

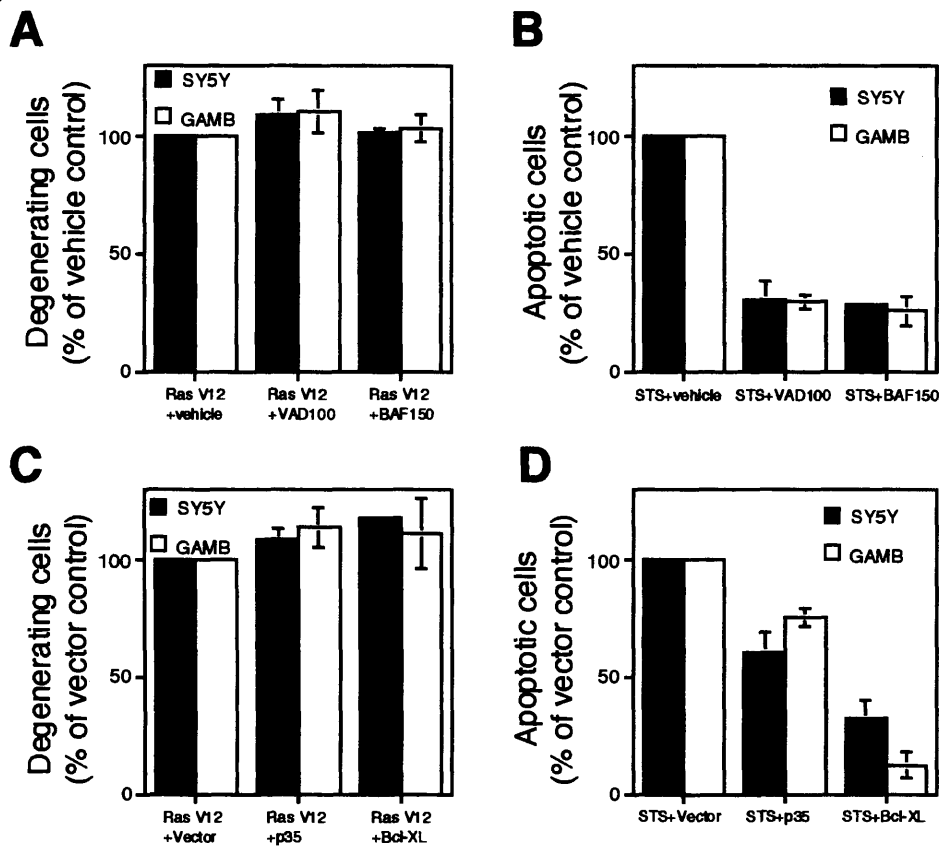
Fig. 6.

Fig. 6. Lack of role for caspase cascade and Bcl-xL in the regulation of Ras-induced neuroblastoma cell death. (A) Ras V12-expressing pcDNA3 plasmid (0.5 μ g) was co-transfected with the green fluorescent protein (GFP)-expressing plasmid (0.5 μ g) into SH-SY5Y (closed bars) and GAMB (open bars) neuroblastoma cells in the presence of 100 μ M zVAD-fmk (VAD100) or 150 μ M Boc-Asp-fmk (BAF150) (pan-caspase inhibitors). The proportion of GFP-positive cells showing morphological degeneration was determined 24 h after transfection. (B) SH-SY5Y and GAMB neuroblastoma cells were treated with staurosporine (STS) in the presence of the indicated inhibitors. After 24 h, cells were stained with acridine orange to detect nuclear changes, and the proportion of apoptotic cells (having condensed and/or fragmented nucleus) was determined under a fluorescence microscope. (C) SH-SY5Y and GAMB neuroblastoma cells were transfected with the Ras V12-expressing pcDNA3 plasmid (0.5 μ g) plus the GFP plasmid (0.5 μ g), together with a control, p35-, or Bcl-xL-expressing plasmid (0.5 μ g). The proportion of GFP-positive cells showing morphological degeneration was determined 24 h after transfection as in (A). (D) SH-SY5Y and GAMB neuroblastoma cells were transfected with the control pcDNA3 plasmid (0.5 μ g) plus the GFP plasmid (0.5 μ g), together with a control, p35-, or Bcl-xL-expressing plasmid (0.5 μ g). After 24 h, the transfected cells were treated with STS, and the proportion of apoptotic cells was determined by acridine orange staining 24 h after STS treatment as in (B). In (A) - (D), the graphs indicate the percentage of degenerating (A, C) and apoptotic (B, D) cells, and the data represent the mean \pm standard deviation from three separate experiments.

Fig. 6E

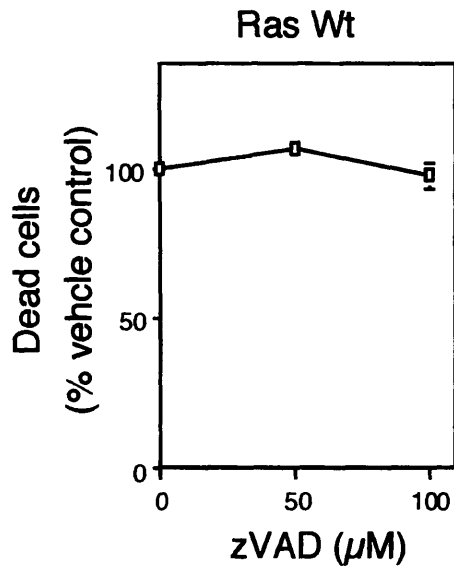


Fig. 6. Lack of role for caspase cascade and Bcl-xL in the regulation of Ras-induced neuroblastoma cell death. (E) SH-SY5Y-TA-wtRas (Ras Wt) cells were cultured in the absence of tetracycline for 5 days in the presence of the indicated concentrations of zVAD-fmk (zVAD), and the proportion of dead cells was determined by the dye exclusion method. The graph indicates the percentage of dead cells normalized to the vehicle control, and the data represent the mean \pm standard deviation from three separate experiments.

Fig. 6F

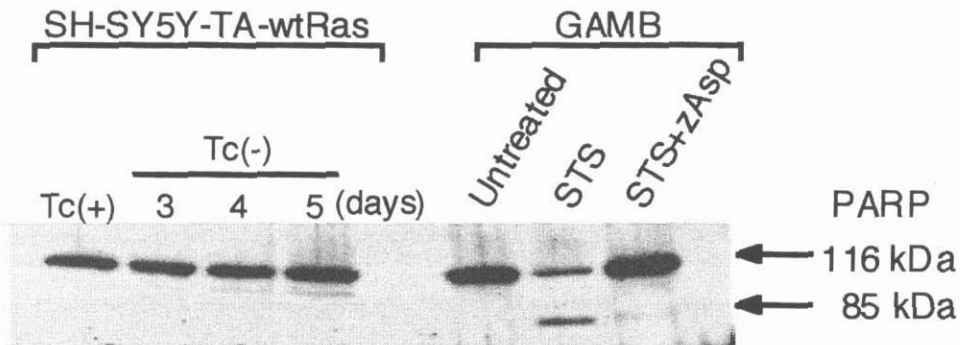


Fig. 6. Lack of role for caspase cascade and Bcl-xL in the regulation of Ras-induced neuroblastoma cell death. (F) Cell lysates were prepared from SH-SY5Y-TA-wtRas cells cultured in the presence or absence of tetracycline for the indicated periods. As a control for caspase-dependent poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) processing, cell lysates were prepared from GAMB cells either treated with STS in the presence or absence of the pan-caspase inhibitor zAsp-CH₂-DCB (zAsp) or left untreated for 2 days. The cell lysates were subjected to immunoblot analysis using anti-PARP antibody.

Fig. 7

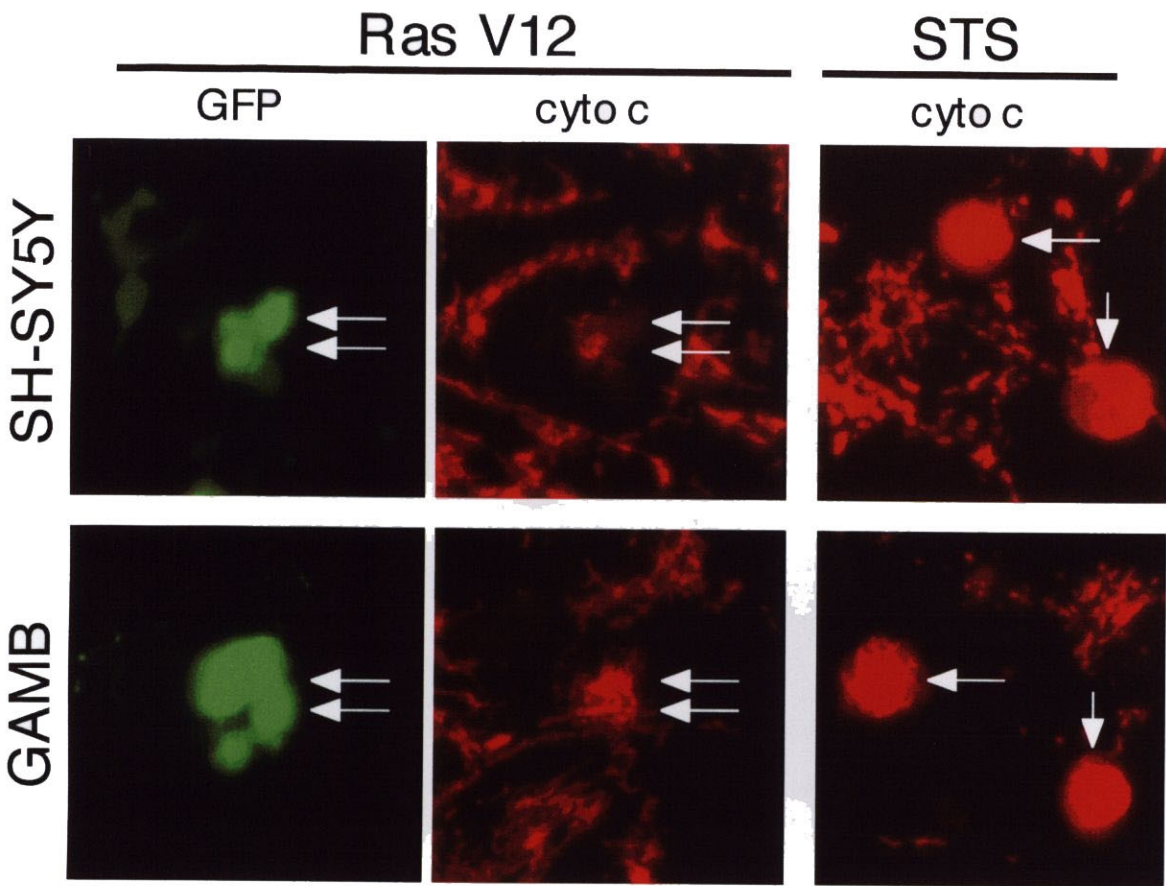


Fig. 7. Lack of cytochrome c redistribution in neuroblastoma cells undergoing Ras-induced death.

The neuroblastoma cells seeded on the glass coverslips were transfected with the Ras V12-expressing pcDNA3 plasmid (0.5 μ g) together with the GFP plasmid (0.5 μ g). On the next day after transfection, the cells were fixed in phosphate-buffered saline with 4% paraformaldehyde, permeabilized, and incubated with an anti-cytochrome c mouse monoclonal antibody (clone 6H2.B4). The cells were then incubated with Texas Red-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody. Identical fields were photographed under a fluorescence microscope with filters appropriate for visualization of transfected cells (GFP) and cytochrome c immunostaining (cyto c). The double arrows indicate transfected cells undergoing degeneration. The single arrows indicate STS-treated cells undergoing apoptosis, which serve as a positive control for cytosolic distribution of cytochrome c.

Fig. 8A

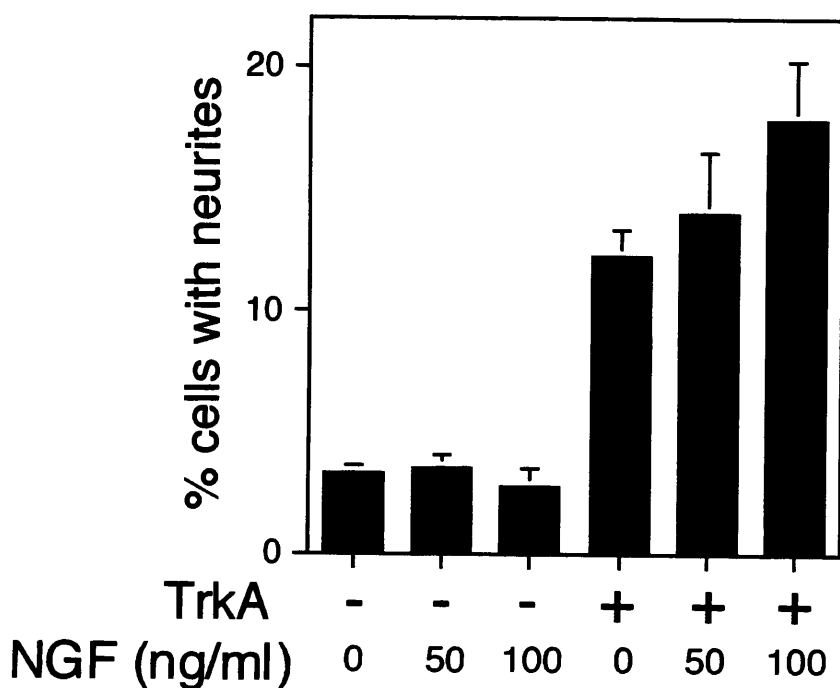
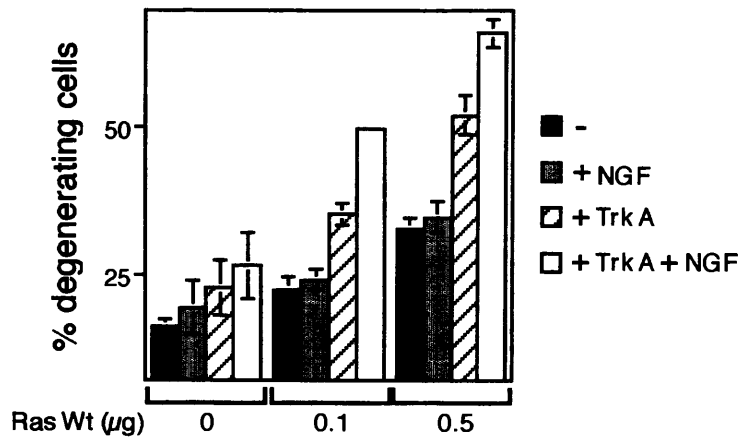


Fig. 8. Augmentation of Ras-induced neuroblastoma cell death through the activation of the TrkA signaling pathway. (A) The green fluorescent protein (GFP)-expressing plasmid (0.5 μ g) was co-transfected with the TrkA-expressing or the control plasmid (0.5 μ g) into SH-SY5Y neuroblastoma cells. The cells were treated 6 h after transfection with the indicated concentrations of nerve growth factor (NGF) for 1 day, and then GFP-positive cells with neurites (cellular processes longer than two cell-body lengths or longer than one cell-body length with a growth cone) were scored. The results (mean \pm standard deviation) are from four separate transfection experiments.

Fig. 8

B



C

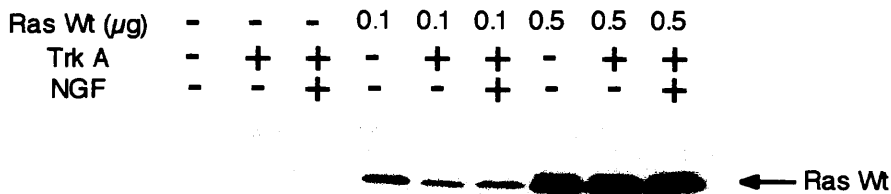


Fig. 8. Augmentation of Ras-induced neuroblastoma cell death through the activation of the TrkA signaling pathway. (**B** and **C**) The GFP plasmid (0.5 μg) was co-transfected with the indicated amounts of the wt-Ras-expressing pcDNA3 plasmid with or without the TrkA-expressing plasmid (0.5 μg) into SH-SY5Y cells. The total amount of transfected plasmid DNAs was kept constant by adding empty vector plasmids. The cells were treated 6 h after transfection with or without NGF (100 ng/ml) for 1 day, and then GFP-positive cells showing morphological degeneration were scored (**B**), or cell lysates were subjected to immunoblot analysis using anti-H-Ras antibody to monitor the expression level of wt-Ras (**C**). In (**B**), the results (mean +/- standard deviation) are from three separate transfection experiments.

4. 考察

神経芽腫は非常に幅広い臨床像・生物学的性質をもった腫瘍であり、経過観察のみで自然退縮により治癒する非常に予後良好な一群がある一方で積極的な治療にも抵抗性を示す予後不良群も存在する(Brodeur, 1995)。神経芽腫ではその予後とよく相関する分子マーカーが明らかにされており、代表的なものとしてはH-Ras、TrkA、N-Mycなどが知られている(Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985; Tanaka et al., 1991, 1998; Nakagawara et al., 1993)。H-Ras や TrkA の高発現は良好な予後と相関しており、N-Myc の高発現は不良な予後と相関しているが、これらの分子マーカーの発現が単なる随伴現象であるのか、それともこれらの分子マーカーの発現自体が腫瘍細胞や生体に対して積極的に何らかの生物学的な影響を及ぼしその結果として疾患の予後と相関が見られるのかについてはよくわかっていない。N-Myc についてはトランスジェニックマウスを用いた実験からその高発現が神経芽腫の発生に寄与しうることが報告されているが(Weiss et al., 1997)、H-Ras、TrkA については良好な予後との因果関係については不明であった。そこで本研究においては Ras 蛋白質の高発現が神経芽腫腫瘍細胞に与える生物学的影響について検討を行った。

まず免疫組織化学的手法を用いた腫瘍組織の解析結果から Ras を高発現する腫瘍細胞が変性を起こしていることが明らかになった。しかしながら変性細胞はアポトーシスの最も重要な形態学的特徴である核の濃縮像を示さず、TUNEL 陰性でカスパーゼ・カスケードの活性化も確認できなかった。従って Ras を高

発現する細胞はアポトーシスとは異なった細胞死を起こしていることが示唆された。さらに腫瘍検体を用いた電子顕微鏡観察の結果、変性細胞は non-apoptotic なプログラム細胞死のひとつである autophagic degeneration (Schweichel & Merker, 1973; Clarke, 1990; Zakeri et al., 1995; Kitanaka & Kuchino, 1999) の特徴を有していることが判明した。これら in vivo の解析結果は Ras の発現と non-apoptotic な細胞死の間に密接な関係があることを示している。そこで次に Ras の発現と non-apoptotic な細胞死との間の因果関係を培養神経芽腫細胞への遺伝子導入実験により検討した。その結果神経芽腫細胞内で Ras を高発現させることによって、腫瘍組織で観察された細胞死と同じ特徴をもった細胞死を再現できることが確認された。以上の in vivo ならびに in vitro の解析結果は、ヒト神経芽腫において Ras 蛋白質の発現が引き金となって腫瘍細胞が non-apoptotic な細胞死を起こしていることを強く示唆している。

今回の免疫組織化学的検討の過程では Fig. 1C の例に見られるように Ras を高発現する細胞変性領域に時として空隙が認められた。このことは Ras の発現により変性をきたした細胞領域が活発に収縮しつつある、すなわち少なくとも局所的に腫瘍容積の減少（退縮）を起こしていることを意味している。そこでこのような局所的に見られる退縮傾向（Ras 陽性の細胞変性領域の出現）が腫瘍全体の退縮に貢献するような性質のものであるか否かについて検討を行った。自然退縮を起こしやすい予後良好な神経芽腫としてはマス・スクリーニングにより見いだされた症例(mass-screening cases)がよく知られており、これまでの報告によれば経過観察によって少なくともその約 3 分の 1 以上の症例が自然退縮

により治癒するものと考えられる(Yamamoto et al., 1998; Nishihira et al., 2000)。

一方積極的治療を行っても予後不良で自然退縮が期待できない症例群としては、臨床症状をもって発症し INSS stage 3, 4 に診断された 1 才以上の症例(clinically-detected cases)があげられる。この両者において Ras 陽性の細胞変性領域の出現頻度を比較したところ、clinically-detected cases よりも mass-screening cases で明らかに高頻度に出現が認められ、神経芽腫の自然退縮傾向と Ras による細胞変性の間にはっきりとした相関があることがわかった。この結果は必ずしも他のメカニズムの存在を否定するものではないが、Ras の発現によって誘導される神経芽腫の non-apoptotic なプログラム細胞死が自然退縮の過程で重要な役割を果たしている可能性を示唆している。また、このような考え方はこれまで神経芽腫の自然退縮のメカニズムとしてプログラム細胞死の関与が唱えられてきたにもかかわらず、アポトーシスと自然退縮の間にはっきりとした相関を見いだし得なかった従来の観察結果(Ikeda et al., 1995; Koizumi et al., 1995; Tonini et al., 1997)をよく説明するものである。さらに化学療法後に摘出した神経芽腫の腫瘍検体に対する電子顕微鏡解析の結果 autophagic degeneration の特徴を示す変性像が顕著に認められたことから (Kodet, 1998)、Ras は単独では自然退縮には不十分な程度の発現レベルでも抗癌剤による non-apoptotic な細胞死誘導を促進することにより予後の改善に貢献している可能性が推測される。尚、本研究は細胞死に焦点を絞って行ったが、腫瘍組織中で神経節細胞への分化を示す腫瘍細胞が低レベルではあるが Ras を発現していることを免疫染色の検討過程において認めた。Ras が神経分化誘導に関わっていることは以前よりよく知られている

ことから(Bar-Sagi, 1989)、低レベルの Ras の発現は分化誘導を介して良好な予後に貢献している可能性も考えられる。

今回の研究により神経芽腫細胞に Ras の発現が誘導されると non-apoptotic な細胞死が引き起こされることが明らかとなったが、それでは Ras 蛋白質の発現がどのような機序で誘導されてくるのか、という点については現在のところ全くわかっていない。Ras の発現部位と神経芽腫の分葉構造との間に一定の関係がみられなかったことから、血流状態を含めた環境因子が主要因とは考えにくく、むしろ遺伝子的に規定されたプログラムにより制御されている可能性が推測される。神経芽腫は神経堤に由来する腫瘍であり同じく神経堤に由来する副腎髄質細胞や交感神経節細胞は Ras 蛋白質を発現していることから(Furth et al., 1987; Garin-Chesa et al., 1987)、腫瘍化の過程で抑制されていた発現プログラムが解放されることにより Ras の発現が亢進してくるのかも知れない。神経芽腫は一つの腫瘍の中でも多彩な病理組織像が見られることから推察されるように、多くの subpopulation からなる heterogeneous な腫瘍と考えられる。従って最終的に自然退縮する腫瘍では、時間的なずれはあるものの、時間の経過とともに Ras を発現する subpopulation が増加し大勢を占めるようになるものと考えられる。一方最終的に退縮をしない腫瘍では、仮に Ras を発現する subpopulation が存在して局所的な退縮が起きても Ras を発現しない subpopulation が選択的に増殖して大勢を占めるようになってゆくものと考えられる。また Ras 蛋白質の発現制御については分子レベルでの知見も乏しいが、N-myc の場合と異なり H-ras 遺伝子には増幅は見られないことから(Tanaka et al., 1991)、遺伝子の転写レ

ベルあるいはそれ以降の翻訳ないし翻訳後修飾のレベルで制御されていると考えられる。興味深いことに N-Myc の発現と H-Ras の発現との間には負の相関関係が報告されており(Nakada et al., 1993)、N-Myc が H-Ras 蛋白質の発現抑制に関わっている可能性も考えられる。今後神経芽腫における Ras 蛋白質の発現調節機構を明らかにすることができれば、Ras の発現誘導を介した神経芽腫に対する新たな治療法の開発が期待できる。

本研究はまた、神経芽腫の自然退縮に関わるメカニズムの理解に進歩をもたらすのみならず、ヒト疾患とプログラム細胞死の関係を考える上で重要な発想の転換点を与えるものである。本研究の結果はアポトーシスとは異なるプログラム細胞死がヒトの生体内で重要な役割を果たしていることを明らかに示しており、従ってこれまでの「プログラム細胞死すなわちアポトーシス」とする画一的な考え方は修正を免れないことを意味している。事実、今回検討を行った神経芽腫の自然退縮についても「アポトーシス」という観点のみからのアプローチではうまく理解できなかった現象が、「アポトーシスとは異なったプログラム細胞死」という観点を導入することによって退縮のメカニズムを容易に理解できるようになった。従って今後「プログラム細胞死の多様性」の概念を常に念頭に置くことにより、これまでアポトーシスではうまく説明し得なかった生理的あるいは病的状態でおきている細胞死の理解にブレークスルーが期待される。例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患でおきている細胞死はこれまでアポトーシスと考えられてきたが、最近になって実際に患者神経組織でおきている細胞死は autophagic degeneration の

ようなアポトーシスとは異なった細胞死であることが認識されるようになってきた(Anglade et al., 1997; Kegel et al., 2000; Nixon et al., 2000; Turmaine et al., 2000; Jellinger, 2001)。今後アポトーシス以外のプログラム細胞死の制御メカニズムが解明されることにより、こういった疾患の治療法開発に新たな手がかりが得られることも期待される。また、がんの治療においてはがん細胞のもつアポトーシス抵抗性が治療抵抗性を与えるものとして問題となっているが、アポトーシスとは異なる自殺機構をがん細胞がもっていればそのプログラムを活性化することにより効率よくがん細胞を殺傷することが期待できる。このように医学的な見地からも、今後のプログラム細胞死研究はアポトーシス以外のプログラム細胞死にも目を向けて疾患におけるその役割と制御機構の解明に力を注ぐことが肝要であると考えられる。

5. まとめ

本研究では神経芽腫の自然退縮に関わるプログラム細胞死の性質ならびにその制御因子について検討を行った。その結果、神経芽腫の予後良好因子である Ras の発現部位に一致して腫瘍組織内 (in vivo) で non-apoptotic な細胞死 (autophagic degeneration) が起きていることを見いだした。また in vitro の実験において Ras の発現が神経芽腫細胞に autophagic degeneration の特徴を示す non-apoptotic な細胞死を誘導することを実証した。これらの結果は神経芽腫では Ras 蛋白質の発現が原因となって non-apoptotic なプログラム細胞死がおきていることを示すものである。また Ras の発現を伴った non-apoptotic な変性腫瘍細胞からなる領域は自然退縮を起こしやすく予後良好な神経芽腫の一群で高頻度に認められることから、このような細胞死が神経芽腫の自然退縮に貢献している可能性が強く示唆された。これまで神経芽腫の自然退縮のメカニズムはアポトーシスでは十分に説明できず長らく謎とされてきたが、今回の研究結果はそのメカニズムの理解に新たな展開をもたらすものである。さらに今回の研究結果はヒト生体内でも「アポトーシスとは異なったプログラム細胞死」が機能していることを初めて示すものであり、がんをはじめとしてプログラム細胞死の制御異常が原因となっている種々の疾患に対する理解あるいは治療法の開発において新たな視点をもたらすものと期待される。

6. 文献

- Abdellatif M, Schneider MD. An effector-like function of Ras GTPase-activating protein predominates in cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 1997;272:525-33.
- Adachi J, Ookawa K, Shiseki M, Okazaki T, Tsuchida S, Morishita K, Yokota J. Induction of apoptosis but not G1 arrest by expression of the wild-type p53 gene in small cell lung carcinoma. *Cell Growth Differ* 1996;7:879-86.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 1997;12:25-31.
- Ballas K, Lyons J, Janssen JW, Bartram CR. Incidence of *ras* gene mutations in neuroblastoma. *Eur J Pediatr* 1988;147:313-4.
- Bar-Sagi D. *ras* proteins: biological effects and biochemical targets. *Anticancer Res* 1989;9:1427-37.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121-4.
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NLT, Castel V, Castleberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, Kaneko M, Kemshead J, Lampert F, Lee REJ, Look T, Pearson ADJ, Philip T, Roald B, Sawada T, Seeger RC, Tsuchida Y,

Voute PA. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466-77.

Brodeur GM. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur J Cancer* 1995;31A:505-10.

Burchill SA, Berry PA, Lewis IJ. Activation of p21ras by nerve growth factor in neuroblastoma cells. *J Neurol Sci* 1995;133:3-10.

Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, Fujita H, Yoshida M, Chen W, Asai A, Himeno M, Yokoyama S, Kuchino Y. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* 1999;18:2281-90.

Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990;181:195-213.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.

Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 1999;6:1081-6.

Furth ME, Aldrich TH, Cordon-Cardo C. Expression of *ras* proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene* 1987;1:47-58.

Garin-Chesa P, Rettig WJ, Melamed MR, Old LJ, Niman HL. Expression of p21ras in normal and malignant human tissues: lack of association with proliferation and malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3234-8.

Geddes JF, Thom M, Robinson SF, Revesz T. Granular cell change in astrocytic tumors. *Am J Surg Pathol* 1996;20:55-63.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5547-51.

Gottschalk AR, Boise LH, Oltvai ZN, Accavitti MA, Korsmeyer SJ, Quintans J, Thompson CB. The ability of Bcl-xL and Bcl-2 to prevent apoptosis can be differentially regulated. *Cell Death Differ* 1996;3:113-8.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:2309-12.

Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Ichikawa T, Shay JW, Yokoyama T. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 1997;33:1932-6.

Hoehner JC, Olsen L, Sandstedt B, Kaplan DR, Pahlman S. Association of neurotrophin receptor expression and differentiation in human neuroblastoma. *Am J Pathol* 1995;147:102-13.

Hoehner JC, Gestblom C, Olsen L, Pahlman S. Spatial association of apoptosis-related gene expression and cellular death in clinical neuroblastoma. *Brit J Cancer* 1997;75:1185-94.

Ijiri R, Tanaka Y, Kato K, Misugi K, Nishihira H, Toyoda Y, Kigasawa H, Nishi T, Takeuchi M, Aida N, Momoi T. Clinicopathologic study of mass-screened neuroblastoma with special emphasis on untreated observed cases: a possible histologic clue to tumor regression. *Am J Surg Pathol* 2000;24:807-15.

Ikeda H, Hirato J, Akami M, Matsuyama S, Suzuki N, Takahashi A, Kuroiwa M. Bcl-2 oncoprotein expression and apoptosis in neuroblastoma. *J Pediat Surg* 1995;30:805-8.

Jellinger KA. Cell death mechanisms in neurodegeneration. *J Cell Mol Med* 2001;5:1-17.

Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* 2000;20:7268-78.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer* 1972;26:239-57.

Kitanaka C, Sugiyama A, Kanazu S, Miyagi Y, Mishima K, Asai A, Kuchino Y. s-Myc acts as a transcriptional activator and its sequence-specific DNA binding is required for induction of programmed cell death in glioma cells. *Cell Death Differ* 1995;2:123-32.

Kitanaka C., Namiki T., Noguchi K., Mochizuki T., Kagaya S., Chi S., Hayashi A., Asai A., Tsujimoto Y., Kuchino Y. Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by Bax overexpression: differential effects of Bcl-2 and Bcl-xL on Bax-induced caspase activation and apoptosis. *Oncogene* 1997;15:1763-72.

Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999;6:508-15.

Kodet R. Ultrastructural observations on neuroblastic tumors in childhood: a study of tumor cell differentiation and regression on 89 cases. *Cesk Patol* 1998;34:123-30.

Koizumi H, Wakisaka M, Nakada K, Takakuwa T, Fujioka T, Yamate N, Uchikoshi T. Demonstration of apoptosis in neuroblastoma and its relationship to tumour regression. *Virchow Arch* 1995;427:167-73.

Kouroku Y, Urase K, Fujita E, Isahara K, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Momoi MY, Momoi T. Detection of activated Caspase-3 by a cleavage site-directed antiserum during naturally occurring DRG neurons apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:780-4.

Lavenius E, Gestblom C, Johansson I, Nanberg E, Pahlman S. Transfection of *TRK-A* into human neuroblastoma cells restores their ability to differentiate in response to nerve growth factor. *Cell Growth Differ* 1995;6:727-36.

Li BQ, Kaplan D, Kung HF, Kamata T. Nerve growth factor stimulation of the Ras-guanine nucleotide exchange factor and GAP activities. *Science* 1992;256:1456-9.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-57.

Matsunaga T, Takahashi H, Ohnuma N, Tanabe M, Yoshida H, Iwai J, Shirasawa H, Shimizu B. Expression of *N-myc* and *c-src* protooncogenes correlating to the undifferentiated phenotype and prognosis of primary neuroblastomas. *Cancer Res* 1991;51:3148-52.

Moley JF, Brother MB, Wells SA, Spengler BA, Biedler JL, Brodeur GM. Low frequency of *ras* gene mutations in neuroblastomas, pheochromocytomas, and medullary thyroid cancers. *Cancer Res* 1991;51:1596-9.

Nakada K, Fujioka T, Kitagawa H, Takakuwa T, Yamate N. Expression of N-myc and ras oncogene products in neuroblastoma and their correlations with prognosis. *Jpn J Clin Oncol* 1993;23:149-55.

Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 1993;328:847-54.

Nath R, Raser KJ, McGinnis K, Nadimpalli R, Stafford D, Wang KK. Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *Neuroreport* 1996;8:249-55.

Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-42.

Nishihira H, Toyoda Y, Tanaka Y, Ijiri R, Aida N, Takeuchi M, Ohnuma K, Kigasawa H, Kato K, Nishi T. Natural course of neuroblastoma detected by mass screening: a 5-year prospective study at a single institution. *J Clin Oncol* 2000;18:3012-7.

Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res* 2000;25:1161-72.

Oue T, Fukuzawa M, Kusafuka T, Kohmoto Y, Imura K, Nagahara S, Okada A. In situ detection of DNA fragmentation and expression of bcl-2 in human neuroblastoma: relation to apoptosis and spontaneous regression. *J Pediatr Surg* 1996;31:251-7.

Papac RJ. Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms. *In Vivo* 1998;12:571-8.

Posmantur R, McGinnis K, Nadimpalli R, Gilbertsen RB, Wang KK. Characterization of CPP32-like protease activity following apoptotic challenge in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 1997;68:2328-37.

Pritchard J, Hickman JA. Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet* 1994;344:869-70.

Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973;7:253-66.

Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985;313:1111-6.

Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:463-89.

Shinoura N, Yoshida Y, Nishimura M, Muramatsu Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function. *Cancer Res* 1999;59:4119-28.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.

Tanaka T, Slamon DJ, Shimada H, Shimoda H, Fujisawa T, Ida N, Seeger RC. A significant association of Ha-ras p21 in neuroblastoma cells with patient prognosis. *Cancer* 1991;68:1296-302.

Tanaka T, Sugimoto T, Sawada T. Prognostic discrimination among neuroblastomas according to *Ha-ras/trk A* gene expression. *Cancer* 1998;83:1626-33.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.

Tonini GP, Mazzocco K, di Vinci A, Geido E, de Bernardi B, Giaretti W. Evidence of apoptosis in neuroblastoma at onset and relapse. *J Neuro-oncol* 1997;31:209-15.

Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW. Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8093-7.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.

Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* 1997;16:2985-95.

Yamamoto K, Hanada R, Kikuchi A, Ichikawa M, Aihara T, Oguma E, Moritani T, Shimanuki Y, Tanimura M, Hayashi Y. Spontaneous regression of localized neuroblastoma detected by mass screening. *J Clin Oncol* 1998;16:1265-9.

Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin RA. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis or other? *Cell Death Differ* 1995;2:87-96.

7. 謝辞

稿を終えるにあたり、脳神経外科臨床ならびに基礎研究全般にわたり幅広くご助言・ご指導いただくとともに本研究による学位申請をご許可くださいました東京大学脳神経外科教授 桐野高明先生にこの場をお借りして深く感謝申し上げます。また、国立がんセンター研究所において終始ご指導いただきました国立がんセンター研究所生物物理部部長 口野嘉幸先生そして基礎研究の手ほどきをしていただきその後も長きにわたりご指導いただきました東京大学脳神経外科講師 浅井昭雄先生に深く感謝いたします。

本研究は神奈川県立こども医療センターの田中祐吉先生、加藤啓輔先生、井尻理恵子先生、豊田恭徳先生、気賀沢寿人先生、西寿治先生、横浜市立大学の長嶋洋治先生、千葉県がんセンターの中川原章先生、国立精神・神経センターの桃井隆先生、理化学研究所の横山茂之先生、白水美香子先生の諸先生方のご協力・ご尽力によりなし得たものであり、諸先生方に厚く御礼申し上げます。

また本研究をさまざまなかたちで支えていただいた国立がんセンター研究所生物物理部のメンバーの皆様方に心より御礼申し上げます。

最後にいつも暖かく見守り応援してくれた家族に感謝します。