接種実験を行った。無治療、または臨床的に適切な放射線照射のみをした個体においては腫瘍接種後120日以内に全例が死亡した。ts-rSeV/dF-mIFN β -DCs を用いた樹状細胞治療のみを行った個体4頭のうち、1頭は120日以上、無腫瘍状態で生存したが、この個体には Muss や c1300 の再接種により、双方の腫瘍が生着した。放射線を過剰照射した個体4頭のうち、3頭は無腫瘍状態で120日以上生存したが、Muss, c1300 の再接種に対し、双方とも生着した。一方、 γ 放射線照射と樹状細胞治療との併用治療を行った個体では、4頭中3頭が無腫瘍状態で120日以上生存し、さらに4頭全てにおいてc1300の再接種を特異的に拒絶した。このことから本療法は、長期メモリーを成立させることが示唆された¹⁹⁾ (図4)。

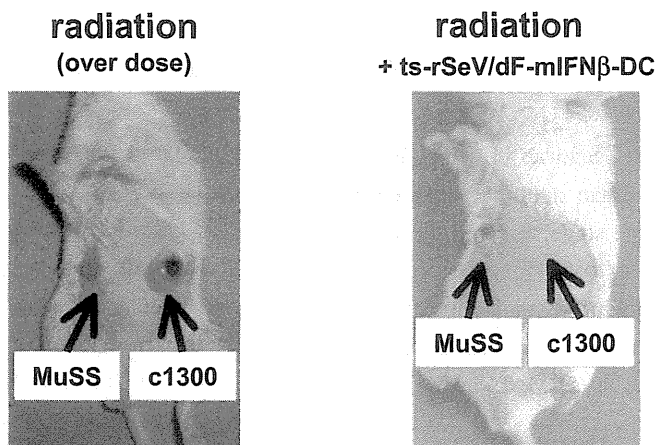


(文献19より一部改変抜粋)

図3 放射線前照射併用 ts-rSeV/dF-mIFN-DCs の抗腫瘍効果

さらに、大動物における安全性試験としてカニクイザルによる急性毒性試験においては、SeV/DCの毒性は低いものと判断され、活性化DCによると考えられる細網内皮系の活性化を示唆する所見を得た。

今後、臨床応用を考えた際にさらにSeVの安全性が問題となってくるが、SeVは細胞質内において、遺伝子発現、蛋白合成を行うため宿主染色体への影響はなく、またヒトへの病原性は報告されていないため安全性は高いと考えられ



腫瘍再接種実験

	Total examined	2nd challenge (c1300 and MuSS)			
		Alive (tumor free)	used for 2nd challenge	rejection of c1300	rejection of MuSS
untreat	4	0	-	-	-
radiation (4 Gy x 3)	3	0	-	-	-
radiation (over dose: 34 Gy x 3)	4	3	3	0	0
ts-rSeV/dF-mIFNβ-DC	4	1	1	0	0
radiation (4 Gy x 3) + ts-rSeV/dF- mIFNβ- DC	4	3	3	3	0

(文献19より一部改変抜粋)

図4 放射線前照射併用 ts-rSeV/dF-mIFN-DCs による永続的な腫瘍特異的防御免疫の誘導

る。現在、外科療法に併用した臨床試験のプロトコールを作成中であり、今後、IRB 審査の承認後に厚生労働審議会に提出し、承認後の早期の臨床応用を予定している。

おわりに

小児がんは、最近の集学的治療の進歩により、飛躍的に治療成績が向上したが、今後は、もっと、患者毎の20年後のQOLを重視した治療が期待され、腫瘍毎の予後関連遺伝子発現やゲノム異常の詳細な解析による悪性度診断がさらに必要になってくる。また、難治性や再発した小児がんに対しては、免疫治療などの新規治

療法の開発も必要である。今後も、このような小児悪性腫瘍に対するトランスレーショナルリサーチに積極的に取り組んでいくことが、小児がん全体のQOLを考慮した治療成績の向上につながる近道と考える。

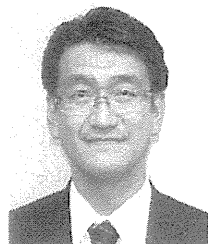
共同研究者

宗崎良太, 東 真弓, 田中 桜, 竜田恭介, 孝橋賢一, 木下義晶, 田中真司, 田口智章 (九州大学小児外科), 米満吉和 (九州大学薬学部)

文 献

- 1) Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; 224: 1121-1124.
- 2) Kaneko M, Nishihira H, Mugishima H. Stratification of treatment of stage 4 neuroblastoma patients based on N-myc amplification status. *Med Pediatr Oncol* 1998; 31: 1-7.
- 3) Raggi CC, Bagnoni ML, Tonini GP. Real-time quantitative PCR for the measurement of *MYCN* amplification in human neuroblastoma with the TaqMan detection system. *Clin Chem* 1999; 45: 1918-1924.
- 4) Tajiri T, Shono K, Fujii Y, Noguchi S, Kinoshita Y, Tsuneyoshi M, Suita S. Highly sensitive analysis for N-myc amplification in neuroblastoma based on fluorescence in situ hybridization. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 1615-1619.
- 5) Tajiri T, Tanaka S, Shono K, Kinoshita Y, Fujii Y, Suita S, Ihara K, Hara T. Quick quantitative analysis of gene dosages associated with prognosis in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001; 166: 89-94.
- 6) Tajiri T, Shono K, Tanaka S, Suita S. Evaluation of genetic heterogeneity in neuroblastoma. *Surgery* 2002; 131: 283-287.
- 7) Tanaka S, Tajiri T, Noguchi S, Shono K, Ihara K, Hara T, Suita S. Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of *MYCN* in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 63-68.
- 8) Souzaki R, Tajiri T, Higashi M, Kinoshita Y, Tanaka S, Kohashi K, Tsuneyoshi M, Taguchi T. Clinical implications of a slight increase in the gene dosage of *MYCN* in neuroblastoma determined using quantitative PCR. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 1095-1100.
- 9) Tajiri T, Liu X, Tanaka S, Suita S, Hogarty DM. Expression of a *MYCN*-interacting isoform of the tumor suppressor *BIN1* is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3345-3355.
- 10) Higashi M, Tajiri T, Kinoshita Y, Tatsuta K, Souzaki R, Maehara Y, Suita S, Taguchi T. High expressions of neuronatin isoforms in favorable neuroblastoma. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2007; 29: 551-556.
- 11) Tajiri T, Tanaka S, Higashi M, Kinoshita Y, Takahashi Y, Tatsuta K, Suita S. Biological diagnosis for neuroblastoma using a highly sensitive analysis of prognostic factors. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 560-566.
- 12) Tajiri T, Higashi M, Souzaki R, Tatsuta K, Kinoshita Y, Taguchi T. Classification of neuroblastomas based on an analysis of the expression of genes related to the prognosis. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 2046-2049.
- 13) 家原智子, 澤田 淳, 松村隆文. 神経芽腫マス・スクリーニング発見例における治療法の変遷と予後. *小児がん* 1997; 34: 228-232
- 14) Suita S. Stephen L. Gans overseas lecture. Mass screening for neuroblastoma in Japan: lessons learned and future directions. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 949-954.
- 15) Woods WG, Tuchman M, Robison LL, et al. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet* 1996; 348: 1682-1687.
- 16) 田尻達郎, 宗崎良太, 木下義晶. 生物学的予後因子解析からみたマススクリーニングの功罪. *小児外科* 2008; 40: 1047-1053.
- 17) Brodeur GM. Neuroblastoma. biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 203-16.
- 18) Tatsuta K, Tanaka S, Tajiri T, et al. Complete Elimination of Established Neuroblastoma by Synergistic Action of g-Irradiation and DCs Treated with rSeV expressing Interferon- β Gene. *Gene Ther* 2009; 16: 240-251.
- 19) 田尻達郎, 田中 桜, 竜田恭介, 宗崎良太, 木下義晶, 田口智章 センダイウイルス導入樹状細胞を用いた神経芽腫の免疫療法. *Pharma Media* 2011; No5; 57-65.

著者プロフィール



田尻 達郎 Tatsuro Tajiri

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科小児外科学 教授

略 歴：1988年 九州大学医学部卒業

1995年 同大学院医学研究科博士課程修了

1998年 九州大学大学院医学研究院助手

2001年 米国フィラデルフィアこども病院研究員

2003年 九州大学大学院医学研究院講師

2006年 九州大学大学院医学研究院助教授

2007年 九州大学大学院医学研究院准教授

2011年11月より現職

専門分野：1. 小児がんを中心とした小児外科患者さんに対する QOL を重視したテーラーメイド型外科治療
 2. 分子生物学的手法を用いた小児固形悪性腫瘍の発生、進展のメカニズムの解明、及び、新規治療法の開発

主な業績：1. Suita S, Tajiri T, Kaneko M, Hirai M, Mugishima H, Sugimoto T, Tsuchida Y. Implications of MYCN amplification in patients with stage 4 neuroblastoma who undergo intensive chemotherapy. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 489-493.
 2. Tajiri T, Higashi M, Souzaki R, Tatsuta K, Kinoshita Y, Taguchi T. Classification of neuroblastomas based on an analysis of the expression of genes related to the prognosis. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 2046-2049.
 3. Higashi M, Tajiri T, Kinoshita Y, Tatsuta K, Souzaki R, Maehara Y, Suita S, Taguchi T. High expressions of neuronatin isoforms in favorable neuroblastoma. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2007; 29: 551-556.
 4. Tajiri T, Ieiri S, Kinoshita Y, Masumoto K, Nishimoto Y, Taguchi T. Transumbilical approach for neonatal surgical diseases—woundless operation—. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 1123-1126.
 5. Souzaki R, Tajiri T, Higashi M, Kinoshita Y, Tanaka S, Kohashi K, Tsuneyoshi M, Taguchi T. Clinical implications of a slight increase in the gene dosage of *MYCN* in neuroblastoma determined using quantitative PCR. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 1095-1100.
 6. Hiyama E, Iehara T, Sugimoto T, Fukuzawa M, Hayashi Y, Sasaki F, Sugiyama M, Kondo S, Yoneda A, Yamaoka H, Tajiri T, Akazawa K, Ohtaki M. Effectiveness of screening for neuroblastoma at 6 months of age: a retrospective population-based cohort study. *Lancet* 2008; 371: 1173-80.
 7. Tatsuta K, Tanaka S, Tajiri T, Shibata S, Komaru A, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, Suita S, Sueishi K, Taguchi T, and Yonemitsu Y. Complete Elimination of Established Neuroblastoma by Synergistic Action of g-Irradiation and DCs Treated with rSeV expressing Interferon- β Gene. *Gene Ther* 2009; 16: 240-251.
 8. Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Matsuzaki A, Hara T, Taguchi T. Risks and benefits of ending of mass screening for neuroblastoma at 6 months of age in Japan. *J Pediatr Surg* 2009; 44: 2253-2257.
 9. Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Masumoto K, Ohira M, Nakagawara A, Taguchi T. Concordance for neuroblastoma in monozygotic twins: Case report and review of the literature. *J Pediatr Surg* 2011; 45: 2312-2316.
 10. Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Toshiro Hara, Tomoaki Taguchi. The implications of surgical intervention in the treatment of neuroblastomas: a 20-year single institution experience. *Surg Today* 2012; 42: 220-4.

Available at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.ejconline.com

Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12 months of age and older really excellent?

Tomoko Iehara^{a,*}, Eiso Hiyama^b, Tatsuro Tajiri^c, Akihiro Yoneda^d,
Minoru Hamazaki^e, Masahiro Fukuzawa^f, Hajime Hosoi^a, Tohru Sugimoto^a,
Tadashi Sawada^a

^a Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, Kawaramachi-Hirokoji Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

^b Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University, Hiroshima 734-8551, Japan

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

^d Department of Pediatric Surgery, Osaka Prefectural Hospital Organization, Osaka 594-0011, Japan

^e Department of Pathology, Shizuoka Children's Hospital, Shizuoka 420-8660, Japan

^f Department of Pediatric Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Available online 1 February 2012

KEYWORDS

Neuroblastoma
Stage 4s
Stage MS
Prognosis

Abstract Purpose: In the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system, stage 4s was changed into stage MS in children less than 18 months of age. Stage MS is defined as a metastatic disease with skin, liver and bone marrow, similar to INSS stage 4s. To evaluate the outcome of stage 4s cases in patients 12 months of age and over and to determine the appropriate treatment strategy.

Method: We performed a retrospective review of 3834 patients registered with the Japanese Society of Pediatric Oncology and Japanese Society of Pediatric Surgeons between 1980 and 1998.

Results: The rates of stage 4s patients were 10.7%, 6.3% and 3.3% in patients of ≤ 11 months of age, from ≥ 12 to ≤ 17 months of age, ≥ 18 months of age, respectively. The 5 year event-free survival rates were 89.4%, 100% and 53.1%, respectively. The rates of *MYCN* amplification and unfavourable histology were smaller in stage 4s groups than stage 4 groups in all ages.

Conclusion: In the children 12 months of age and older, stage 4s cases are markedly different from stage 4 cases in regard to the clinical features and prognosis. The prognosis of stage 4s cases from ≥ 12 to ≤ 17 months of age is excellent. The concept of stage MS appears to be appropriate.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author: Tel.: +81 75 251 5571; fax: +81 75 252 1399.
E-mail address: iehara@koto.kpu-m.ac.jp (T. Iehara).

1. Introduction

Neuroblastoma is the most common extra cranial solid tumour in childhood. The prognosis of the disease is largely dependent on the age of the child and the extension of the tumour at diagnosis. In general, the prognosis for neuroblastoma in infants is much more favourable than in older children. Stage 4s neuroblastoma, first described by Evans, is a special metastatic disease for patients <12-months-old associated with a favourable prognosis.^{1,2} Although these patients have wide metastatic disease, they have a favourable prognosis and also have high rates of a spontaneous regression. The stage 4s neuroblastoma is defined as an infant <12-months-old with metastases restricted to the liver, skin, and/or bone marrow, in which the primary tumour is localised (stage 1 or 2).

Recently, the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system was developed in order to establish a consensus approach for pre-treatment risk stratification. The new International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) was developed for the INRG.^{3,4} To classify neuroblastoma patients by INRG classification system, we used the criteria of INRG stage, age, histological category, grade of tumour differentiation, *MYCN* status, 11q aberrations and tumour cell ploidy. In this INRG system, stage 4s changes to stage MS in children <18 months old. Stage MS is defined as a metastatic disease with special features, similar to INSS stage 4s, although there is no restriction regarding the size of the primary tumour. The metastases are restricted to the skin, liver and bone marrow. Age is not a component of the definition of stage MS.^{3,4} Therefore, stage MS includes children aged from more than 12 months to less than 18 months of age. Conventionally, an age of ≥ 12 months has been the reference point for decisions for stage 4 neuroblastoma. Recently, an age cutoff of 18 months was proposed in a large-scale research study.⁵

The present study was undertaken to clarify how high the frequency of the stage 4s cases of ≥ 12 months and to clarify whether the prognosis is excellent or not for a decision-appropriate treatment strategy. This is the first report of stage 4s neuroblastoma in patients ≥ 12 months of age.

2. Patients and method

A retrospective review of 3834 patients with neuroblastoma was performed. The patients were registered with the Committee of Neuroblastoma in the Japanese Society of Pediatric Oncology and Japanese Society of Pediatric Surgeons between 1980 and 1998.

The patients were divided into three groups: ≤ 11 -months of age, ≥ 12 to ≤ 17 -months of age and ≥ 18 -months of age.

From these three groups, we extracted the cases suited for stage 4s. The cases of metastasis were limited to the

skin, liver or bone marrow. The primary tumours were observed within the tumour capsule (C_1) or outside the tumour capsule but not beyond the midline (C_2) and without contra lateral regional lymph node, in other words, the tumour of stage 3 was omitted. The maximum diameter of the primary tumours is less than 10 cm. In infancy, the stage 4s definition excluded bone marrow metastasis with more than 10% tumour cell infiltration. However, in this study, the ratio of the infiltration tumour cells is not considered in the stage 4s cases >12 months old. Thereafter, we examined the frequency of these extracted cases and compared the clinical feature and prognosis of stage 4 with those of 4s cases.

The stage 4s cases <12 months old were given either six cycles of the low-dose regimen, consisted of a low-dose of cyclophosphamide and vincristine over a 2-week period to shrink the tumour, followed by surgical resection. Stage 4 cases were treated with intensive chemotherapy consisting of cyclophosphamide and pirarubicin, cisplatin, vincristine or etoposide. Infants less than 12-months old were treated with reduced dosages. After 1992, many cases, especially cases with *MYCN* amplification, received high-dose chemotherapy with stem cell transplantation.

Amplification of the *MYCN* had been studied in children with those tumours since 1990 in JAPAN.

The histology of the primary tumour was mandatory to allow diagnosis of the neuroblastoma according to the International Neuroblastoma Pathology Classification, with the central review system by the Committee of Japanese Pediatric Tumor Pathology since 1994.

2.1. Statistical analysis

The Kaplan and Meier product limit methods were used to estimate the event-free survival (EFS) and the over-all survival (OS). The EFS calculated from diagnosis to the first event; relapse, progression or death (exception of other reason death). OS is calculated from diagnosis to death, excluded other reason death. Because the number of the events of each group was very small, we omitted the other reason death not to make bias. The Cox proportional hazards model was used to estimate the hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CI). The exact test from the permutation of the log-rank statistic was used to compare the EFS or OS probabilities between subgroups of patients. Differences between the two groups in categorical data were analysed by means of Fisher's exact probability test or the chi-square test. Two-sided *P*-values under 0.05 were considered as significant.

3. Results

The rates of stage 4s patients were 10.7%, 6.3% and 3.3% in patients ≤ 11 -months of age, 12–17 months of age, and ≥ 18 months of age, respectively.

Stage 4s patients frequently present even at 12 months of age and older, although their frequency decreases with age. Since 1985, the high numbers of patients under 11 months of age is the reason why cases detected by screening are included. However, there is no difference in the frequency of patients detected by screening between stage 4 and 4s groups (Table 1).

The rates of *MYCN* amplified stage 4s patients were 3.7%, 0% and 0% in those ≥ 11 months of age, 12–17-months of age and ≥ 18 months of age, respectively. The rates of *MYCN* amplified patients were smaller in the stage 4s groups than in the stage 4 groups in each group ($P < 0.001$, $P = 0.04$ and $P < 0.001$, respectively). Similarly, the rates of patients with unfavourable histology were smaller in the stage 4s groups than in the stage 4 groups. However, the difference in the frequency of patients with unfavourable histology between the two stage groups was not significant in those 12–17-months of age, because of the small number of patients.

The stage 4s patients displayed a lower mean serum LDH value than the stage 4 patients in each group (Table 1).

In stage 4s patients ≤ 11 -months old, observation and surgery alone were 6.2% and 6.9%, respectively. Infants less than 12-months old were treated with a different protocol between stage 4s and 4 group. Those stage 4s patients received less dose chemotherapy than stage 4. Patients > 12 -months of age with stage 4s and 4 tumour received the same induction chemotherapy and most of them received surgical resection. The other hand, the number of patients who received high-dose chemotherapy with stem cell transplantation were smaller in the stage 4s groups than in the stage 4 groups in each age category ($P = 0.002$ and $P = 0.017$, respectively), for patients ≤ 11 months of age and 12–17-months of age. All patients ≤ 11 -months of age who received high dose chemotherapy have tumours with *MYCN* amplification. There are no patients who received surgical resection only or

Table 1
Characteristics of patients with INSS stage 4 or stage 4s neuroblastoma.

		≤ 11 m			12–17 m			≥ 18 m			
		No.	%	<i>P</i>	No.	%	<i>P</i>	No.	%	<i>P</i>	
Patients	Total	2579			252			1003			
	Stage 4s	275	10.7		16	6.3		33	3.3		
	Stage 4	294	11.4		73	29.0		523	52.1		
Screening	Stage 4s	174	63.2								
	Stage 4	154	52.4	0.173							
MNA/no-MNA	Stage 4s	8/206	3.7		0/9	0		0/32	0		
	Stage 4	30/156	16.1	< 0.001	18/36	25	0.04	68/186	26.8	< 0.001	
UFH/FH	Stage 4s	4/95	5.3		0/5	0		4/23	14.8		
	Stage 4	11/78	12.4	0.014	8/16	33.3	0.129	78/97	44.6	0.003	
LDH(U/L) (mean level)	Stage 4s	672.4			441.4			675.5			
	Stage 4	1483.8		< 0.001	4755.6		< 0.001	2316.4		0.019	
Therapy											
Observation	Stage 4s	17	6.2		0	0		0	0		
		Surgery alone	19	6.9		1	6.2		0	0	
		Chemo+surgery	239	86.9		15	93.8		33	100	
		Radiation	13	4.7		4	25		13	39.3	
		HDT with SCT	4	1.5		0	0		5	15.2	
	Stage 4	Observation	0	0		0	0		0	0	
		Surgery alone	8	2.7		0	0		0	0	
		Chemo+surgery	286	97.3	0.002	73	100	0.017	512	97.9	0.130
		Radiation	90	30.6		23	31.5		162	31	
		HDT with SCT	19	6.4		20	27.4		142	27.2	
Outcome											
Alive	Stage 4s	258	93.8		15	93.8		17	51.5		
		Dead of disease	9	3.3		0	0		12	36.4	
		Therapeutic death	5	1.8		0	0		2	6.1	
		Other reason death	1	0.4		0	0		0	0	
		Unknown	2	0.7		1	6.2		2	6.1	
	Stage 4	Alive	215	73.1		19	26		112	21.4	
		Dead of disease	39	13.3		44	60.3		351	67.1	
		Therapeutic death	15	5.1		9	12.3		39	7.5	
		Other reason death	3	1		0	0		6	1.1	
		Unknown	22	7.5		1	1.4		15	2.9	

Abbreviations: MNA, *MYCN* amplification; UFH, unfavorable histology; FH, favorable histology; HDT, high dose therapy; SCT, stem cell transplantation.