

批判的吟味5：生物学的病理学的評価

(まとめ：金子，八反田)

(分担研究名：神経芽細胞腫スクリーニングの評価)

要約：6カ月乳児の尿を用いた神経芽腫マスキング(MS)の目的は、予後不良な幼児の進行期腫瘍を、乳児期に早期に発見し、治療を行い、予後を改善することである。MSは、乳児期の早期腫瘍が進行し、幼児期の腫瘍になるという前提に基づき実施されている。神経芽腫患者の予後はploidy、1番染色体短腕(1p)欠失の有無、N-myc増幅の有無など染色体・遺伝子構成により規定されており、この3者は密接に関係している。MSで発見される腫瘍の90%は予後良好な3倍体・5倍体腫瘍であり、反対にMS陰性で幼児に発見される腫瘍の75%は予後不良な2倍体・4倍体腫瘍である。乳児の腫瘍と幼児の腫瘍は、おおむね異なる生物学的性格を示すので、MSによる神経芽腫の予後改善効果は小さいと考えられる。

見出し語：high-risk腫瘍、intermediate-risk腫瘍、low-risk腫瘍、ploidy、1番染色体短腕(1p)欠失、N-myc増幅

はじめに

神経芽腫は胎児期神経提由来の腫瘍であり、副腎や交感神経節に発生することが多い。小児悪性腫瘍の中で白血病、脳腫瘍について頻度が高く、生物学的に多彩な性格を示すため、多方面にわたり研究が進められている<sup>1-3)</sup>。

神経芽腫は、手術だけでほぼ治癒してしまうlow-risk腫瘍と、手術に強力な化学療法を併用しても治癒させることが困難なhigh-risk腫瘍、両者の中間の予後を示すintermediate-risk腫瘍に分類される。この三群と以下に述べる臨床的生物学的予後因子とは密接な関係がある。

1. 臨床的予後因子 (表1)<sup>4)</sup>

神経芽腫の臨床的予後因子としては年齢と病期が重要である。腫瘍が12カ月未満の乳児に発生した場合、他臓器へ転移した進行期腫瘍(IV病期)でも、適切な治療を行えば半数以上の患者に治癒が期待できる。また、乳児に発生した神経芽腫のなかには自然退縮した例も報告されている<sup>5)</sup>。一方、12カ月以上の幼児に発生したIV病期神経芽腫の生存率は20%程度である。神経芽腫には他の腫瘍にみられないスペシャルカテゴリー-IVS病期が加えられている。IVS病期は原発腫瘍が局所にとどまっている(I, II病期)のに、腫瘍細胞が、皮膚、肝、または骨髄に遠隔転移した状態で、患者年齢

は1歳未満に限定される。IVS病期患者の予後はI, II病期患者の予後と同様に良好である<sup>1,4)</sup>。

## 2. 生物学的予後因子

神経芽腫の分子生物学的研究は急速に進み、様々な染色体・遺伝子異常が生じていることが明らかにされた。それぞれの異常は、腫瘍の組織像や悪性度と密接に関係していることがわかってきた。

### 1) 病理組織像

神経芽腫の病理組織像は患者の予後と密接な関係がある。Shimadaらは神経芽腫の病理組織を観察し、favorable histologyとunfavorable histologyに分類する分類法を提唱した。この分類は神経芽腫細胞の分化成熟度、核分裂・核崩壊像、Schwann細胞の増殖度に患者年齢を組み合わせ作成した基準に基づいており、患者予後の予測に役立つことが、米国Children's Cancer Study Group (CCLSG)の136例に対するprospective studyによって確認されている<sup>5)</sup>。この研究によると初診後48カ月無病生存率は、favorable histology群が81%、unfavorable histology群が20%であった( $P<0.0001$ ) (図1)。

### 2) 腫瘍細胞 ploidy

神経芽腫のploidyは重要な生物学的予後因子の1つである。ploidyを分析する方法にはフローサイトメトリーと染色体分析の2つがある。

Lookらは289例の神経芽腫をフローサイトメトリーで分析し、diploid群101例(34%)、hyperdiploid (aneuploid)群194例(65%)、hypodiploid群3例(1%)に分類した(表2)<sup>6)</sup>。hyperdiploid群は12カ月未満の乳児に発生した腫瘍の79%を占めた。第IV病期の患者に限ると、12カ月未満の乳児ではhyperdiploid群の全例が生存していたのに対し、diploid群の生存例は20%に過ぎなかった。 $(P<0.001)$ 。12~24カ月の年齢層ではhyperdiploid群の55%が生存したのに

対し、diploid群では17%が生存したに過ぎない( $P=0.026$ )。24カ月以上の年齢ではhyperdiploid群とdiploid群の両方の予後が不良であり、両者の生存率に差はみられなかった。N-mycコピー数とploidyの関係を分析すると、N-myc増幅はdiploid群の40%にみられたのに対し、hyperdiploid群では16%にのみみられた( $P=0.001$ )。以上のようにploidyは24カ月未満の患者では優れた予後因子であり、N-mycコピー数とも強く関係している<sup>6)</sup>。

ploidyは染色体分析によっても分析可能である。染色体分析はフローサイトメトリーとは異り腫瘍細胞が分裂していないと分析できないという欠点を有しているが、染色体の数と同時に、1番染色体短腕(1p)などの構造異常染色体を分析できるという利点がある。

神経芽腫は腫瘍細胞の染色体数により2倍体腫瘍(2n, 染色体数44-57)、3倍体腫瘍(3n, 60-77)、4倍体腫瘍(4n, 81-103)、5倍体腫瘍(5n, 104-115)に分類可能である。金子らは68例の神経芽腫を分析し、2n腫瘍17例、3n腫瘍35例、4n腫瘍10例、5n腫瘍6例に分類した(表3)<sup>7)</sup>。1番染色体短腕(1p)欠失を2n, 4n腫瘍の54%、3n, 5n腫瘍の10%に認めた<sup>7)</sup>。生存率は2n腫瘍患者が70カ月時で57%、4n腫瘍患者が51カ月で60%であるのに対し、3n腫瘍患者は76カ月で88%生存し、5n腫瘍患者は全例生存していた( $P<0.001$ )。以上のように、3n, 5n腫瘍患者の予後は良好であり、2n, 4n腫瘍患者の予後は不良である。

この結果をまとめると、2n, 4n腫瘍は1p欠失を伴いやすく予後不良であり、3n, 5n腫瘍は1p欠失をもたないことが多く、予後良好であることになる。染色体分析がフローサイトメトリーより優れている点としては、1p欠失を分析できることの他に、フローサイトメトリーではともにaneuploidyに分類される3n腫瘍と4n腫瘍を区別できる点があげられる。

### 3) N-mycがん遺伝子増幅

N-mycがん遺伝子増幅を有する神経芽腫は、12カ月以上の幼児に多く発生する。その原発部位はほとんどの場合副腎であり、病期は一般に進行期である(表4)<sup>8)</sup>。N-myc増幅は神経芽腫以外の腫瘍ではほとんどみられない。N-myc増幅腫瘍の予後は不良であり、その生存率はN-myc非増幅腫瘍よりも低い(図2)<sup>9)</sup>。進行期神経芽腫に限るとN-myc非増幅腫瘍患者の半数は予後不良の転帰をとる。従って神経芽腫の予後予知のためには、N-mycのコピー数とShimada分類などその他の予後因子を組み合わせて用いる必要がある。例えば、無病生存率はN-myc非増幅+ favorable histology 群が83%、N-myc非増幅+ unfavorable histology 群が29%、N-myc増幅+ unfavorable histology 群が13%である<sup>9)</sup>。N-mycのコピー数とShimada分類を組み合わせると、第3病期患者の予後予測に特に有用である。

同一患者から採取した原発腫瘍と転移腫瘍、または診断時腫瘍と再発時腫瘍のN-mycのコピー数をそれぞれ比較したところ、コピー数に変化はみられなかったと報告されている。この所見はN-myc増幅が、特定の神経芽腫の診断時に既に起きており、臨床経過中にコピー数が変化することはないことを示している<sup>8)</sup>。

#### 4) 1番染色体短腕(1p)欠失と loss of heterozygosity (LOH) 分析

神経芽腫の染色体分析の結果1p欠失が高頻度にみられることから、多数の神経芽腫を対象にしたLOH分析が行われた。LOH分析はDNA多型を利用した分析方法で、分裂細胞が得られなくても、1p欠失の有無を検出できる。その結果、多くの腫瘍に1p末端D1Z2-D1S228(1p36.3-36.2)に共通欠失領域があることが解った<sup>10)</sup>。また1p末端のD1Z2(1p36.3)から、セントロメア側のD1S7(1p34.3)に及ぶ大きな欠失を示す一群の腫瘍があり、しばしばN-myc増幅を伴うと報告されている<sup>11)</sup>。

腫瘍細胞に1p欠失を有する患者の予後は、1p欠失をもたない患者より不良であるとする報告が多い。特に大きな1p欠失(D1Z2-D1S7)を有する腫瘍の予後が不良である。武田らは、神経芽腫には、上記の1p末端欠失を示す腫瘍の他に、1p36に局限したinterstitial deletionを示す腫瘍が存在すると報告した。Interstitial deletionを示す神経芽腫の予後は良好である<sup>11)</sup>。

N-myc増幅は、1p欠失を有する腫瘍に認めることが多い。Caronらの報告によるとN-myc増幅腫瘍の全例に1pのLOHがみられたという<sup>12)</sup>。

1p欠失を有する腫瘍にはN-myc増幅を示さない腫瘍も存在する。1p欠失もN-myc増幅も共に、単変量解析では予後不良因子である。しかし、年齢、病期、フェリチン、N-myc、1p LOHを予後因子として多変量解析を行うと、1p LOHが最も強く予後に影響し、N-myc増幅の予後に対する影響力は消失する(表5)<sup>12)</sup>。つまり1p LOHの有無を分析する方が、N-mycのコピー数を分析するより予後を知る上で重要であるということになる。

#### 5) TRKがん遺伝子発現

TRKがん遺伝子は、神経成長因子NGFの受容体である受容体チロシンキナーゼをコードしている。TRKの発現を示す腫瘍は1歳未満の乳児に発生することが多く、病期は早期(I, II, IVS期)であり、N-mycコピー数は一般に正常である<sup>13,14)</sup>。組織像との関連でみると、TRK高発現腫瘍では神経芽細胞の分化像が多くみられるのに対し、TRK低発現腫瘍では分化傾向がみられない。TRK高発現腫瘍の予後は良好であるのに対し、TRK低発現腫瘍の予後は不良である(図3)<sup>13,14)</sup>。TRK発現腫瘍はNGFに依存して生存、分化しており、NGFが不足すると細胞死を招来するという仮説が提唱されており、この仮説を用いると乳児神経芽腫の自然退縮をうまく説明できる<sup>2)</sup>。

#### 6) 多変量解析による各予後因子の重要性

これまで述べた生物学的予後因子は全て単変量解析では予後に影響することが証明されている。これらの予後因子は必ずしも互いに独立した因子ではないので、多変量解析を実施し、それぞれの予後に対する影響を知る必要がある。しかしながら、それぞれの研究で分析した因子は異なるので簡単に比較できない。4つの研究で分析された各因子を予後に対する影響の大きい順に並べると、1) *N-myc*増幅→病期→年齢→原発部位→*TRK*<sup>13)</sup>, 2) *N-myc*増幅→年齢→ploidy→病期→原発部位→1p欠失<sup>7)</sup>, 3) 1pLOH→ferritin→病期→*N-myc*<sup>12)</sup>, 4) 1番染色体構成 (ploidyと1p欠失による3群の分類)→MS陽性・陰性→病期→*N-myc*増幅<sup>15)</sup>となる。以上のデータをまとめると2倍体、1pLOH、*N-myc*増幅、年齢1歳以上、進行病期は予後不良腫瘍の共通した性格である。1pLOHまたは1p欠失を有する2倍体腫瘍は*N-myc*増幅の有無、年齢、病期に関係なく予後不良である。1pLOHや1p欠失を正確に分析するよりも、*N-myc*コピー数を分析する方が容易である。そのため、*N-myc*だけが分析される症例が多いので、*N-myc*分析の臨床的有用性はなくなる。

### 3. マススクリーニング陽性腫瘍とマススクリーニング陰性で臨床的に発見された腫瘍の生物学的特徴

6カ月時に受検したマススクリーニングで発見される腫瘍の病期は早期 (I, II, IVS期) が多く、ploidyは3倍体、5倍体が多い<sup>7,15)</sup>。組織像ではfavorable histologyを示す腫瘍が96%を占める<sup>16)</sup>。1pLOHを示す症例の頻度は17%と低い<sup>17)</sup>。*N-myc*増幅を示す腫瘍はまれであり (2/186, 1%)、予後は良好で5年時の無病生存率は96%である<sup>15)</sup>。

一方、6カ月時のマススクリーニングが陰性で、その後幼児になってから、腫瘍が臨床的に発見された患者の病期は進行期 (III, IV期) が多く、腫瘍のploidyは2倍体、4倍体が多い<sup>15,18-20)</sup>。ま

た、組織像はunfavorable histologyを示すことが多く<sup>19,20)</sup>、1pLOHを示す症例の頻度は、51%と高い<sup>17)</sup>。*N-myc*増幅を示す腫瘍の頻度も高く (25/60, 42%)、予後は不良で5年時の無病生存率は28%に過ぎない<sup>15)</sup>。

カナダのケベック州で実施されたマススクリーニングで発見された神経芽腫の97%はfavorable histologyを示し、マススクリーニング陰性で1歳以降に臨床的に発見された腫瘍の82%はunfavorable histologyを示した<sup>20)</sup>。この結果は我が国のデータと一致する。以上のように、マススクリーニングで発見される腫瘍は、low-risk腫瘍の特徴を示し、マススクリーニング陰性で臨床的に発見される腫瘍は、high-risk腫瘍の特徴を示す。マススクリーニング陽性腫瘍にも、予後因子によりhigh-risk腫瘍に分類される症例が含まれているが、その頻度は低く4%である<sup>15)</sup>。1歳以上の幼児に発生する予後不良腫瘍を、6カ月時にマススクリーニングで早期に発見し、予後を改善するという試みは、効率的ではないと考えられる。マススクリーニングの実施時期を変更する案に関しては、1歳以降の特定の時期に神経芽腫が集中して発生するわけではないこと、また、high-risk腫瘍は急激な臨床経過をとるので、意味があるとは考えられない。

### 文献

- 1) Brodeur GM and Castleberry RP: Neuroblastoma. In: PA Pizzo and DG Poplack (eds), Pediatric Oncology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott, 1993: 739-767.
- 2) 中川原章, Brodeur GM: 神経芽細胞腫の予後を左右する *TRK* 遺伝子発現と *N-myc* 増幅: 分化と細胞死を制御する神経成長因子レセプターの発現, CRC, 2:254-261, 1993.
- 3) 八反田洋一, 恒吉正澄: 神経芽腫 - そのバイオロジーと予後, 病理組織所見と予後, 小児外科, 29:95-101, 1997.

- 4) Evans AE, D'Angio GJ, Propert K, Anderson J, Hann HL: Prognostic factors in neuroblastoma. *Cancer* 59:1853-1859, 1987.
- 5) 八反田洋一, Seeger RC, 嶋田博行: 神経芽腫136例における予後因子の検討: 特に組織分類(Shimada)およびN-mycについて, *小児がん*, 30:83-86, 1993.
- 6) Look AT, Hayes FA, Shuster JJ et al: Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 19:581-591, 1991.
- 7) Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, et al: Current urinary mass screening for catecholamine metabolites at 6 months of age may be detecting only a small portion of high-risk neuroblastomas: a chromosome and N-myc amplification study. *J Clin Oncol* 8:2005-2013, 1990.
- 8) Brodeur GM, Azar C, Brother M, et al: Neuroblastoma, effect of genetic factors on prognosis and treatment. *Cancer* 70:1685-1694, 1992.
- 9) Shimada H, Hachitanda Y, Brodeur GM et al: Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst* 87:1470-1476, 1995.
- 10) Schwab M, Praml C, Amler LC: Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chromosom Cancer* 16:211-229, 1996.
- 11) Takeda O, Homma C, Maseki N, et al. There may be two tumor suppressor gene on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes Chromosom Cancer* 10:30-39, 1994
- 12) Caron H, Sluis PV, Kraker J, et al: Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334:225-230, 1996
- 13) Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavard NJ, et al: Association between high levels of expression of the *TRK* gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328:847-854, 1993.
- 14) Suzuki T, Bogenmann E, Shimada H, et al: Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 85:377-384, 1993.
- 15) 金子安比古: 神経芽腫マスキリーニングで発見された腫瘍と, 陰性で後に臨床的に発見された腫瘍の生物学的特徴, *小児がん*, 36: 382, 1997.
- 16) Hachitanda Y, Ishimoto K, Hata J, et al: One hundred neuroblastomas detected through a mass screening system in Japan. *Cancer* 74:3223-3226, 1994.
- 17) イスラム・アショラフル, 影山肇, 飯島崇, 他: 神経芽腫マスキリーニング発見症例における1番染色体短腕遠位領域(p34-p36)ヘテロ接合性消失(LOH)の検討, *小児がん*, 36: 454, 1997.
- 18) Nakagawara A, Zaizn Y, Ikeda K, et al: Different genomic and metabolic patterns between mass screening-positive and mass screening-negative later-presenting neuroblastomas. *Cancer* 68:2037-2044, 1991
- 19) 石本浩一, 藤田宏夫, 高田功二, 他: 神経芽細胞腫マスキリーニング陽性例と陰性例, *小児外科*, 24:67-72, 1992.
- 20) Takeuchi LA, Hachitanda Y, Woods WG, et al: Screening for neuroblastoma in North America. *Cancer* 76:2363-2371, 1995.

表1 神経芽腫の患者年齢, 病期と2年生存率<sup>4)</sup>

予後因子		患者数	2年生存率	P
年齢	2歳未満	73	77%	<0.0001
	2歳以上	51	38%	
病期	I	15	100	<0.0001
	II	27	82	
	III	18	42	
	IV	51	30	
	IVS	13	100	

表2 患者年齢で分類した神経芽腫の ploidy と病期, 生存率<sup>6)</sup>

	病期					P	生存率	P
	I	II	III	IV	IVS			
12月未満(n=100)								
Hyperdiploid	28	6	23	12	10	0.004	100%	<0.001
Diploid	4	1	1	11	4		20	
12 - 24月(n=56)								
Hyperdiploid	7	5	6	13	-	0.24	55	0.026
Diploid	2	2	4	17	-		17	
24月以上(n=139)								
Hyperdiploid	13	4	9	58	-	0.2	18	0.86
Diploid	3	3	2	47	-		15	

フローサイトメトリーによるデータ

表3 染色体 ploidy で分類した神経芽腫の病期, 1番染色体短腕(1p)欠失, N-myc増幅, 生存率<sup>7)</sup>

腫瘍の 染色体	症例数	病期			欠失		N-myc増幅		生存率
		I + II + IVS	III	IV	+	-	+	-	
2n	17	2	5	10	9	7	3	8	70ヵ月後に57%生存
3n	35	23	9	3	2	27	1	30	76ヵ月後に88%生存
4n	10	1	3	6	5	5	3	6	51ヵ月後に60%生存
5n	6	6	0	0	1	1	0	5	全員生存
合計	68	32	17	19	17	40	7	49	

染色体分析によるデータ

2n: 染色体数 41 - 53, 3n: 60 - 78, 4n: 81- 92, 5n: 100 - 115.

表4 神経芽腫 1200例における N-myc コピー数と病期の関係<sup>8)</sup>

診断時の病期	N-myc増幅腫瘍の頻度	
	数	%
良性神経節腫	0/26	0
早期神経芽腫 (I,II 病期)	10/309	3
IVS 病期神経芽腫	6/85	7
進行期神経芽腫 (III,IV 病期)	230/780	31

表5 神経芽腫 89 例の予後因子に対する多変量解析<sup>12)</sup>

Variable and Model	Categories Compared	Hazard ratio (95% Confidence Interval)	P
臨床的予後因子			
第 1 モデル			
病期	III or IV vs I, II, or IVS	4.0 (1.6 – 10.3)	0.003
年齢	1 歳以上 vs 1 歳未満	2.2 (0.9 – 5.0)	0.07
第 2 モデル			
病期	III or IV vs I, II, or IVS	2.6 (1.0 – 6.5)	0.043
Ferritin	> 142 vs ≤ 142 μ g/liter	4.9 (2.2 – 11.0)	< 0.001
遺伝子因子を加えたモデル			
病期	III or IV vs I, II, or IVS	2.6 (1.0 – 6.9)	0.062
Ferritin	> 142 vs ≤ 142 μ g/liter	2.9 (1.2 – 6.7)	0.015
N-myc	> 1 copy vs 1 copy	1.0 (0.4 – 2.8)	0.94
1 番染色体短腕欠失	有り vs 無し	4.4 (1.6 – 11.8)	0.004



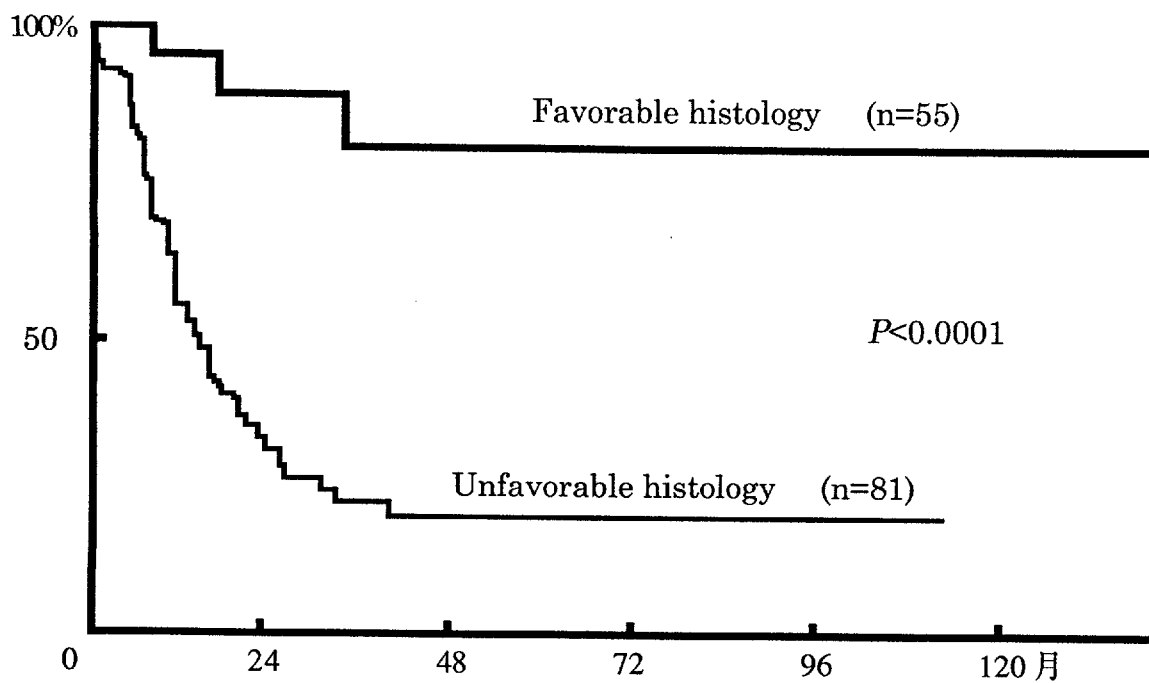


図1 Shimada 組織分類により分類した神経芽腫患者の生存曲線<sup>5)</sup>

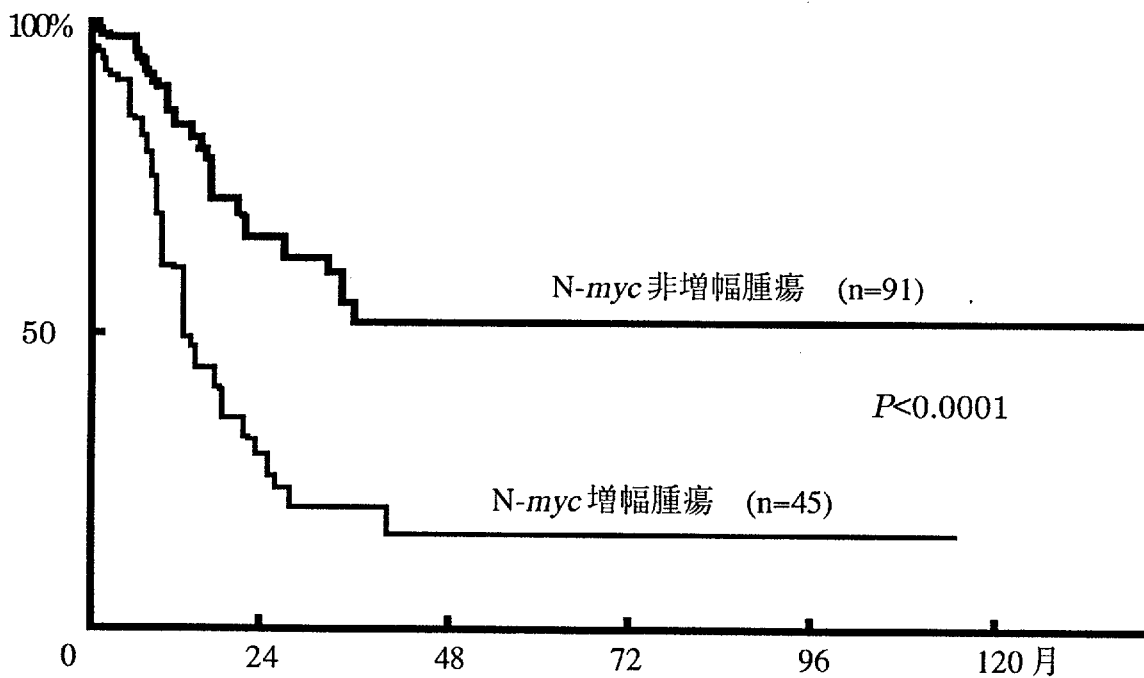


図2 N-myc 増幅および非増幅神経芽腫患者の生存曲線<sup>5)</sup>

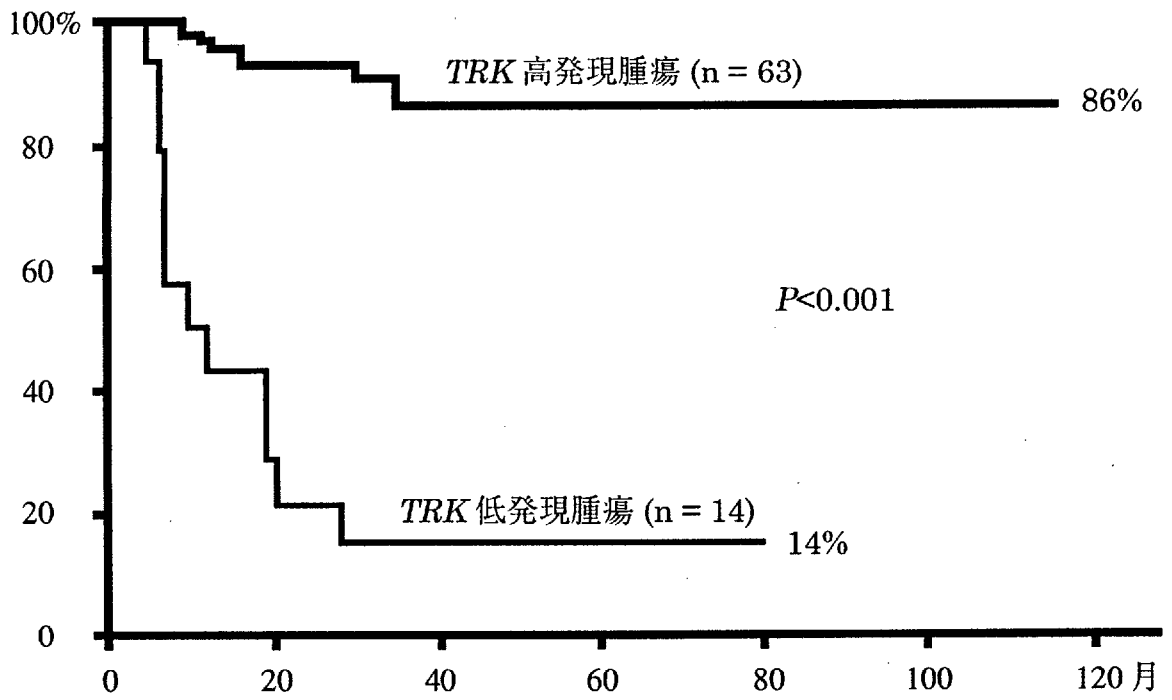


図3 *TRK* 高発現および低発現神経芽腫患者の生存曲線<sup>13)</sup>



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約: 6 ヲ月乳児の尿を用いた神経芽腫マススクリーニング(MS)の目的は、予後不良な幼児の進行期腫瘍を、乳児期に早期に発見し、治療を行い、予後を改善することである。MSは、乳児期の早期腫瘍が進行し、幼児期の腫瘍になるという前提に基づき実施されている。神経芽腫患者の予後は ploidy、1 番染色体短腕(1p)欠失の有無、N-myc 増幅の有無など染色体・遺伝子構成により規定されており、この 3 者は密接に関係している。MS で発見される腫瘍の 90%は予後良好な 3 倍体・5 倍体腫瘍であり、反対に MS 陰性で幼児に発見される腫瘍の 75%は予後不良な 2 倍体・4 倍体腫瘍である。乳児の腫瘍と幼児の腫瘍は、おおむね異なる生物学的性格を示すので、MS による神経芽腫の予後改善効果は小さいと考えられる。