

4. Thomas D, Pritchard J, Davidson R, *et al.* Familial hepatoblastoma and APC gene mutations: renewed call for molecular research. *Eur J Cancer* 2003; 39:2200–2204.
 5. Buckley JD, Sather H, Ruccione K, *et al.* A case-control study of risk factors for hepatoblastoma. A report from the Children's Cancer Study Group. *Cancer* 1989; 64:1169–1176.
 6. <http://seer.cancer.gov>. Surveillance epidemiology and end results website. 2009.
 7. Spector LG, Birch J. The epidemiology of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59:776–779.
- A comprehensive review of hepatoblastoma epidemiology.
8. Finegold MJ, Lopez-Terrada DH, Bowen J, *et al.* Protocol for the examination of specimens from pediatric patients with hepatoblastoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131:520–529.
 9. Meyers RL, Rowland JH, Krailo M, *et al.* Pretreatment prognostic factors in hepatoblastoma: a report of the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53:1016–1022.
 10. Weinberg AG, Finegold MJ. Primary hepatic tumors of childhood. *Hum Pathol* 1983; 14:512–537.
 11. Malogolowkin MH, Katzenstein HM, Meyers RL, *et al.* Complete surgical resection is curative for children with hepatoblastoma with pure fetal histology: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2011; 29:3301–3306.
 12. Perilongo G, Malogolowkin MH, Feusner J. Hepatoblastoma clinical research: lessons learned and future challenges. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59:818–821.
- A comprehensive review of hepatoblastoma chemotherapy.
13. López-Terrada D, Alaggio R, De Dávila MT, *et al.* Towards an International Pediatric Liver Tumor Consensus Classification: Proceedings of the Los Angeles COG International Pathology Pediatric Liver Tumors Symposium. *Mod Pathol* 2013. [Epub ahead of print].
- New hepatoblastoma pathology consensus classification.
14. Kasai M, Watanabe I. Histologic classification of liver-cell carcinoma in infancy and childhood and its clinical evaluation. A study of 70 cases collected in Japan. *Cancer* 1970; 25:551–563.
 15. Haas JE, Feusner J, Finegold MJ. Small cell undifferentiated histology in hepatoblastoma may be unfavorable. *Cancer* 2001; 92:3130–3134.
 16. Trobaugh-Lotrario AD, Tomlinson GE, Finegold MJ, *et al.* Small cell undifferentiated variant of hepatoblastoma: adverse clinical and molecular features similar to rhabdoid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52:328–334.
 17. Stocker JT. Hepatoblastoma. *Semin Diagn Pathol* 1994; 11:136–143.
 18. Takayasu H, Horie H, Hiyama E, *et al.* Frequent deletions and mutations of the beta-catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:901–908.
 19. Anna CH, Sils RC, Foley JF, *et al.* Beta-catenin mutations and protein accumulation in all hepatoblastomas examined from B6C3F1 mice treated with anthraquinone or oxazepam. *Cancer Res* 2000; 60:2864–2868.
 20. Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, *et al.* High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 2004; 91:972–979.
 21. Cairo S, Armengol C, De Reynie A, *et al.* Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 14:471–484.
 22. Hiyama E, Hiyama K, Shay JW, Yokoyama T. Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia* 2001; 3:17–26.
 23. Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 2002; 21:643–649.
 24. Park JI, Venteicher AS, Hong JY, *et al.* Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 2009; 460:66–72.
 25. Ueda Y, Hiyama E, Kamimatsuse A, *et al.* Wnt signaling and telomerase activation of hepatoblastoma: correlation with chemosensitivity and surgical resectability. *J Pediatr Surg* 2011; 46:2221–2227.
 26. Armengol C, Cairo S, Fabre M, Buendia MA. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: the hepatoblastoma model. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43:265–270.
 27. Fuchs J, Ryzdyski J, von Schweinitz D, *et al.* Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB94. *Cancer* 2002; 95:172–182.
 28. Aronson DC, Schnater JM, Staalman CR, *et al.* Predictive value of the pretreatment extent of disease system in hepatoblastoma: results from the international society of pediatric oncology liver tumor study group SIOPEL-1 study. *J Clin Oncol* 2005; 23:1245–1252.
 29. Maibach R, Roebuck D, Brugieres L, *et al.* Prognostic stratification for children with hepatoblastoma: the SIOPEL experience. *Eur J Cancer* 2012; 48:1543–1549.
- A comprehensive risk factor analysis in the SIOPEL database.
30. Meyers RL, Haeberle B, Hiyama E, *et al.* Children's Hepatic Tumor International Collaboration (CHIC): new hepatoblastoma international risk groups. *Hong Kong: Abstract SIOP*; 2013.
 31. Czauderna P, Haeberle B, Hiyama E, *et al.* Children's Hepatic tumors International Collaboration (CHIC) as a model of international global cooperation and clinical research in pediatric rare tumors. *Abstract SIOP: London*; 2012.
 32. Malogolowkin MH, Katzenstein HM, Krailo M, *et al.* Intensified platinum therapy is an ineffective strategy for improving outcome in pediatric patients with advanced hepatoblastoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:2879–2884.
 33. Haeberle B, von Schweinitz D. Treatment of hepatoblastoma in German cooperative pediatric liver tumor studies. *Front Biosci* 2012; 1:493–498.
 34. Perilongo G, Shafford E, Maibach R, *et al.* Risk adapted treatment for childhood hepatoblastoma: final report of the second study of the internal society of pediatric oncology, SIOPEL 2. *Eur J Cancer* 2004; 40:411–421.
 35. Perilongo G, Maibach R, Shafford E, *et al.* Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard risk hepatoblastoma. *N Engl J Med* 2009; 361:1662–1670.
 36. Zsiros J, Maibach R, Shafford E, *et al.* Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study. *J Clin Oncol* 2010; 28:2584–2590.
 37. Sasaki F, Matsunaga T, Iwafuchi M, *et al.* Outcome of hepatoblastoma treatment with JPLT-1 Protocol-1: a report from the Japanese study group for pediatric liver tumor. *J Pediatr Surg* 2002; 37:851–856.
 38. Hishiki T, Matsunaga T, Sasaki F, Yano M, *et al.* Outcome of hepatoblastoma treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT. *Pediatr Surg Int* 2011; 27:1–8.
 39. Ortega JA, Douglass EC, Feusner JH, *et al.* Randomized comparison of cisplatin/vincristin/5-fluorouracil and cisplatin/doxorubicin for the treatment of pediatric hepatoblastoma (HB): A report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. *J Clin Oncol* 2000; 18:2665–2675.
 40. Meyers RL, Czauderna P, Otte JB. Surgical treatment of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59:800–808.
 41. Zsiros J, Brugieres L, Brock P, *et al.* Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high risk hepatoblastoma (SIOPEL 4): a prospective, single-arm, feasibility study. *Lancet Oncol* 2013; 14:834–842.
- A recent study with best ever result achieved in metastatic hepatoblastoma.
42. Pritchard J, Brown J, Shafford E, *et al.* Cisplatin, doxorubicin, and delayed surgery for childhood hepatoblastoma: a successful approach – results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol* 2000; 18:3819–3828.
 43. Qayed M, Katzenstein HM. Dose-intensive cisplatin for hepatoblastoma: have you heard? *Lancet Oncol* 2013; 14:791–792.
 44. Troubaugh-Lotrario AD, Katzenstein HM. Chemotherapeutic approaches for newly diagnosed hepatoblastoma: past, present, and future strategies. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59:809–812.
- A comprehensive review of COG studies.
45. Semeraro M, Branchereau S, Maibach R, *et al.* Relapses in hepatoblastoma patients: clinical characteristics and outcome – experience of the International Childhood Liver Tumour Strategy Group (SIOPEL). *Eur J Cancer* 2013; 49:915–922.
 46. Malogolowkin MH, Katzenstein HM, Krailo M, *et al.* Redefining the role of doxorubicin for the treatment of children with hepatoblastoma. *J Clin Oncol* 2008; 26:2379–2383.
 47. Katzenstein HM, London WB, Douglass EC, *et al.* Treatment of unresectable and metastatic hepatoblastoma: a Pediatric Oncology Group phase II study. *J Clin Oncol* 2002; 20:3438–3444.
 48. Qayed M, Powell C, Morgan ER, *et al.* Irinotecan as maintenance therapy in high-risk hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54:761–763.
 49. Zsiros J, Brugieres L, Brock P, *et al.* Efficacy of irinotecan single drug treatment in children with refractory or recurrent hepatoblastoma – a phase II trial of the childhood liver tumour strategy group (SIOPEL). *Eur J Cancer* 2012; 48:3456–3464.
 50. Yoshinari M, Imaizumi M, Hayashi Y, *et al.* Peripheral blood stem cell transplantation for hepatoblastoma with microscopic residue: a therapeutic approach for incompletely resected tumor. *Tohoku J Exp Med* 1998; 184:247–254.
 51. Perilongo G, Otte JB. Autologous peripheral blood stem-cell transplantation with a double-conditioning regimen for recurrent hepatoblastoma after liver transplantation: a valid therapeutic option or just too much? *Pediatr Transplant* 2009; 13:148–149.
 52. Niwa A, Umeda K, Awaya T, *et al.* Successful autologous peripheral blood stem cell transplantation with a double-conditioning regimen for recurrent hepatoblastoma after liver transplantation. *Pediatr Transplant* 2009; 13:259–262.
 53. Malogolowkin MH, Stanley P, Steele DA, *et al.* Feasibility and toxicity of chemoembolization for children with liver tumors. *J Clin Oncol* 2000; 18:1279–1284.
 54. Czauderna P, Zbrzeniak G, Narozanski W, *et al.* Preliminary experience with arterial chemoembolization for hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma in children. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46:825–828.
 55. Meyers RL, Katzenstein HM, Krailo M, *et al.* Surgical resection of pulmonary metastatic lesions in hepatoblastoma. *J Pediatr Surg* 2007; 42:2050–2056.
 56. Ijichi O, Ishikawa S, Shinkoda Y, *et al.* Response of heavily treated and relapsed hepatoblastoma in the transplanted liver to single-agent therapy with irinotecan. *Pediatr Transplant* 2006; 10:635–638.

57. Beaty O III, Berg S, Blaney S, *et al.* A phase II trial and pharmacokinetic study of oxaliplatin in children with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55:440–445.
58. Gray SG, Eriksson T, Ekström C, *et al.* Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. *Br J Cancer* 2000; 82:1561–1567.
59. Tomizawa M, Saisho H. Signaling pathway of insulin-like growth factor-II as a target of molecular therapy for hepatoblastoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12:6531–6535.
60. Hartmann W, Kuchler J, Koch A, *et al.* Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival. *Clin Cancer Res* 2009; 15:4538–4545.
61. Bjornsti M-A, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:335–348.
62. McCrudden KW, Hopkins B, Frischer J, *et al.* Anti-VEGF antibody in experimental hepatoblastoma: suppression of tumor growth and altered angiogenesis. *J Pediatr Surg* 2003; 38:308–314; discussion 308–314.
63. Warmann SW, Fuchs J, Bitzer M, *et al.* Emerging gene-directed antitumor strategies against human hepatoblastoma. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9:1155–1161.
64. Lieber J, Kirchner B, Eicher C, *et al.* Inhibition of Bcl-2 and Bcl-X enhances chemotherapy sensitivity in hepatoblastoma cells. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55:1089–1095.
65. Jacobs JFM, Coulie PG, Figdor CG, *et al.* Targets for active immunotherapy against pediatric solid tumors. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:831–841.

日本臨牀 73 卷 増刊号 1 (2015 年 1 月 20 日発行) 別刷

最新肝癌学

—基礎と臨床の最新研究動向—

XV 特 論

肝芽腫の診断と治療

上條岳彦 檜山英三

肝芽腫の診断と治療

Diagnosis and treatments of hepatoblastoma

上條 岳彦¹ 檜山 英三²**Key words** : 肝芽腫, 小児悪性肝腫瘍, JPLT

はじめに

我が国では小児悪性肝腫瘍の治療成績向上のために、グループスタディの開始による治療研究の必要性が検討され、1989年からスタディグループ設立が有志の治療医によって行われ、発起人会の設立、スタディグループ発足の準備が進められた。Société Internationale d'Onco-logie Pédiatrique-Epithelial Liver Tumor Study Group(SIOPEL)から日本へ治療研究への参加要請があり検討の結果、日本独自のプロトコル施行と決定され、1991年に日本小児肝腫瘍スタディグループ(Japanese study group for Pediatric Liver Tumor: JPLT)が結成された。治療の詳細は後に記述するが、JPLT-1治療研究が1991-99年まで施行され、次にJPLT-2治療研究が1999-2012年まで施行された。現在は2012年からJPLT-3治療研究に移行し、継続して小児肝悪性腫瘍の治療成績向上が図られている。

1 肝芽腫の疫学

小児の悪性肝腫瘍は、白血病リンパ腫を含めた小児悪性腫瘍全体の約1%といわれている。これは日本における小児悪性固形腫瘍の3-4%に相当する。その大部分は肝芽腫と成人型

肝癌である肝細胞癌である。小児の肝腫瘍にはこのほかにも肝未分化胎児性肉腫のような比較的まれな悪性腫瘍や、血管腫、巣状結節性過形成のような良性腫瘍がある。小児の悪性肝腫瘍は、小児肝腫瘍のおよそ6割を占める。

小児肝細胞癌は小児の悪性肝腫瘍の10-30%を占めるとされている。チロシン血症、胆道閉鎖症、新生児肝炎、 α 1-アンチトリプシン欠損症、栄養性およびウイルス性肝硬変などの慢性的な病気からの肝細胞癌が報告されている。

肝芽腫は最も多い小児の悪性肝腫瘍であり、その年間発症数は40-50例と考えられている。肝芽腫の危険因子としては、我が国から低出生体重児と肝芽腫発症の相関が報告されている。出生体重2,500グラム以上の正常体重児と比較して、<1,000, 1,000-1,499, 1,500-1,999, and 2,000-2,499の児の相対危険度(relative risk)はそれぞれ15.64($p < 0.001$), 2.53($p = 0.129$), 2.71($p = 0.001$), and 1.21($p = 0.381$)となっていた¹⁾。

ほかの肝芽腫の危険因子として、幾つかの先天症候群や疾患が知られている。Beckwith-Wiedemann症候群、家族性大腸腺腫症、糖原病(I~IV型)、18トリソミーなどである。Beckwith-Wiedemann症候群は巨舌、腹壁欠損(臍帯ヘルニア、腹直筋解離、臍ヘルニア)、過成長を三主徴とする先天奇形症候群である。約15

¹Takehiko Kamijo, ²Eiso Hiyama: ¹Research Institute for Clinical Oncology, Saitama Cancer Center 埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所 ²Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University 広島大学 自然科学研究支援開発センター; Hiroshima University Hospital, Pediatric Surgery Department 広島大学病院 小児外科

％の症例で肝芽腫、横紋筋肉腫、Wilms腫瘍など胎児性腫瘍が発生する。本症候群の原因遺伝子座は11番染色体短腕15.5領域(11p15.5)で、この領域には多くの刷り込み遺伝子がクラスターを形成して存在する。本症候群は、11p15.5の刷り込み異常によって生じる。11p15.5には、2つの刷り込みドメイン、KIP2/LIT1ドメインとIGF2/H19ドメインがあり、それぞれ刷り込み調節領域により周辺の刷り込み遺伝子の発現が制御されている。本症候群の10％はIGF2/H19ドメインのH19DMR高メチル化によるIGF2の発現上昇によって発症する(難病情報センターサイト改変)。さらに11p15.5部位のLOHが3/13の肝芽腫症例でみられ、また同部位のインプリンティングが5例の肝芽腫で報告されている³⁾。以上から、IGF2増加はBeckwith-Wiedemann症候群と肝芽腫発症に関連があると想定されている。

家族性大腸腺腫症と肝芽腫の間には関連がみられることが知られている³⁾。家族性大腸腺腫症の家族歴をもつ場合、肝芽腫の発生リスクが800倍上昇することが知られている。肝芽腫に関連するadenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子変異は、典型的な家族性大腸腺腫症関連遺伝子変異と多少異なり、1309番塩基近傍のAPC遺伝子N末端側に多く位置するといわれている。肝芽腫症例でAPC遺伝子生殖細胞変異が認められない場合、肝芽腫のAPC遺伝子体細胞変異はみられないが、APC下流分子として知られるβカテニン遺伝子に変異が認められる傾向があることが知られている。これは孤発性肝芽腫の48％に及ぶものであり、βカテニン遺伝子のエクソン3に変異が認められ、βカテニン分子の分解を阻害する変異であった。

2 上記以外の肝芽腫のゲノム・エピゲノム異常

我が国において56例の肝芽腫症例に対してSNIPアレイを用いた解析を行い、アレル不均衡が37例(66％)で見いだされた。染色体のゲインが1q(28サンプル)、2q(24)、6p(8)、8q(8)、

17q(6)、および20pq(10)で、染色体のロスが1p(6サンプル)、4q(9)および16q(4)で認められた。特に1q32.1においては癌遺伝子MDM4の増幅がみられた腫瘍が存在した⁴⁾。

また我が国のJPLT-2プロトコル症例74例の解析結果、25例(33.8％)に癌抑制遺伝子RASSF1Aプロモーター部位のゲノムメチル化が見いだされ、転移および不良な予後との相関が示された⁵⁾。

3 肝芽腫の臨床像

肝芽腫の症状としては、孤発例では腹部膨満、腹部腫瘤触知などが多く、早期の発見は難しい。基礎疾患が先行する場合には、肝芽腫発症リスクを考慮してのフォローアップの経過で発見される(Beckwith-Wiedemann症候群など)。発見時にかなり進行している例もみられるため、発育遅延、体重増加停止などの全身症状が認められることもある。また転移した部位における病変形成によって症状が認められる(肺転移、下大静脈・門脈転移など)。

4 肝芽腫の検査

1) 生化学的検査

肝芽腫ではほとんどα-フェトプロテイン(AFP)は陽性であり、かつ極めて高値を示すことが多い。AFPは胎児期肝細胞などにより産生されるタンパクであり、出生後に産生されなくなるが、満期産児では10,000–100,000 ng/mLと高値である。半減期は4–9日であり、生後6カ月で50 ng/mL、生後1年で20 ng/mL以下と成人レベルに低下する。診断時のAFP値は年齢で調整した正常範囲と比較されるべきである。診断時のAFPレベルと臨床予後の関連については、100 ng/mLのものは未分化小細胞型が多く予後不良との報告があるが、我が国では極めてまれである。一方で、血清AFPレベルは治療反応性の優れた指標として用いられている。ドイツ小児癌治療グループのHB-89プロトコルでは、化学療法時の血清AFPの減少が予後と

明らかに相関していた($p=0.003$)⁶⁾。

Children's Cancer Group (CCG) protocol 823Fの結果から、化学療法などの治療を行っても血清AFPレベルが低下しない場合には、治療に対する反応性の低下が想定される。他の検査値ではLDHの高値、また乳児性肝絨毛癌では β -hCG腫瘍マーカーの高値が認められる。

2) 治療前に施行されるべき検査

肝芽腫治療では後述する化学療法が施行されるが、小児に化学療法を行う場合、晩期合併症として幾つかの頻度の高い合併症が知られており、程度・経過を把握するために治療前の評価が望ましい。

聴力検査(オーディオメーターでの測定): シスプラチン・カルボプラチンなどの抗癌剤の副作用として聴力の低下が報告されているため、治療前の聴力を検査する。治療中は定期的に聴力を測り、聴力低下の有無を確認する。

心機能検査(心エコー・心電図): THP-アドリアマイシンの副作用として急性・慢性の心筋障害が出現することがあるため、治療前の心機能を評価する。

腎機能検査(尿検査): シスプラチンの副作用で腎機能障害が発生することがあるために事前に評価する(尿量, BUN, Cre, 24hCCr, 尿中低分子量タンパクの β 2-MG, 腎尿細管酵素NAG, 血清電解質など)。

3) 画像検査

肝芽腫の術前画像診断としては、腹部エコー、CT scan, MRIなどによる評価が必要になり、これらを基にPRETEXT分類が検討される。

JPLTプロトコルでは、診断クオリティの担保と治療効果判定のため、診断時、化学療法の経過中に中央判定を施行している。画像はJPLTの診療検討委員会および肝切除・肝移植検討委員会にて検討され、コメントが返送される。

4) 病理学的検査

組織学的には、低分化から未熟型の上皮成分からなる上皮型と、上皮成分と紡錘型異型細胞や軟骨組織などの間葉成分からなる混合型の2つに大別される。鑑別診断にはサイトケラチンやvimentin, S-100タンパクなどの免疫染色が

有用とされる。

上皮型はさらに胎児型(fetal type)、胎芽型(embryonal type)、大索状型(macrotubercular type)、未分化小細胞型(small cell undifferentiated type)に細分される。組織系と予後の関連については、上皮型と混合型の間の予後には有意な差がないとされている。また腫瘍が完全に摘出された場合に純胎児型(pure fetal type)は予後良好であるが、一方で、未分化小細胞型の患者がより不良な予後を示した報告がなされている。現在のJPLT登録症例の病理組織分類は、国際小児肝がん組織分類に基づいて行う。小児腫瘍専門病理医はその人数も限られており、専門病理医によるセントラル・レビューを行う必要がある。'小児固形腫瘍観察研究(事務局 国立成育医療研究センター 病理診断部)'に登録している施設のJPLT症例は、中央病理診断が施行されている。

5 肝芽腫の臨床病期分類

肝芽腫の臨床病期分類は、切除性を重視した術後病期分類と治療前の進展度による術前病期分類が用いられている(小児肝がん 臨床ガイドライン)。Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP)では治療前の進展度によるPretreatment Extent of Disease System (PRETEXT)分類が使用されている⁷⁾。日本では当初日本小児外科学会の病期分類が用いられていたが、JPLT-2プロトコル以降はPRETEXT分類が採用されている。これは肝臓全体を4つに分けた区域(4区域)のそれぞれにおける腫瘍の拡がりの有無(MRIやCTなどの画像検査法によって判定される)を基準とした病期分類である(図1)。

JPLTではJPLT-2プロトコルに対して1999年から2008年12月までに279例の小児悪性肝腫瘍が登録され、このうち212例が肝芽腫と診断された。この212例の病期と治療成績は、PRETEXT分類I(16例)、II(64例)、III(83例)、IV(49例)の5年生存率はそれぞれ93.8%、84.4%、86.1%、63.2%であった⁸⁾。

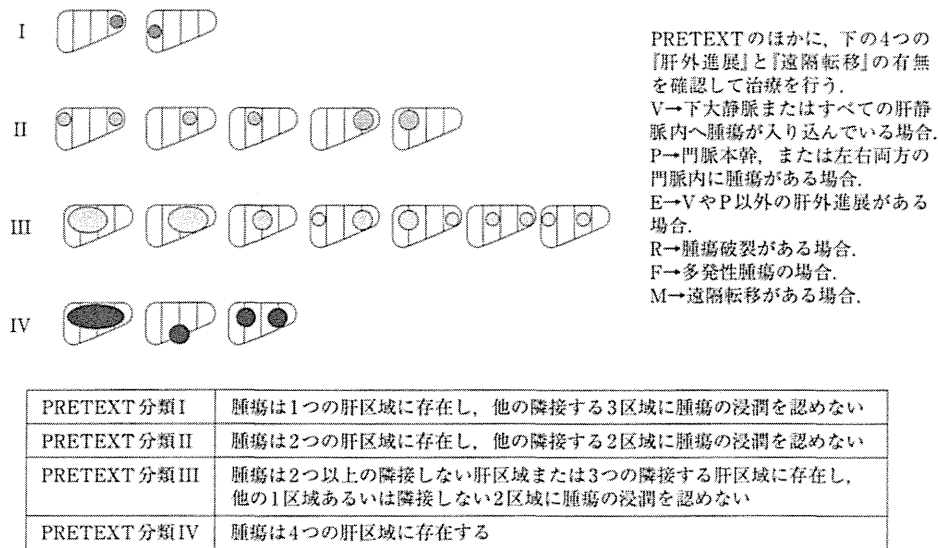


図1 PRETEXT分類法(図示)

6 海外での臨床試験の実態

1980年代までは、肝芽腫の治療は外科療法が主体であり、その生存率は全体で20-30%と良好な成績ではなかった。1970年代のシスプラチン(CDDP)の開発に伴い、1980年代後半からCDDPとドキシソルビシン(DOX)を中心とした化学療法が用いられ、治療成績が向上した。

SIOPELが初めて行った小児肝悪性腫瘍の国際的臨床試験がSIOPEL-1である。SIOPEL-1は1990-94年に194症例(肝芽腫154例、肝細胞癌40例)に対して施行され、CDDP/DOX療法による術前化学療法の有効性を検証した⁹⁾。これは術前にCDDP(80 mg/m², 24時間持続静注)とDOX(30 mg/m², 24時間持続静注, day2とday3, total 60 mg/m²)を4クール行い、術後に2クール追加するプロトコルであった。5年無イベント生存期間(EFS)と全生存期間(OS)はそれぞれ66%と75%であり、従来の治療から顕著な改善がみられた。このSIOPEL-1プロトコルによってCDDP/DOX療法による術前化学療法の有効性が示され、また治療前に腫瘍が占める肝臓の区域による分類(PRETEXT)と肺転移の有無が生存期間と無病生存期間に相関していることが示された⁷⁾。

これらを基にSIOPEL-2プロトコルとして、CDDP単独療法(80 mg/m², 24時間持続静注, 4クールを2週間ごとに行い、術後に2クール追加)を標準リスク群77例、高リスク群58例に対して1995-98年に施行した。標準リスク群では3年EFSとOSはそれぞれ89%と91%であり、良好な成績が得られた。高リスク群では3年EFSとOSはそれぞれ48%と53%であった¹⁰⁾。

1998年から2006年に行われたSIOPEL-3ではCDDP単独療法のCDDP/DOX療法に対するランダム化非劣性試験が行われ、CDDP単独療法126例とCDDP/DOX療法129例が解析され、CDDP単独療法の3年EFSとOSはそれぞれ83%と95%、CDDP/DOX療法の3年EFSとOSはそれぞれ85%と93%でCDDP単独療法の非劣性が示された¹¹⁾。

その後高リスク肝芽腫に対するSIOPEL-4プロトコルが2005年からスタートし、術前のCDDP/DOX療法を3コース後に術前にcarboplatin/DOX療法を1コース行い手術の1アームと、術前のCDDP/DOX療法を3コース後に手術、術後にcarboplatin/DOX療法を1コース行う1アームのどちらかを行う治療が2009年まで行われた。

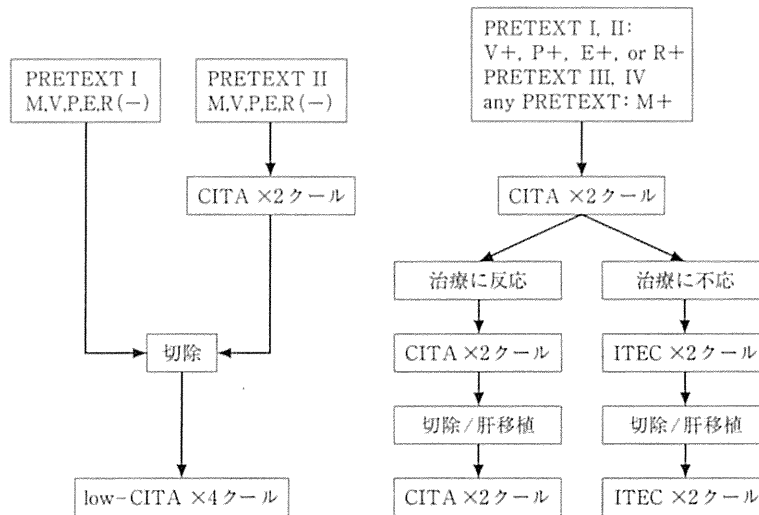


図2 JPLT-2プロトコルの概略図

米国でもヨーロッパと同様に肝芽腫に対する Children's Cancer Groupが施行したCDDP/DOX療法¹²⁾、Pediatric Oncology Groupが施行したCDDP/VCR/5-FU療法¹³⁾などによって化学療法の有効性が証明されてきた。その後米国ではCCG、POGなどの統合によるChildren's Oncology Groupがスタートし、現在COG-AHEP0731(Combination Chemotherapy in Treating Children With Newly Diagnosed Hepatoblastoma)が施行されている。

7 国内の臨床試験の歴史

まずJPLT-1プロトコルが1991-99年まで行われた。これはCDDPと我が国開発のピラルピシン(THP-ADR)を併用したCITA療法を行うものである。病期IとII症例にはCDDP 40mg/m²とTHP-ADR 30mg/m²を投与し、病期III A、IIIBとIV症例にはCDDP 80mg/m²とTHP-ADR 30mg/m²×2 daysを投与するものであり、それぞれ手術前後に計6コース行われた。登録154例の小児悪性肝腫瘍中、145例が肝芽腫であり、全生存率は(3-year/6-year)、病期I(n=9)が100%/100%、病期II(n=32)が100%/95.7%、病期III A(n=48)が76.6%/73.8%、病期IIIB(n=25)が50.3%/50.3%、病期IV

(n=20)が64.8%/38.9%であり、全体では77.8%/73.4%であった。これは当時のヨーロッパのSIOPEL-1プロトコル、および米国のINT-098プロトコルとほぼ同等の成績であった¹⁴⁾。

JPLT-1プロトコルでは、肝臓の4区域を占める病期IIIB症例の完全切除率は55%と高くなく、手術不能例における無病生存例はいなかった。一方、病期I、IIの症例では欧米より抗癌剤使用量が少ないにもかかわらず、OSは90%以上と良好であった。

よって、次期のJPLT-2プロトコルでは、早期例の治療軽減による副作用の減少と、進行例の術前化学療法強化による治療成績の向上が図られた。

JPLT-2プロトコルにおいては、化学療法として、①low-CITA療法(CDDP 40mg/m²とTHP-ADR 30mg/m²)、②CITA療法(CDDP 80mg/m²とTHP-ADR 30mg/m²×2 days)、③ITEC療法(イフォマイド:IFO、カルボプラチン: CBDCA、エトポシド: VP-16、THP-ADR)を図2に示すように各症例に対して施行した。また一部の症例に対しては、CATA-L療法(THP-ADR 30mg/m²とCBDCA 200mg/m²による肝動脈化学塞栓療法)を施行した。

悪性小児肝腫瘍389例、うち肝芽腫331例が

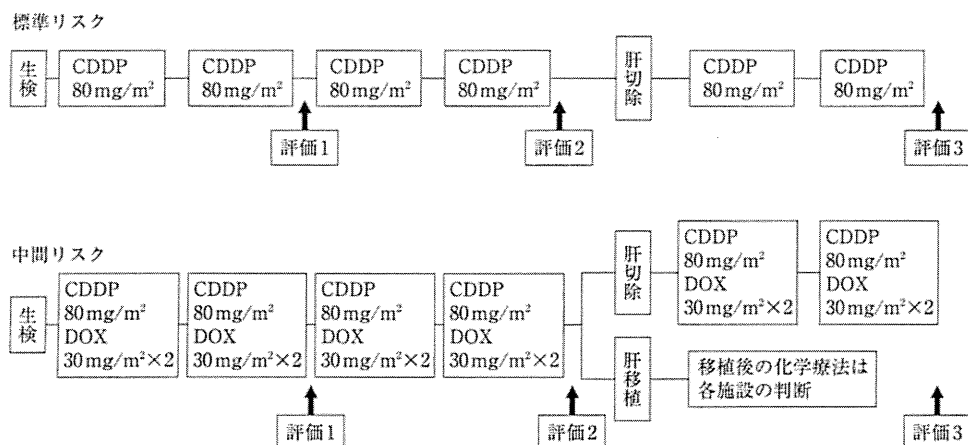


図3 JPLT-3プロトコール概略

評価は血清AFP値および画像評価(US, CT, 必要に応じMRI)を行う。

2010年までに登録された。5年生存率と5年無病生存率はそれぞれ83.3%と68.0%であった。低リスク例の患者の予後は良好であったが、高リスク例(肝4区域進展例および遠隔転移例)の予後は不良であった。暫定解析での5年生存率は転移なしの群でfor PRETEXT I: 100%, PRETEXT II: 87.1%, for PRETEXT III: 89.7%, PRETEXT IV: 78.3%であった。一方転移例の5年生存率は43.9%であった¹⁵⁾。以上の結果から、低リスク例でのCITA療法の有効性は確認され、転移例ではCITA療法, ITEC両方とも十分な有効性は得られなかった。CATA-L療法は施行例数が十分でなく有効性は証明できなかった。また、二次癌、特に二次性と考えられる白血病が5例生じ、これは高頻度と考えられる。THP-ADR使用との関連などを検討する必要があると思われる。

8 国内の臨床試験の現状

JPLT-1およびJPLT-2プロトコールの成績を基に、JPLT-3プロトコールでは様々な変更点が立案された。

まずリスク分類については、SIOPEL(ヨーロッパ)あるいはCOG(米国)のリスク分類を受けて、以下の国際リスク分類を採用した。これは国際小児肝癌共同研究(Children's Hepatic Tu-

mor International Collaboration: CHIC)によって開発されている包括的な研究への参加・協力を図ることから採用された。

[国際リスク分類]

(1) 高リスク(以下のいずれかの患者)

血清AFP<100ng/mL

PRETEXT付記因子: M1(転移臓器問わず),

N2(遠隔リンパ節転移)

(2) 中間リスク(以下のいずれかの患者, 高リスク例は除外)

PRETEXT IV

PRETEXT付記因子で以下の因子を1つ以上満たすもの

E1, E1a, E2, E2a

H1, N1

P2, P2a

V3, V3a

多発(腫瘍が2カ所以上肝内に存在する)

診断時年齢が3歳以上

初診時肝破裂例

(3) 標準リスク例(上記(1), (2)以外の患者)

JPLT-3プロトコールの概略を図3に示す。標準リスク例に対しては試験治療(CDDP単剤療法)が、JPLT-2プロトコールにおけるCITA療法(CDDP+THP-ADR)と同様に有効であるかを判定する。標準リスク例は年間15-20例と推定され、必要症例数は75例と推測され、これ

から登録期間5年、観察期間3年とされている。中間リスク群に対しては、試験治療がJPLT-2プロトコルに優越する治療であるかを判定する。術前にPLADO(CDDP+DOX)療法4コースを行い、腫瘍を評価して、外科切除または肝移植による腫瘍切除を行う。術後には、肝切除の場合はPLADO療法2コースを追加する。肝移植の場合には、確立したレジメンは定められていないので、施設判断にて化学療法を追加する。

高リスク群に対しては、これまでの知見では適切な標準療法の提供ができる状態が得られて

いない。SIOPEL-4の良好な成績を受けて、有効なCDDPの用量と強度を増したプロトコルや既存薬剤(CDDP)の増量や、新規分子標的薬剤を用いたwindow studyを施行し、次期の治療法の提案に向けて準備が必要である。

謝辞 本稿は日本小児肝臓スタディグループ(Japanese study group for Pediatric Liver Tumor: JPLT)による「JPLT-3プロトコル JPLT3-S, JPLT3-I」を参考資料として執筆した。JPLT運営委員会、事務局および施設の皆様に深謝いたします。

文献

- 1) Tanimura M, et al: Increased risk of hepatoblastoma among immature children with a lower birth weight. *Cancer Res* 58: 3032-3035, 1998.
- 2) Montagna M, et al: Occasional loss of constitutive heterozygosity at 11p15.5 and imprinting relaxation of the IGFII maternal allele in hepatoblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 120: 732-736, 1994.
- 3) Li FP, et al: Hepatoblastoma in families with polyposis coli. *JAMA* 257: 2475-2477, 1987.
- 4) Arai Y, et al: Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 596-609, 2010.
- 5) Honda S, et al: RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int* 29(11): 1147-1152, 2013.
- 6) von Schweinitz D, et al: Complete resection before development of drug resistance is essential for survival from advanced hepatoblastoma—a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89. *J Pediatr Surg* 30: 845-852, 1995.
- 7) Brown J, et al: Pretreatment prognostic factors for children with hepatoblastoma—results from the International Society of Paediatric Oncology(SIOP) study SIOPEL 1. *Eur J Cancer* 36: 1418-1425, 2000.
- 8) Hishiki T, et al: Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor(JPLT) protocol-2: report from the JPLT. *Pediatr Surg Int* 27: 1-8, 2011.
- 9) Pritchard J, et al: Cisplatin, doxorubicin, and delayed surgery for childhood hepatoblastoma: a successful approach—results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol* 18: 3819-3828, 2000.
- 10) Perilongo G, et al: Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma. final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology—SIOPEL 2. *Eur J Cancer* 40: 411-421, 2004.
- 11) Perilongo G, et al: Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma. *N Engl J Med* 361: 1662-1670, 2009.
- 12) Ortega JA, et al: Effective treatment of unresectable or metastatic hepatoblastoma with cisplatin and continuous infusion doxorubicin chemotherapy: a report from the Childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 9: 2167-2176, 1991.
- 13) Douglass EC, et al: Cisplatin, vincristine, and fluorouracil therapy for hepatoblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 11: 96-99, 1993.
- 14) Sasaki F, et al: Outcome of hepatoblastoma treated with the JPLT-1(Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor) Protocol-1: A report from the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor. *J Pediatr Surg* 37: 851-856, 2002.
- 15) Hiyama E, et al: A cisplatin plus pirarubicin-based JPLT2 chemotherapy for hepatoblastoma: experience and future of the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor(JPLT). *Pediatr Surg Int* 29: 1071-1075, 2013.

肝動脈化学塞栓療法を施行した肝芽腫の2例

星 玲奈, 杉藤 公信, 渡邊 揚介, 吉澤 信輔, 植草 省太,
川島 弘之, 後藤 俊平, 大橋 研介, 池田 太郎, 越永 従道

要 旨

症例は5歳の男児と2歳の女児。肝芽腫の pre-treatment extent of disease (PRETEXT) III。治療抵抗性を示し、肝動脈化学塞栓療法 (transcatheter arterial chemoembolization: TACE) 後に肝切除術を施行した。病理組織所見では、リビオドールで塞栓された腫瘍辺縁部の血管周囲が広く壊死組織に置換されていた。2例とも治療終了後に異時性肺転移を認めた。Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinases (MMP) 2, MMP9 は、血管新生や局所進展、遠隔転移に関与している。腫瘍検体を用いた遺伝子発現解析では、いずれも腫瘍生検時と比較し肝切除時において低下していた。

TACE の遠隔転移に対する影響は議論が残るが、TACE により血管新生や局所進展の抑制が期待できると示唆された。

索引用語: 肝芽腫, 治療抵抗性, 肝動脈化学塞栓療法, 異時性肺転移

I はじめに

全身化学療法に治療抵抗性を示す肝芽腫に対する局所療法として、肝動脈化学塞栓療法 (transcatheter arterial chemoembolization: 以下、TACE) が行われている。肝芽腫に対する TACE は、腫瘍壊死率の増加、腫瘍縮小効果、血清 α -fetoprotein 値 (以下、AFP) の低下が報告され¹⁾、肝切除率を向上させるための有効な手段とされている。日本小児肝腫スタディグループ (Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor; 以下、JPLT)-2 プロトコル²⁾では、外科的切除の困難さに応じた術前病期分類である International Society of Pediatric Oncology (SIOP) の pre-treatment extent of disease (以下、PRETEXT) 分類 (肝4区域のうち何区域が連続して腫瘍が存在していないかに基づいて I~IV に分類され、遠隔転移を含む肝外転移はローマ数字の後に略記号でそれぞれ V: 静脈, P: 門脈, E: リンパ節や他臓器, R: 腫瘍破裂と表記される) に基づき治療が層別化されている。同プロトコルにおいて TACE は、PRETEXT II (2区域が連続して腫瘍なし) の症例に対しては術前治療として1回の

み、PRETEXT III・IV (2区域連続して腫瘍のない区域なし、または腫瘍のない区域なし) の症例に対しては肝外進展がある場合を除き治療に反応する間は切除可能となるまで反復して行われる。

一方、成人の肝細胞癌に対する TACE は遠隔転移を伴わない切除不能の症例や radiofrequency ablation (RFA) の適応外の症例が対象となり、血管浸潤や肝外病変を伴わない巨大もしくは多発性の肝細胞癌に対する first line の治療として推奨されている³⁾。また、肝移植前に TACE を行うことで down staging が得られ移植後の治療成績が向上し、肝移植前の待機治療としての有用性が報告されている⁴⁾。しかし、TACE 後に血清 vascular endothelial growth factor (以下、VEGF) が上昇する^{5,6)}ことや、腫瘍組織における VEGF⁷⁾、matrix metalloproteinases 2 (以下、MMP2)⁸⁾、matrix metalloproteinases 9 (以下、MMP9)⁹⁾ の遺伝子発現が亢進することが報告されており、TACE とその後の遠隔転移との関連が示唆されている。

これまでに、肝芽腫に対し TACE が施行された症例について、詳細な病理組織学的検討や VEGF、MMP2、MMP9 の遺伝子発現を検討した報告はされていない。今回我々は、治療抵抗性を示した肝芽腫に対し TACE を施行し、治療終了後に異時性肺転移を認めた2例を経験したので、病理組織学のおよび分子生物学的な視点から文献的考察を含め報告する。

日本大学医学部小児外科
代表者連絡先: 星 玲奈 〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町
30-1 日本大学医学部小児外科

II 症 例

症例1: 5歳の男児。在胎40週3,690gで出生。家族歴・既往歴に特記事項なし。腹部膨隆を主訴に精査加療目的に紹介となった。初診時、右上腹部に表面平滑・硬・可動性不良な腫瘤を触知した。AFPは8,499,000 ng/mlと高値であった。腹部造影CT検査では肝S1, 4, 5, 8にかけて径11.7×10.7 cmの腫瘤を認めた。腫瘍生検の病理組織所見はepithelial type, fetal and embryonal patternの肝芽腫であった。遠隔転移を伴わないPRETEXT III (2区域連続して腫瘍のない区域がない) (V1, P1)と診断し、JPLT-2プロトコルに従い治療を開始した。CITA療法を2回施行したが、診断時と比較して90%以上のAFPの減少ならびに画像上50%以上の縮小率は得られず(腫瘍の最大径の積, 57%)。治療効果不十分と判断した。ITEC療法に変更したところAFPは減少したが、十分な腫瘍縮小は得られなかった(腫瘍の最大径の積, 55%)。治療抵抗性の肝芽腫と判断し、腫瘍の栄養血管である右肝動脈からTACE (CBDCA 200 mg/m², THP-ADR 30 mg/m², リビオドール 5 ml), その後にITEC療法を施行した。それでも、十分な腫瘍縮小は得られず(腫瘍の最大径の積, 36%)。肝右葉切除術を施行した(POST-TEXT III, V1, P1)。切除肝の病理組織所見(図1A)は、腫瘍の大部分が強い中心壊死に陥っており腫瘍壊死率は90%であった。腫瘍辺縁部では血管がリビオドールで塞栓されたためにフィブリン血栓が形成され、泡沫細胞が散見された。リビオドールで塞栓された腫瘍辺縁部の血管周囲はviableな腫瘍細胞(娘病巣)を認めるものの、広く壊死組織に置換されていた。術後補助化学療法としてITEC療法を2回施行し、完全寛解で退院となった。寛解後11か月時に肺転移を認め、IE療法、VDC療法、CPT-11療法をそれぞれ1回ずつ施行後、胸腔鏡補助下肺部分切除術を施行した。術後にVDC療法を2回施行し、2度目の完全寛解を得て退院した。肺部分切除術から4年6か月再発なく経過している¹⁰⁾。

初診時から肝切除術後化学療法までの治療経過(図1B)を別に示す。

症例2: 2歳の女児。在胎37週2,736gで出生。家族歴・既往歴に特記事項なし。発熱を主訴に精査加療目的に紹介となった。初診時、右上腹部に表面平滑・硬・可動性不良な腫瘤を触知した。AFPは260,445 ng/mlと高値であった。腹部造影CT検査では肝S1, 4, 5, 8にかけて径12.9×8.8 cmの腫瘤を認めた。腫瘍生検の病理組織所見はmixed epithelial and mesenchymal type without teratoid featuresの肝芽腫であった。遠隔転移を伴わ

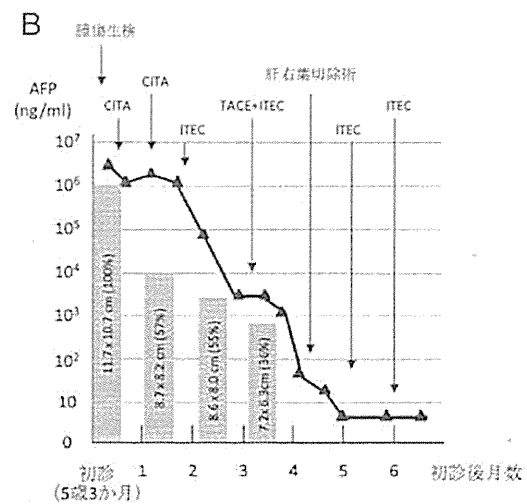
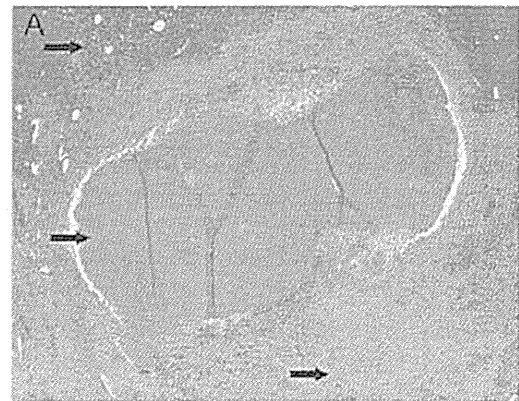


図1

A: 症例1の切除肝(腫瘍辺縁部)の病理組織所見。HE染色、倍率4倍。血管がリビオドールで塞栓されたためにフィブリン血栓が形成されていた(矢印中)。その血管周囲にはviableな腫瘍細胞(娘病巣、矢印上)を認めるものの、広く壊死組織(矢印下)に置換されていた。B: 症例1の初診時から肝切除術後化学療法までのAFPの推移(折れ線グラフ)、初診時を100%としたときの原発巣の最大径の積(棒グラフ)および治療経過。

いPRETEXT III (V2, P1)と診断し、JPLT-2プロトコルに従い治療を開始した。CITA療法を2回施行したが、診断時と比較して90%以上のAFPの減少ならびに画像上50%以上の縮小率は得られず(腫瘍の最大径の積, 64%)。治療効果不十分と判断した。ITEC療法に変更し2回施行したが十分な腫瘍縮小は得られなかった(腫瘍の最大径の積, 59%)。治療抵抗性の肝芽腫と判断し、腫瘍の栄養血管である右肝動脈からTACE (CBDCA 200 mg/m², THP-ADR 30 mg/m², リビオドール 5 ml),

その後、ITEC療法を施行した。AFPは低下したものの再上昇を認め、明らかな腫瘍縮小も得られず（腫瘍の最大径の積、56%）、拡大肝右葉切除術を施行した（POST-TEXT III, V2, P1）。切除肝の病理組織所見（図2A）は、腫瘍細胞が多数残存し腫瘍壊死率は30%であった。腫瘍辺縁部では、血管がリビオドールで塞栓されたためにフィブリン血栓が形成されていた。リビオドールで塞栓された腫瘍辺縁部の血管周囲は viable な腫瘍細胞（娘病巣）を認めるものの、広く壊死組織に置換されていた。術後補助化学療法としてITEC療法を1回施行したところAFPは正常化した。肝切除後2か月時に肺転移を認め胸腔鏡補助下肺部分切除術を施行した。その後3度の肺転移を認め、転移巣に対し肺部分切除を行い、現在も厳重な観察中である。

初診時から肝切除術後化学療法までの治療経過を別に示す（図2B）。

尚、薬剤の略語に対応する一般名および化学療法の詳細については本文末に記載した。

遺伝子発現の検討：腫瘍生検時および肝切除時の臨床検体を用いてVEGF、MMP2およびMMP9の遺伝子発現を解析した。まず、腫瘍生検においてそれぞれ異なる3箇所から正常肝組織および腫瘍組織を、また肝切除において異なる3箇所から腫瘍組織を採取した。肝切除時の腫瘍組織は、腫瘍中心部の病理組織学的に viable な腫瘍細胞が確認された箇所を用いた。TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用い各組織からそれぞれRNAを抽出し、さらにRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて再精製した。続いてPrime Script RT reagent Kit (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) を用いて逆転写反応を行い、相補的DNA (complementary DNA: 以下、cDNA) を合成した。合成したcDNAを用いて定量的RT-PCRを施行した。定量的RT-PCRは、SYBR Premix Dimer Eraser (TaKaRa Bio Inc.) を用い、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa Bio Inc.) で施行した。内因性コントロールとしてβ-2-microglobulin (β2M) を用い遺伝子発現量を補正した。使用したプライマーの詳細は別に示す（表1）。2例ともにいずれの遺伝子発現も、腫瘍生検時の腫瘍組織と比較して肝切除時の腫瘍組織において低下していた（図3）。

【薬剤の一般名】

CDDP：シスプラチン、THP-ADR：ピラルピシン、IFM：イホスファミド、VP-16：エトポシド、CBDCA：カルボプラチン、VCR：ビンクリスチン硫酸塩、DOX：ドキシソルピシン、CPA：シクロホスファミド、CPT-11：

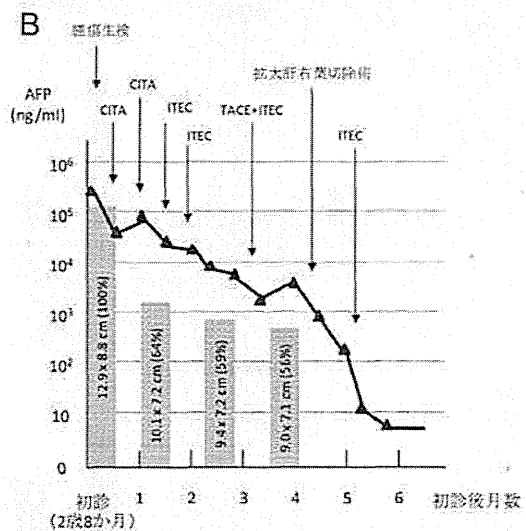
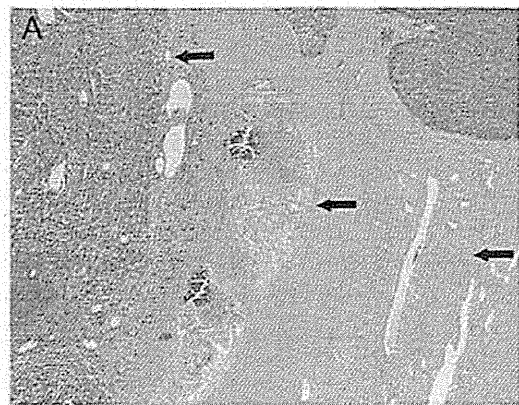


図2

A：症例2の切除肝（腫瘍辺縁部）の病理組織所見。HE染色、倍率4倍。血管がリビオドールで塞栓されたためにフィブリン血栓が形成されていた（矢印中）、その血管周囲には viable な腫瘍細胞（娘病巣、矢印上）を認めるものの、広く壊死組織（矢印下）に置換されていた。B：症例2の初診時から肝切除後化学療法までのAFPの推移（折れ線グラフ）、初診時を100%としたときの原発巣の最大径の積（棒グラフ）および治療経過。

イリノテカン

【化学療法の詳細】

CITA療法：CDDP 80 mg/m² × 2 days, THP-ADR 30 mg/m² × 2 days
 ITEC療法：IFM 3 g/m² × 2 days, VP-16 100 mg/m² × 5 days, CBDCA 200 mg/m² × 1 day, THP-ADR 30 mg/m² × 2 days
 IE療法：IFM 3 g/m² × 2 days, VP-16 100 mg/m² × 5 days

表1 プライマー配列

遺伝子	配列 (5' → 3')	増幅産物 (bp)
VEGF	Forward primer: 5'-TTTGGGAACACCGACAAACC-3' Reverse primer: 5'-ATCCCCAAAGCACAGCAATG-3'	149
MMP2	Forward primer: 5'-ACAGTGGATGATGCCCTTTGC-3' Reverse primer: 5'-AGCGGCCAAAGTTGATCATG-3'	112
MMP9	Forward primer: 5'-AACCTGCCAGTTCCATTTC-3' Reverse primer: 5'-AGAAGCCGAAGAGCTTGTC-3'	129
β2M	Forward primer: 5'-ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3' Reverse primer: 5'-ATCTTGGGCTGTGACAAAGTC-3'	335

VEGF; vascular endothelial growth factor, MMP2; matrix metalloproteinases 2, MMP9; matrix metalloproteinases 9, β2M; β-2-microglobulin

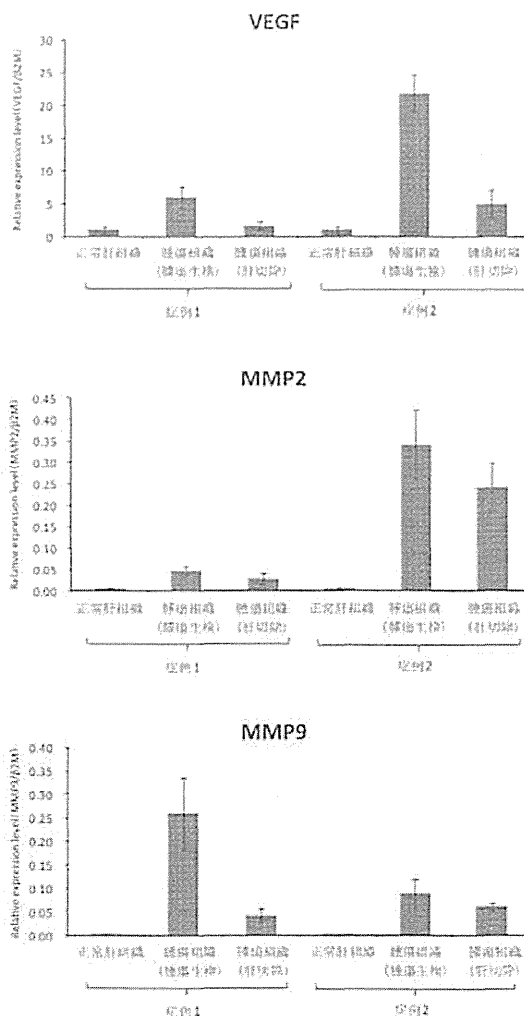


図3 腫瘍生検時および肝切除時の VEGF, MMP2, MMP9 の遺伝子発現の比較。2例ともにいずれの遺伝子発現も、腫瘍生検時の腫瘍組織と比較して肝切除時の腫瘍組織において低下していた。

VDC 療法: VCR 1.5 mg/m² × 1 day, DOX 37.5 mg/m² × 3 days, CPA 1.2 g/m² × 3 days

CPT-11 療法: CPT-11 100 mg/m² × 3 days

III 考 察

今回経験した肝芽腫2例は、いずれも全身化学療法に治療抵抗性を示し、肝切除前にTACEを施行した。肝切除時にdown stagingは得られず、肝切除後に症例1は1度、症例2は4度の異時性肺転移を認めた。

成人の肝細胞癌に対するTACEの有効性について、肝外転移の発生率の低下や肝内局所再発の低下が報告されている¹¹⁾¹²⁾。Okanoら¹³⁾は、成人の肝細胞癌におけるTACE後の肝内局所再発の低下について、TACEにより腫瘍細胞を減少させることで肝切除の際に原発巣からの腫瘍細胞の流出を軽減できるからではないかと推測している。肝芽腫ではTACEによる腫瘍壊死率の増加、腫瘍縮小効果やAFPの低下が期待され¹⁾、自験例においては肝切除術前にTACEを施行したが、AFP低下は認められたものの明らかな腫瘍縮小ならびにdown stagingは得られなかった。病理組織学的な腫瘍壊死率は、症例1では90%とかなり効果的であったと考えられたが、症例2では30%にとどまった。しかし、症例2では症例1と同様に腫瘍辺縁部の血管がリビオドールで塞栓され、その周囲にviableな腫瘍細胞(娘病巣)を認めるもの、腫瘍辺縁部が広く壊死組織に置換されている所見を認めた。病理組織学的な観点からTACEは、腫瘍切除断端に壊死をもたらすことで肝内とくに切除断端再発のリスクを軽減したと考えられた。

成人の肝細胞癌においてTACEによる肝内局所再発の低下が示唆されている一方で、TACE後に血清VEGFが上昇すること⁵⁾⁶⁾や切除肝の腫瘍組織におけるVEGFの遺伝子発現が亢進すること⁷⁾がTACE後の遠隔転移を

示唆すると報告されており、TACEの遠隔転移に対する影響は依然議論がなされている。Sergioら⁵⁾は、TACE前後の血清 VEGF と CT 検査を用いた検討から、CT 検査で多数結節を認める症例や腫瘍縮小が認められない症例で明らかに血清 VEGF が高値を示し、肝細胞癌に対する TACE の効果が不十分だとそれが血管新生の引き金となり血清 VEGF が上昇すると報告している。また、Shimら⁶⁾は TACE により腫瘍血管が塞栓され壊死をきたすと低酸素状態となり、このような虚血性変化が血清 VEGF の高値をもたらし、とくに TACE 後 1~2 日目の血清 VEGF 高値はその後の遠隔転移の出現を示唆すると報告している。Wangら⁷⁾による肝細胞癌の切除肝を用いた VEGF の遺伝子発現解析からは、VEGF の発現亢進により遠隔転移が示唆され、その機序として TACE により腫瘍細胞が極度の低酸素状態に曝され、それに残存した腫瘍細胞が適応しようと血管新生が増強するためではないかと推測している。この他に肝細胞癌では、MMP2 の阻害因子である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 の発現低下により MMP2 の発現が亢進し遠隔転移が促進され⁸⁾、また interleukin (IL)-23 の高発現により MMP9 の発現が亢進し遠隔転移を促す⁹⁾と、それぞれ遺伝子発現と遠隔転移との関連が報告されている。このように、成人の肝細胞癌においては遠隔転移の一因として VEGF、MMP2 および MMP9 といった血管新生を促進する因子の関与が示唆されている。自験例における腫瘍生検時および肝切除時の腫瘍検体を用いた解析では、VEGF、MMP2 および MMP9 の遺伝子発現は腫瘍生検時と比較して肝切除時において低下していた。成人の肝細胞癌で遠隔転移が示唆される症例と術後肺転移を起こした自験例とでは逆の結果となった。その原因は明らかでないが、TACE ならびに全身化学療法により原発巣では血管新生や局所進展の分子生物学的因子が抑制されたと考えられた。

肝芽腫に対する TACE の効果を、病理組織学および分子生物学的に検討した。TACE とその後の遠隔転移の因果関係は明らかでないが、Sergioら⁵⁾や Shimら⁶⁾の報告と同様に自験例からも TACE 後の不十分な腫瘍壊死が関わっていることが示唆された。TACE の遠隔転移に対する影響は依然議論が残るが、TACE は全身化学療法に抵抗性を示す肝芽腫に対して肝切除前に行うことにより、局所進展抑制効果や術後切除断端の再発予防効果が期待できる治療であると示唆された。

この論文について申告すべき利益相反状態はありません。

文 献

- 1) Oue T, Fukuzawa M, Kusafuka T, et al: Transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of hepatoblastoma. *J Pediatr Surg*, 33: 1771-1775, 1998.
- 2) Hishiki T, Matsunaga T, Sasaki F, et al: Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: Report from the JPLT. *Pediatr Surg Int*, 27: 1-8, 2011.
- 3) Bruix J, Sherman M: Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases: Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 42: 1208-1236, 2005.
- 4) Chapman WC, Majella Doyle MB, Stuart JE, et al: Outcomes of neoadjuvant transarterial chemoembolization to downstage hepatocellular carcinoma before liver transplantation. *Ann Surg*, 248: 617-625, 2008.
- 5) Sergio A, Cristofori C, Cardin R, et al: Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC): The role of angiogenesis and invasiveness. *Am J Gastroenterol*, 103: 914-921, 2008.
- 6) Shim JH, Park JW, Kim JH, et al: Association between increment of serum VEGF level and prognosis after transcatheter arterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Sci*, 99: 2037-2044, 2008.
- 7) Wang B, Xu H, Gao ZQ, et al: Increased expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Acta Radiol*, 49: 523-529, 2008.
- 8) Wang N, Zhu M, Tsao SW, et al: Up-regulation of TIMP-1 by genipin inhibits MMP-2 activities and suppresses the metastatic potential of human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 7: e46318, 2012.
- 9) Li J, Lau G, Chen L, et al: Interleukin 23 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-kappa B induced matrix metalloproteinase 9 expression. *PLoS One*, 7: e46264, 2012.
- 10) 杉藤公信, 星 玲奈, 花田 学, 他: 完全寛解後に緩徐な血清 AFP 値の上昇に伴って再発肺転移を認めた肝芽腫の 1 例. *小児がん*, 47: 132-136, 2010.
- 11) Sugo H, Futagawa S, Beppu T, et al: Role of preoperative transcatheter arterial chemoembolization for resectable hepatocellular carcinoma: Relation between postoperative course and the pattern of tumor

- recurrence. *World J Surg*, 27: 1295-1299, 2003.
- 12) Chen XP, Hu DY, Zhang ZW, et al: Role of mesohepatectomy with or without transcatheter arterial chemoembolization for large centrally located hepatocellular carcinoma. *Digestive Surg*, 24: 208-213, 2007.
- 13) Okano A, Hajiro K, Takakuwa H, et al: Diffuse intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 47: 1356-1359, 2000.

(2013年8月30日受付)

(2014年1月30日採用)

Two Cases of Hepatoblastoma Treated With Transcatheter Arterial Chemoembolization

Reina Hoshi, Kiminobu Sugito, Yosuke Watanabe, Shinsuke Yoshizawa, Shota Uekusa,
Hiroyuki Kawashima, Shumpei Goto, Kensuke Ohashi, Taro Ikeda, and Tsugumichi Koshinaga

Department of Pediatric Surgery, Nihon University School of Medicine

We performed transcatheter arterial chemoembolization (TACE) and hepatectomy on two cases of hepatoblastoma (Pre-Treatment Extent of Disease (PRETEXT) III) showing chemoresistance. The histopathological findings showed that it was replaced with necrotic tissues around the tumor vessels with lipiodol embolized at the tumor margins. The

histopathological findings showed that the areas around the tumor vessels embolized with lipiodol at the tumor margins were replaced with necrotic tissues. These two cases developed metachronous lung metastasis after treatment. Vascular endothelial growth factor (VEGF), as well as matrix metalloproteinases (MMP)2 and MMP9 expression levels are implicated in angiogenesis, local progression, and distant metastasis. All of VEGF, MMP2, and MMP9 expression levels at hepatectomy were low compared with the expression levels on tumor biopsy. Although the influence of TACE on distant metastasis is controversial, our findings suggest that TACE suppressed angiogenesis and local progression.

Key words: hepatoblastoma, chemoresistance, transcatheter arterial chemoembolization, metachronous lung metastasis

Correspondence to: Reina Hoshi, Department of Pediatric Surgery, Nihon University School of Medicine, 30-1, Oyaguchi-kamicho, Itabashi-ku, Tokyo, 173-8610 JAPAN

Glypican 3 Expression in Pediatric Malignant Solid Tumors

Yoshiaki Kinoshita¹ Sakura Tanaka¹ Ryota Souzaki¹ Kina Miyoshi² Kenichi Kohashi² Yoshinao Oda²
Tetsuya Nakatsura³ Tomoaki Taguchi¹

¹ Department of Pediatric Surgery, Kyushu University, Fukuoka, Japan

² Department of Anatomic Pathology, Kyushu University, Fukuoka, Japan

³ Division of Cancer Immunotherapy, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan

Address for correspondence Yoshiaki Kinoshita, MD, PhD, Department of Pediatric Surgery, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashiku, Fukuoka-City, Fukuoka 812-8582, Japan (e-mail: kinoppy@pedsurg.med.kyushu-u.ac.jp).

Eur J Pediatr Surg 2015;25:138–144.

Abstract

Purpose Glypican 3 (GPC3) is one of the cell surface heparan sulfate proteoglycans that binds to the cell membrane, and it is known as an oncofetal protein in adult malignant tumors. Clinical trials using a GPC3 peptide vaccine have already been started in Japan as a new immunotherapy for hepatocellular carcinoma in adult patients. To investigate the possibility of GPC3 immunotherapy for pediatric malignant tumors, we assessed the expression of GPC3 in pediatric malignant tumors.

Methods Immunohistochemically, the GPC3 expression was examined in 159 pediatric solid tumors, including 35 cases of neuroblastoma, 30 cases of Wilms tumor, 10 cases of hepatoblastoma, 25 cases of germ cell tumors, 56 cases of rhabdomyosarcoma, and 3 cases of other tumors. In addition, to clarify the physiological expression during the fetal to neoinfantile period, autopsy specimens of subjects without any neoplastic diseases were assessed in 9 fetal cases and 21 neoinfantile cases. The serum levels of GPC3 were also analyzed using specimens obtained from 53 subjects by the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay method.

Results Histologically, a high rate of GPC3 expression was noted in 10 (90.9%) of the 11 subjects with yolk sac tumors and 6 (60.0%) of the 10 subjects with hepatoblastoma. In addition, 9 (30.0%) of the 30 subjects with Wilms tumors and 14 (25.0%) of the 56 subjects with rhabdomyosarcoma were positive for the expression of GPC3. Concerning autopsy specimens, most of the 23 subjects younger than 7 months showed positive findings in the liver (94.7%) and kidney (81.8%). Two subjects (100%) with yolk sac tumors and six (75.0%) of the eight subjects with hepatoblastoma serologically demonstrated a high rate of positive expression. Concerning the distribution of the serum GPC3 level according to age, 8 (80.0%) of the 10 subjects younger than 1 year showed a positive finding, while only 16 (37.3%) of the 43 subjects older than 1 year showed a positive finding.

Conclusion Most cases of hepatoblastoma and yolk sac tumor, and some cases of other tumors were found to express GPC3 either histologically or serologically. On the other hand, GPC3 was physiologically expressed during the fetal and neoinfantile period under 1 year of age. Although, more preliminary data and experience are required,

Keywords

- glypican 3
- tumor marker
- immunotherapy

received
May 15, 2014
accepted after revision
July 29, 2014
published online
October 26, 2014

© 2015 Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1393961>.
ISSN 0939-7248.

patients older than 1 year that show a positive finding for GPC3 are considered to be appropriate candidates to receive the new immunotherapy using GPC3 peptide vaccination.

Introduction

Glypican 3 (GPC3) is a cell surface heparan sulfate proteoglycan that is linked to the extracytoplasmic cell-surface membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor.¹ GPC3 is associated with cell growth, development, and the responses to various growth factors.² Gonzalez et al described its role as a negative regulator of inhibitory growth factors.³ GPC3 inactivation has been found to be responsible for X-linked Simpson-Golabi-Behmel (SGB) overgrowth syndrome. In SGB syndrome, 10 to 20% of the patients described have an embryonal malignancy, including hepatoblastoma, neuroblastoma, gonadoblastoma, Wilms tumor, or hepatocellular carcinoma.⁴

Recent studies have shown that there is an overexpression of GPC3 in hepatocellular carcinoma, and has its usefulness as a novel diagnostic marker in many series.⁵ Furthermore, the expression of GPC3 has also been reported in other malignant tumors, such as malignant melanoma,⁸ clear cell adenocarcinoma of the ovary,⁹ and malignant germ cell tumors in adult subjects.¹⁰ Ota et al reported the immunoreactivity of adult testicular tumors, including a yolk sac tumor, teratoma, and choriocarcinoma, as well as a seminoma and embryonal carcinoma. The author demonstrated a high rate of immunoreactivity for the yolk sac tumor.¹⁰

GPC3 expression has not yet been widely analyzed in pediatric tumors and the roles of GPC3 expression are still unclear. The expression of GPC3 mRNA in several cell lines, including those derived from neuroblastomas, Wilms tumors, and hepatoblastomas, has been reported.^{11,12} In addition, Zynger et al examined 65 cases of hepatoblastoma by immunohistochemistry and all subjects exhibited a positive reaction.¹³ Zynger et al speculated that GPC3 has a role in the tumorigenesis of hepatoblastoma.

In this study, we analyzed the expression of GPC3 in pediatric malignant solid tumors and assessed the clinical implications of its expression.

Materials and Methods

The immunohistochemical studies examined 159 pediatric solid tumors, including 35 cases of neuroblastoma, 30 cases of Wilms tumor, 10 cases of hepatoblastoma, 25 cases of germ cell tumors (11 yolk sac tumors, 4 immature teratomas, and 10 mature teratomas), and 56 cases of rhabdomyosarcoma and 3 cases of other tumors (2 undifferentiated sarcomas and 1 case of Ewing sarcoma) treated at our institution. The serum levels of GPC3 were also analyzed in samples obtained from 53 subjects, including 13 cases with neuroblastoma, 10 cases of Wilms tumor, 8 cases of hepatoblastoma, 16 cases of germ cell tumors (2 cases with yolk sac tumors, 4 cases with

immature teratomas, and 10 cases with mature teratomas), 3 cases of rhabdomyosarcoma, and 3 cases of other tumors by the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method using a GPC3 ELISA kit (Bio Mosaics, Burlington, Vermont, United States).

In addition, to clarify the physiological expression during the fetal to neoinfantile period, autopsy specimens from subjects without any neoplastic disease were assessed by immunohistochemistry. These included samples from 9 fetal cases (age, 19–41 weeks) and 21 neoinfantile cases.

For the immunohistochemical analysis the streptavidin-biotin-peroxidase method (Histofine SAB-PO Kit, Nichirei, Tokyo, Japan) was used. A GPC3 monoclonal antibody (Bio Mosaics) was used at 1:200 dilution.

The serum levels of GPC3 were analyzed by a sandwich ELISA method using an ELISA kit. The samples were diluted at 1:4 and 100 μ L of samples or of GPC3 standards were pipetted into the appropriate wells. Covered wells were incubated overnight at 2 to 8°C. After washing the wells five times with wash buffer, 200 μ L of a biotin-conjugated anti-GPC3 antibody was pipetted into each well. After overnight incubation, the wells were washed with buffer and 200 μ L of streptavidin-horseradish peroxidase conjugated diluents were added to each well. After 30 minutes of incubation, 200 μ L of tetramethylbenzidine substrate solution was added to each well for 30 minutes. After these procedures, the absorbance of each well was analyzed by a spectrophotometric plate reader. Based on the data of healthy adult subjects with the standard deviation, the cut-off level for GPC3 was defined as 178 ng/mL in this study.

The patient's parents provided consent for obtaining tumor and tissue preservation and for the subsequent biological analyses. This study was performed according to the Ethical Guidelines for Clinical Research published by the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan on July 30, 2003.

Results

Histologically, a high rate of GPC3 expression was noted in 10 (90.9%) of the 11 subjects with yolk sac tumors and in 6 (60.0%) of the 10 subjects with hepatoblastoma (\rightarrow Table 1 and \rightarrow Figs. 1a, b). In addition, 9 (30.0%) of the 30 subjects with Wilms tumor (\rightarrow Fig. 1c), 14 (25.0%) of the 56 subjects with rhabdomyosarcoma, and 1 (2.9%) of the 35 subjects with neuroblastoma were positive for the expression of GPC3.

Similarly, 2 subjects (100%) with yolk sac tumors and 6 (75.0%) of the 8 subjects with hepatoblastoma serologically demonstrated a high rate of positive expression, while 1 (33.3%) of the 3 subjects with rhabdomyosarcoma, 4 (30.7%) of the 13 subjects with neuroblastoma, and 1

Table 1 The results of the immunohistochemical and serological analysis of glypican 3

Histology		GPC3	
		Tissue GPC3 (immunohistochemistry)	Serum GPC3 (ELISA)
HB	Hepatoblastoma	6/10 (60.0%)	6/8 (75.0%)
NBs	Neuroblastoma	1/35 (2.9%)	4/13 (27.3%)
WT	Wilms tumor	9/30 (30.0%)	1/10 (10.0%)
RMS	Rhabdomyosarcoma	14/56 (25.0%)	1/3 (33.3%)
GCT	Yolk sac tumor	10/11 (90.9%)	2/2 (100%)
	Immature teratoma	1/4 (25.0%)	3/4 (75.0%)
	Mature teratoma	0/10 (0.0%)	5/10 (50.0%)
Others	Undifferentiated sarcoma	1/2 (50%)	2/2 (100%)
	Ewing sarcoma	0/1 (0.0%)	0/1 (0.0%)
Total number		159	53

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GCT, germ cell tumor; GPC3, glypican 3; HB, hepatoblastoma; NBs, neuroblastoma and associated tumor; RMS, rhabdomyosarcoma; WT, Wilms tumor.

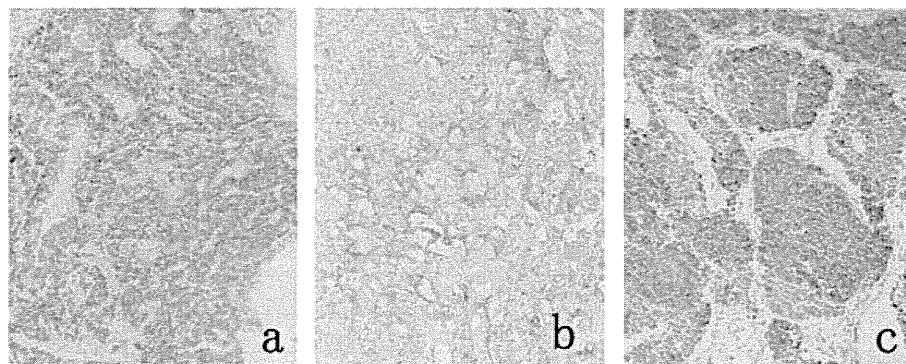


Fig. 1 Immunohistochemical findings: (a) hepatoblastoma, 2-year old; (b) yolk sac tumor, 12-year old; (c) Wilms tumor, 3-year old.

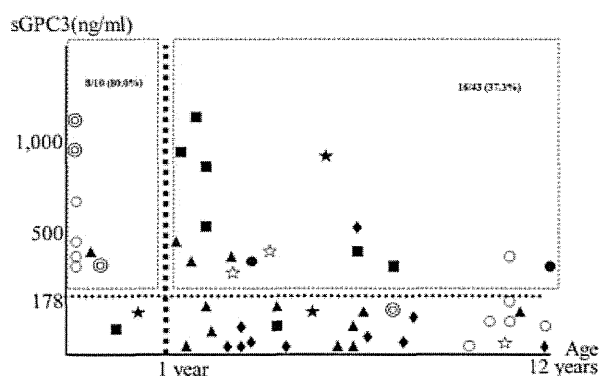


Fig. 2 The distribution of the serum glypican 3 (GPC3) levels according to age. Samples from 8/10 (80.0%) patients younger than 1 year were serologically GPC3-positive, while only samples from 16/43 (37.2%) patients older than 1 year were serologically GPC3-positive. ■, hepatoblastoma; ▲, neuroblastoma and associated tumors; ◆, Wilms tumor; germ cell tumor; ●, yolk sac tumor; ⊙, immature teratoma; ○, mature teratoma; ★, rhabdomyosarcoma; ☆, others.

(10.0%) of the 10 subjects with Wilms tumor demonstrated a positive finding (→ Fig. 2).

Concerning the distribution of the serum GPC3 level according to age, 8 (80.0%) of the 10 subjects younger than 1 year showed a positive finding. In contrast, only 16 (37.2%) of the 43 subjects older than 1 year showed a positive finding.

Concerning the autopsy specimens, most of the 23 subjects younger than 7 months (including 9 fetal and 14 neoinfantile subjects) showed positive findings in the liver (94.7%) and kidney (81.8%) (→ Table 2) (→ Figs. 3a–d). The other six subjects older than 1 year did not demonstrate a positive finding in any organ.

The clinical course of one representative case was as follows (→ Fig. 4). The subject had an undifferentiated sarcoma that was diagnosed when the patient was 4 years and 6 months old. The serum α -fetoprotein (AFP) level was low, the serum GPC3 level was 334 ng/mL, and the biopsy specimen was immunohistochemically positive for GPC3. The level of serum GPC3 normalized following preoperative intensive

Table 2 The results of the immunohistochemical analysis for autopsy specimens

Age	CNS	Heart	Lung	Liver	Kidney	Pancreas	Spleen	Adrenal gland	Thymus	GI tract
19 wk	–	ND	–	+	+	+	–	ND	ND	–
19 wk	–	ND	–	ND	+	ND	–	ND	–	ND
21 wk	ND	–	–	+	+	–	–	–	ND	ND
21 wk	–	–	–	+	+	–	–	ND	–	–
24 wk	–	–	–	+	+	ND	–	ND	ND	–
24 wk	–	–	–	+	+	ND	–	ND	ND	–
32 wk	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–
38 wk	–	–	–	+	+	ND	–	–	+	–
41 wk	–	–	–	+	ND	ND	–	–	–	ND
0 d	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–
0 d	ND	–	–	+	+	–	–	–	–	–
0 d	–	–	–	ND	+	ND	–	ND	ND	–
0 d	–	–	–	ND	–	ND	–	ND	ND	–
0 d	ND	–	–	+	+	–	–	–	ND	–
1 d	ND	–	–	+	+	ND	–	–	–	ND
12 d	ND	–	ND	+	–	–	–	–	–	–
14 d	–	–	–	ND	+	+	–	–	–	–
1 mo	ND	–	–	+	–	–	–	–	–	–
3 mo	ND	–	–	+	–	–	–	ND	–	ND
4 mo	ND	–	–	+	+	–	–	ND	–	ND
6 mo	ND	–	–	+	+	–	–	–	ND	–
6 mo	ND	ND	–	–	+	–	–	–	ND	–
7 mo	ND	–	–	+	+	–	–	ND	–	ND
8 mo	ND	–	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1 y 0 mo	–	–	–	ND	–	–	ND	–	–	ND
1 y 0 mo	–	–	–	–	–	–	–	–	ND	–
1 y 4 mo	–	–	–	ND	–	–	–	–	ND	–
9 y	–	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9 y	ND	–	–	ND	ND	ND	ND	ND	–	ND
10 y	–	–	–	–	–	–	–	–	ND	–

Abbreviations: CNS, central nervous system; +, positive; –, negative; ND, not done.

chemotherapy and was maintained within a normal range thereafter. Furthermore, the specimen obtained by radical surgery showed no viable tumor cells and the tissue was immunohistochemically negative for GPC3. After the treatment, the patient has survived for 5 years without any events and the patient's GPC3 level is normal. In this case, the serum GPC3 level was useful as an independent tumor marker.

Discussion

In recent years, several authors have reported the diagnostic value of the serum GPC3 level in hepatocellular carcinomas and other kinds of malignant tumors in adults. In the field of GPC3 research, the expression levels in fetal tissue have been discussed by several authors. Immunohistochemically, three

cases of fetal liver tissue were found to be positive, although the benign pediatric liver was negative.¹³ In this way, GPC3 has been considered to be a kind of oncofetal protein and to be associated with tumorigenesis in pediatric malignant tumors. However, the clinical implications of the GPC3 expression levels as a diagnostic marker or for the monitoring of tumor progression or curability have not yet been sufficiently analyzed.

From the current data, most hepatoblastomas and yolk sac tumors showed positive findings for both serum and tissue GPC3. In most subjects younger than 1 year, there was a tendency toward a higher level of GPC3 expression compared with subjects older than 1 year. In particular, newborn patients with germ cell tumors, including mature and immature teratomas, exhibited a high level of serum GPC3. Based