

博士論文

神経芽腫におけるゲノム異常の特性に関する研究

瓜生 久美子

## 目 次

要旨 .....	3
序文 .....	4
材料と方法 .....	11
検体 .....	11
SNP アレイによる網羅的なゲノムコピー数解析 .....	12
ターゲットディープシーケンス解析 .....	13
ALK 免疫染色法 .....	20
統計解析 .....	21
結果 .....	22
神経芽腫が 6 つの遺伝子学的サブグループに分けられた .....	22
グループ A (ALK 高度増幅/変異群) は 2 群に分けられた .....	26
5 歳以上の神経芽腫の遺伝子学的特徴 .....	29
中間リスク群の予後予測因子 .....	33
再発の有無での比較検討 .....	37
ALKscore とゲノム異常の関係 .....	43
考察 .....	46
結論 .....	53
引用文献 .....	54
謝辞 .....	70

## 要旨

神経芽腫は、小児がんの中では白血病、脳腫瘍について3番目に多い腫瘍であり、その臨床像は発症年齢により自然退縮するものから、治療抵抗性の難治症例まで幅広く、臨床学的、病理学的にも非常に不均一な腫瘍と考えられている。進行神経芽腫においては、同種造血幹細胞移植を用いた大量化学療法が行われた症例でさえも、5年生存率が40%程度と予後不良であり、より効果を示す治療の開発が望まれる。近年 anaplastic lymphoma kinase (*ALK*), V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma Derived Homolog (*MYCN*) 高度増幅などを筆頭にさまざまな遺伝子異常、コピー数異常などが報告されているが、特に遺伝子変異については進行神経芽腫全体の約30%にしか認めず、腫瘍発生の原因は明らかにはなっていない。また、各ゲノム異常の相関関係や臨床像との関係も明らかではなく、本研究では様々な病期の大規模検体を用いて、全体像を解析するとともに、近年神経芽腫の診断において重要性があると考えられつつある、ALK 免疫染色という病理学的手法も取り入れることで、神経芽腫におけるゲノム異常の特性を明らかにした。

## 序文

神経芽腫は神経堤細胞を起源とする細胞ががん化したものであり、体幹の交感神経節、副腎髄質に多く発生する。小児がんの中では白血病、脳腫瘍について多くみられる腫瘍である。15歳未満の小児腫瘍の8～10%を占め、7000人に1人の発生割合であり、小児の腫瘍関連死の15%を占める[1]。予後は診断時年齢1歳～5歳が不良と、年齢に強く相関すると言われており、1歳未満で発症する症例では自然退縮するものもあり、5年生存率は約90%と予後良好である[2]。従って、1歳未満と1歳以上で発症する神経芽腫は生物学的な背景が異なると考えられている[3-7]。神経芽腫の診断には神経芽腫国際病期分類（International Neuroblastoma Staging System : INSS 病期分類）（表1）[8]、国際神経芽腫病理分類（International Neuroblastoma Pathology Classification : INPC 分類）（島田分類）（表2）が非常に重要であり、予後との相関が示唆されている[9-11]。

表 1 国際神経芽腫病期分類 (INSS 病期分類)

Garrett M. Brodeur et al.: J Clin Oncol, 1993; 11(8), 1466-77 より作成

病期	定義
1	限局性腫瘍で、肉眼的に完全切除。組織学的な腫瘍残存は不問。同側のリンパ節に組織学的な転移を認めない（原発腫瘍に接し、一緒に切除されたリンパ節転移はあってもよい）。
2A	限局性腫瘍で、肉眼的に不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認めない。
2B	限局性腫瘍で、肉眼的に完全または不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節組織学的に転移を認める。対側のリンパ節に転移を認めない。
3	切除不能の片側性腫瘍で、正中線（対側椎体縁）を越えて浸潤。同側の局所リンパ節の転移を不問。または、片側発生の限局性腫瘍で対側リンパ節転移を認める。または、正中発生腫瘍で椎体縁を越えた両側浸潤（切除不能）か、両側リンパ節転移を認める。
4	いかなる原発腫瘍であるにかかわらず、遠隔リンパ節、骨、骨髓、肝、皮膚、および/または他の臓器に播種している（病期 4S は除く）。
4S	限局性腫瘍（病期 1, 2A, 2B）で、播種は皮膚、肝、および/または骨髓に限られる（1 歳未満の患者のみ）。骨髓中の腫瘍細胞は有核細胞の 10 %未満で、それ以上は病期 4 である。MIBG シンチグラフィーが行われるならば骨髓への集積は陰性。

表 2 国際神経芽腫病理組織分類

International Neuroblastoma Pathology Classification (島田分類)

---

以下の 4 グループとそれぞれの亜型分類に分ける

1. Neuroblastoma (Schwannian, stroma-poor)
  1. a. Undifferentiated (no obvious neuropil)
  2. b. Poorly differentiated (ganglionic cell < 5%)
  3. c. Differentiating (5% < ganglionic cell)
2. Ganglioneuroblastoma, Intermixed (Schwannian stroma-rich, GNB stroma-rich)  
Mature Schwannian cell > 50%  
Ganglioneuromatous tissue with scattered foci of variably differentiated neuroblastic cell nests.
3. Ganglioneuroma (stromal dominant)
  - 1.a. Maturing (scattered neuroblasts, not in nests)
  - 2.b. Mature ganglio-neuromatous tumour with a few randomly dispersed immature neuroblasts. No distinct nests of neuroblasts are found.
4. Ganglioneuroblastoma, Nodular (composite Schwannian stroma-rich stroma-poor, GNB, nodular)  
A discrete mass of stroma poor neuroblastoma trapped in mature matrix. Usually seen macroscopically and haemorrhagic. Has a sharp pushing margin or an encapsulated border.

The classification into favourable and unfavourable histology is then determined by the above morphological features and the patient's age in the case of the stroma-poor group.

Unfavourable histology group は以下のように定義する

1. 1. All undifferentiated neuroblastomas
  2. 2. All nodular ganglioneuroblastomas
  3. 3. All neuroblastomas in patients older than 5 yrs of age
  4. 4. Patients less than 1.5 yrs with high MKI neuroblastomas
  5. 5. Patients 1.5-5 yrs with poorly differentiated neuroblastoma or with high/intermediate MKI's.
- 

また、これら病期分類、病理組織分類などの臨床的因子に加え、*MYCN* 遺伝子増幅、腫瘍細胞の染色体数 (ploidy) などの分子生物学的因子を組み合わせた

米国の Children's Oncology Group (COG) リスク分類 (図 1) が治療方針決定に広く用いられている。V. castel らの報告によると INSS 分類 Stage 1, 2B, 4S については 5 年生存率は 100%、Stage 2A は 75%、Stage 3 は 73%、Stage 4 は 33% という結果であった[12]。一方 2013 年 Julie R. park らによって発表された COG リスク分類によると Low-risk の全存率が約 90%、Intermediate-risk は約 85%、High-risk が約 30%という結果であった[13]。

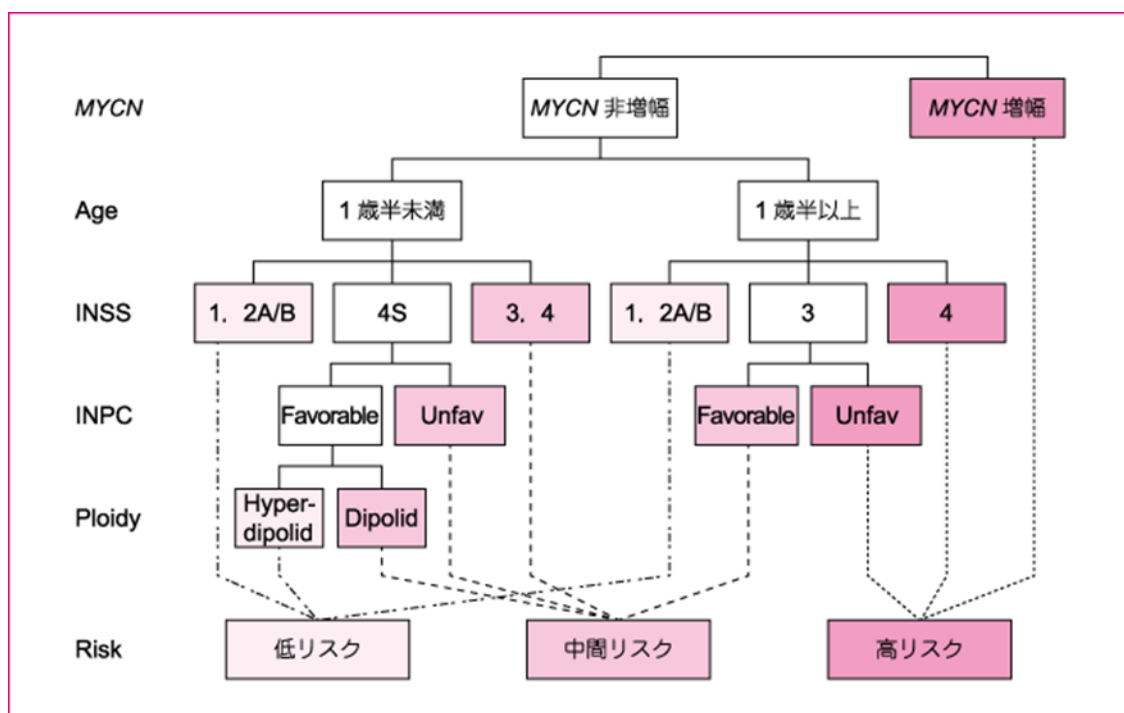


図 1 COG リスク分類フローチャート  
(日本小児血液・がん学会小児がん診療ガイドライン 2011 年版から引用)

これまでに神経芽腫に関しては、*MYCN* 高度増幅[14]、*ALK* 高度増幅/変異  
(本研究室より発表) [15-18]、Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-

Linked (*ATRX*) 異常[19, 20]、Homo sapiens AT rich interactive domain 1A/1B

(*ARID1A/1B*) 異常[21]などの遺伝子異常や、1 番染色体短腕ヘテロ接合性の欠失 (1p loss of heterozygosity : 1p LOH) [22, 23]、11 番染色体長腕 (11q) LOH [24, 25]、17q 増幅 (gain) [26, 27]、hyperdiploidy[28, 29]などの染色体数的異常など、さまざまなゲノム異常の報告がなされている。

2013 年には米国の Pugh TJ, Maris JM らが進行神経芽腫 (診断年齢 18 か月以上の INSS 病期ステージ 4) 240 症例に対して、全ゲノムシーケンスまたは、全エクソンシーケンスを行った結果が報告された[30]。その中では、*ALK* 変異 6.5% (22 例/340 例中) *ATRX* 異常 9.6% (変異 6 例, 欠失 17 例/240 例中)、Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11 (*PTPN*) 変異 2.9% (7 例/240 例中) などを筆頭に 12 遺伝子についての変異が報告されている。しかし、これらの遺伝子異常は、全 240 例中のわずか 30%程度にしか認められなかった一方で、コピー数異常が多数例の進行神経芽腫で認められた。また、一部は腫瘍含有率が高かったにも関わらず、ゲノム異常を認めない症例も存在していた。このように、進行神経芽腫 (INSS 病期分類 Stage 4) に限っても腫瘍のゲノム特性が不均一であり、INSS 病期分類 Stage 4S を含む、ステージ 3 以下においては、いまだ大規模な解析はなされておらず、神経芽腫全体の各ゲノム異常の相互関係や年齢、予後、再発などの臨床像との関係は明らかにはなっていない



い。*MYCN* 遺伝子の近傍である、染色体 2p23 に存在する *ALK* 遺伝子はインスリン受容体ファミリーに属する受容体型チロシンキナーゼで、1994 年 t (2;5) (p23;q35) 転座を有する未分化大細胞型リンパ腫において、nucleophosmin (*NPM*) との融合遺伝子として同定され[31]、その後、2007 非小細胞肺癌においても *EML4-ALK* 癒合遺伝子の存在が同定され[32]、それらのがん治療において *ALK* チロシンキナーゼ阻害剤が有効であることが示されている。神経芽腫においては、2007 年に当研究室の Takita、Chen らを始め、米国、仏国より同時に *ALK* 遺伝子の異常が神経芽腫全体の約 7%に認められることが最初に報告された。多くがミスセンス変異であり、そのうち 85%はキナーゼドメインに存在することが判明しており、とくに、コドン Phe1174 とコドン Arg1275 は変異が集中するホットスポットであることが見出されている。変異 *ALK* は自己リン酸化を受けて活性化され、下流蛋白質である AKT、ERK、STAT3 をリン酸化することで、神経芽腫細胞の増殖を促進することが判明している。現在までに、*ALK* 遺伝子異常は家族性神経芽腫や[16]、再発や予後との関連などさまざまな報告がなされており、*MYCN* 高度増幅と同様に神経芽腫に深く関連していることが推察される。また、抗 *ALK* 抗体による免疫染色法が、未分化大細胞型リンパ腫や非小細胞肺癌の診断時に用いられ[33-36]、治療方針の決定に役立っているが、神経芽腫における *ALK* 免疫染色の有用性はいまだ定かではない[37, 38]。

本研究では、全病期の大規模な検体を用いて、病理学的検討を含めた、遺伝子解析を行うことにより、神経芽腫における遺伝子背景の全体像を明らかにし、ゲノム異常と臨床像との関連を解明するために、次世代シーケンスや、SNP アレイ、免疫学的手法を用いて解析を行った。

## **材料と方法**

### **検体**

1991 年 6 月～2015 年 11 月までの間に神経芽腫と病理診断を得られた初回発症 500 症例を対象とし、生検時に得られた検体を遺伝子解析に用いた。検体の臨床情報の詳細は表 3 に示した。検体提供元の内訳は、日本神経芽腫研究グループ（Japan Neuroblastoma Study Group : JNBSG）に登録された検体 288 例、千葉県立がんセンター149 例 東京大学医学部附属病院小児科、埼玉県立小児医療センター血液腫瘍科、富山大学医学部附属病院小児科、亀田総合病院小児科などから提供していただいた計 63 例である。検体は各施設において、インフォームドコンセントを取得した上で患者から採取され、腫瘍生検後には主に、シクロフォスファミド（CPA）、ビンクリスチン（VCR）、ピラルビシン（THP-ADR）、シスプラチン（CDDP）などを用いて治療がなされた。本研究は本学の倫理委員会の承認を受けて施行された。（承認番号：1598-（10））解析症例の一部は倫理委員会承認以前に収集され、すでに亡くなられているなど、同意取得が困難な症例については厚生労働省ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針にもとづき、連結不可能匿名化を施し、研究に使用した。遺伝子解析に用いた DNA は、初発の生検時に得られた検体から各施設または、JNBSG において抽出されたものを使用した。SNP アレイには全例 DNA の原液を使用し、タ

ーゲットディープシーケンスにおいては、Qiagen 社の REPLI-g Mini Kit を用いて全ゲノムを増幅し、解析を行った。

表 3 解析に用いた症例の臨床学的特徴

項目		数 (%)
全症例数		500
INSS 病期分類	1	65 (13.0)
	2	44 (8.8)
	3	86 (17.2)
	4	283 (56.6)
	4S	22 (4.4)
性別	男性	284 (56.8)
	女性	216 (43.2)
年齢	y<1 歳 6 ヶ月	187 (37.4)
	1 歳 6 ヶ月 ≤ y<5 歳	227 (45.4)
	y ≥ 5 歳	86 (17.2)
観察期間	中央値 (範囲)	29 ヶ月 (0-60)
予後	生存	355 (71.0)
	死亡	145 (29.0)

### SNP アレイによる網羅的なゲノムコピー数解析

全 500 症例に対して SNP アレイ解析を行った。網羅的なゲノムコピー数解析には、Affymetrix 社の GeneChip®250K Nsp Array または CytoScan®HD Array

(Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いた。サンプルには凍結新鮮腫瘍より得られた増幅していない DNA を 50ng/μl の濃度に揃えたものを 250ng 使用し、メーカープロトコールに従って調整を行った。スキャンされたアレイ情報を GTYPE ソフトウェア (Affymetrix 社) によってタイピングを行い、アレイデータの解析には、CNAG (copy number analysis for Gene/Chip) / AsCNAR (allele-specific copy number analysis using anonymous references) アルゴリズムを使用した[39, 40]。本アルゴリズムを用いることにより、各腫瘍サンプルに対応した正常組織 DNA がない場合でも、コピー数の解析が可能となり、理論上は、正常組織が 70-80%混入していても鋭敏に腫瘍由来のコピー数変化を検出することができた。

### ターゲットディープシーケンス解析

ターゲットとする遺伝子については、Pugh, T.J., J.M.Maris らが 2013 年に報告した、進行神経芽腫の landscape にて統計学的に高頻度に異常が認められた遺伝子 (*ALK*, *MYCN*, *ATRX*, *PTPN11*, *NRAS*) に、RAS 経路である *HRAS*、*KRAS*、さらに神経芽腫に明らかに関与すると考えられる既報の遺伝子 (*ARID1A*, *ARID1B*, *PHOX2B*) と併せて 10 遺伝子 (*ALK*, *MYCN*, *ATRX*, *ARID1A*, *ARID1B*, *PTPN11*, *PHOX2B*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*) とした。タ

ターゲット遺伝子のコーディング領域に対するプライマーを作成し（表 4）、ディープシーケンスを行った[30]。検体数が 500 と多いため、あらかじめ濃度を揃えた 10 人前後の DNA を先に等量ずつプールし、プールしたサンプルを 1 サンプルとして PCR を行う、プールドディープシーケンスという手法を用いた（図 3）。

表 4 ターゲットディープシーケンスに使用したプライマー

Gene	Exon	Forward	Reverse
<i>ALK</i>	20	AAGCGGCCGCAGGAAGTGGCCTGTGTAGTG	AAGCGGCCGCATAACATTCAGCCCCTACAC
	21_22	AAGCGGCCGCTGACTCTGTCTCCTCTTGTC	AAGCGGCCGCTTAGAAACCTCTCCAGGTTC
	23	AAGCGGCCGCAAGATTTGCCCAGACTCAGC	AAGCGGCCGCTGTCCTTGGCACAACAACCTG
	24	AAGCGGCCGAGATTTCCTCTCTCACTG	AAGCGGCCGCATGTGAGCCCTTGAGATCTG
	25	AAGCGGCCGCTAGTGATGGCGTTGTACAC	AAGCGGCCGCCCAGGAGATGATGTAAGGGA
	26	AAGCGGCCGCGGCAGATGCTTAATGCCATC	AAGCGGCCGCCTCCCGGCTTAGAGTATAGA
	27	AAGCGGCCGCTGGGTGTGTCTATATCCATC	AAGCGGCCGCGTAACTAGCAGAAGTGTTC
	28	AAGCGGCCGCCCCTCAACGTATTCGTTGCA	AAGCGGCCGCACTCTGACTGGCTTGACCTA
<i>MYCN</i>	2	AAGCGGCCGCATTAACGAACGGGGCG	AAGCGGCCGCTGGAGGATGACGGGGTTG
<i>ATRX</i>	1	AAGCGGCCGCCAGGAAGAAATGGTATGCCCTA	AAGCGGCCGCCAACTAAGCTAAATGCTGCTTGC
	2	AAGCGGCCGCTCCCATTTAGGTAGCTGTTGC	AAGCGGCCGCACCTTGGGAAATCCCAATA
	3	AAGCGGCCGCGGTTTGGCATTATCCATCCA	AAGCGGCCGCCTGAATTTGCTGTCTCTTCA
	4	AAGCGGCCGCTTGGTTCAAAACGGTCAACA	AAGCGGCCGCAGGGGTTAAAGCTTTCCTTG
	5	AAGCGGCCGCGCTGAAACCAACCCATAAAGA	AAGCGGCCGCTGGTGTACATGTTTGTGCTGT
	6	AAGCGGCCGCCCTTGAAAAATTCTGAAATATAGCC	AAGCGGCCGCTGCTGTCTCTCTACAGAG
	7	AAGCGGCCGCAACTGACTTCTGCTGCTTTATGT	AAGCGGCCGCGGCATATGTATTATCATCCTGA
	8	AAGCGGCCGCTGACACTGTTTGAACCTGA	AAGCGGCCGCGGCTTTAAAAATACCTGTGCTCAT
	9	AAGCGGCCGCAATTTGATATGATAGAGTTGTGAGAC	AAGCGGCCGCAATCCTGCTGGGATTTTTG
	10	AAGCGGCCGCGCAATCAGAACTAGTGGCTTACAA	AAGCGGCCGCTGTGCTGCCTTCTCTTTT
	11_12	AAGCGGCCGCCGACATGACATTTTCCAAATTACTG	AAGCGGCCGCTCAGTCCTCTCCTCAGCTCGT

	13	AAGCGGCCGCGGGCTCAATAAAATAACATTTAACAC	AAGCGGCCGCGCTTCTCTACACTGCCAAAAGTG
	14	AAGCGGCCGCTGCTTTTAAGCATACCCATTTT	AAGCGGCCGCCCTGGTGTGTGCAGTGTCT
	15	AAGCGGCCGCAAAAGTTGAATGCAGCAGAAA	AAGCGGCCGCTTCTAATGCATGTGTTTTGACA
	16	AAGCGGCCGCACCACTCATTTATAAAGCATCTCA	AAGCGGCCGCCTCAGAGGACCCTGACTACCA
	17	AAGCGGCCGCCAAGGTATCCCCTAAAACCTAA	AAGCGGCCGCGGCAAGAGGGATTAAAAGATGA
	18	AAGCGGCCGCTTCCCACTGAAATATGCATCAC	AAGCGGCCGCATCTCTTCCCTGTGCCTTG
	19	AAGCGGCCGCTCTTCAGCCCCTACGACTGT	AAGCGGCCGCCATCTACTGTGGATAGCTTAGAGAAG
	20	AAGCGGCCGCGCTCATTGTGTTTGAATCACCC	AAGCGGCCGCCAATTGGATTGTGGTGTGG
	21	AAGCGGCCGCTTGCAACTAGAAATCCTGTGG	AAGCGGCCGCCACCTTTTCTGTGTGTGT
	22	AAGCGGCCGCTCAATAACCAATCCTTCCACAA	AAGCGGCCGCAACAAACCTCCCCTCAGGAT
	23	AAGCGGCCGCACAATTTCCCCGTAACAAT	AAGCGGCCGCTGAATAGCCAAACTTCTTTTCA
	24	AAGCGGCCGCCAGCTTCCCAAAGTGCTAGG	AAGCGGCCGCGCAGTAGTTGTCAACAGGCAAA
	25	AAGCGGCCGCACGCCGGGCCATATTAAG	AAGCGGCCGCGGTAAAAACATGGTTTGTAGTTG
	26	AAGCGGCCGCCCCATTTTCTGGCCTTCTT	AAGCGGCCGCGCTGGCACTTCACAAATAACC
	27_1	AAGCGGCCGCACCAAGTCCGCTTTTCTTCT	AAGCGGCCGCCATCTGATGCTGAGGAAAGTTCTG
	27_2_3	AAGCGGCCGCTTTCTGTTCATCGCTGCTTCCCTC	AAGCGGCCGCAGGAATGGATAATCAAGGGCACA
	27_4	AAGCGGCCGCCCAGAAAGCTTATCGACACCA	AAGCGGCCGCGGATAAGCGTAATTCTTCTGACAGTGC
	27_5	AAGCGGCCGCCCCGCTGAGTCTTTAAATC	AAGCGGCCGCCCCGGTGGTGAACATAAGAAATCTG
	27_6	AAGCGGCCGCCTTGTTCAAGTCCACTGCTGCCAT	AAGCGGCCGCCATCCAGATTTTCTCCAAAGAAG
	27_7	AAGCGGCCGCCAATGCAAGATGAGCCTTC	AAGCGGCCGCTTCTTTCCATAAAACCTGGA
	28	AAGCGGCCGCATGTAACAATTCCTCCAAAAAG	AAGCGGCCGCCACACCAAGTGTCTGGAGATTT
	29	AAGCGGCCGCGAAGTCTTCCAAGGGCAGATACCA	AAGCGGCCGCGCATTTGCATCTGTAAAAGGAA
	30	AAGCGGCCGCCAAAAGGCAGAAAAGTGGAG	AAGCGGCCGCTTGACACCTGGCCCTTTTAC
	31	AAGCGGCCGCTTCTTGTGAGACCACTGCTCA	AAGCGGCCGCCCATGTTTGGTCTGTTGTACATAGT
	32	AAGCGGCCGCTCAGGTGATAGATACAAAGGATTC	AAGCGGCCGCTCACTGTATTGAAGTTGCTATAGGG
	33	AAGCGGCCGCTCTCAAAGTGGAAAACAACGAA	AAGCGGCCGCGGGGTTAGTATGCAAAAGGAGA
	34	AAGCGGCCGCCCATAAATGCTTCCTTTTCTAAGC	AAGCGGCCGCCACCACACCTGGCCTAAAAAT
	35	AAGCGGCCGCTGTGCTTTGGAGGAGTAGCCAAT	AAGCGGCCGCTAAGCAACACACAGGCCTAACCCA
ARIDIA	1_1	AAGCGGCCGCCTACAGAGCCGGGAGCAG	AAGCGGCCGCCATGTTGTTGGTGGAAAGACG
	1_2	AAGCGGCCGCCCCCTGAACAATAACCTCACG	AAGCGGCCGCGCTGAGCGAAGGACGAAG
	1_3	AAGCGGCCGCACTCCTACTACCCCAACCGC	AAGCGGCCGCGAGAAGAGCCAGACAATGGC
	2	AAGCGGCCGCGGTTGGTCTCATTTGCTCTTTC	AAGCGGCCGCATTCTGTCAAGAGGCTTGG
	3	AAGCGGCCGCCTCCTAAGTATGAGGCCTTGC	AAGCGGCCGCTGCACGTTAGAGAACCACTCTG
	4	AAGCGGCCGCTTCGCAACTGGACTTTCTCTC	AAGCGGCCGCCACAAACCTATTCCCTGGGC
	5	AAGCGGCCGCTTTGCTCTTGGTTGTTAAGG	AAGCGGCCGCTGCCAGTGAAGACTAGGG
	6	AAGCGGCCGCGGGAGGTAAGTGGCCTCTC	AAGCGGCCGCCAATTGCTGCAGGGATTGTC

	7	AAGCGGCCGCAATGTAGATGGTAAAGTCCCAGG	AAGCGGCCGCCCTTCTCTCACAAAGTTACAAGC
	8	AAGCGGCCGCTTGAATGACATTGTTGGTGTTT	AAGCGGCCGCCCTGGTTTAGGTCCAGAAGC
	9_10	AAGCGGCCGCCACAGCACTATTGGCTCCAG	AAGCGGCCGCAGGCTGGGATCTTGCTACTC
	11	AAGCGGCCGCAACACTGTCCAGTCAAGAGAC	AAGCGGCCGCGGTACCACATGAAGCCAGTG
	12	AAGCGGCCGCACCTTACAGCCTGATGGGG	AAGCGGCCGCTCCTTGGCATATCCTGTTGG
	13_14	AAGCGGCCGCGAGATTCTGGGTCGTTCGTG	AAGCGGCCGCACAAGAACCCTGAGCCATT
	15_16	AAGCGGCCGCAGAGGGCCTGGGTCAAAG	AAGCGGCCGCGGAGAACTGATTGCCATAGG
	17	AAGCGGCCGCCAACGGTGAGTAAAGCCTGG	AAGCGGCCGCTGAGCTTCTTAGACTTCAACACG
	18_1	AAGCGGCCGCCCAAGCATCTGGTTGTAGCC	AAGCGGCCGCTGTGTGCAGCATTTTCATCTG
	18_2	AAGCGGCCGCCAAGGCACCATGTGGCAG	AAGCGGCCGCCCTCATCCAGAATAGTAAGGTGG
	19	AAGCGGCCGCAGTAGCTTCACTGATGGGGC	AAGCGGCCGCAAAGAGAAAGACCAAGGTGGC
	20_1	AAGCGGCCGCTCTGCCTCTCCCAACTGATAC	AAGCGGCCGCAGGCAGCAGCTCTGTCTTG
	20_2	AAGCGGCCGCAGGAGTTTGACAGTGGCCTG	AAGCGGCCGCGTGCAGCAGGATCAGCTTG
	20_3	AAGCGGCCGCGCGTCTGTGTGTCCAATACC	AAGCGGCCGCGGGTTCTTTCGGTCACTGAG
	20_4	AAGCGGCCGCGCATCCAGGACAACAATGTG	AAGCGGCCGCGGATTCTGAGGTGGTTTTGC
ARID1B	1_1	AAGCGGCCGCAACAGTGTGCACCAACCAC	AAGCGGCCGCATGGGATGTTGCTGTTGCTG
	1_2	AAGCGGCCGCCCGTCACGAACTCAAACATG	AAGCGGCCGCATGGGATGTTGCTGTTGCTG
	1_3	AAGCGGCCGCAGCAGCTAAACAGTTCCAG	AAGCGGCCGCTGTAGCCCGGATAATGGTTG
	1_4	AAGCGGCCGCTGCAGAACTCCCACGAAG	AAGCGGCCGCGGGTGACTCCTTTGTGTG
	2_1	AAGCGGCCGCTTTCTCTCTGCTTATGGTCC	AAGCGGCCGCTGAGGGTACTGCATTCC
	2_2	AAGCGGCCGCTGGTGATGAAGAGACCTCAG	AAGCGGCCGCTGCTGCCCTTCTACCAAAC
	3	AAGCGGCCGCGAATAGAAAGCAGCGTGTG	AAGCGGCCGCTCTTCTCACCTCCAACTCTC
	4	AAGCGGCCGCTGGAGTCTCCCTACATTGC	AAGCGGCCGCGACTTATCCAGGACTACAGAGC
	5_1	AAGCGGCCGCTGAAGGGCAAAGTGTATGG	AAGCGGCCGCAGATCGAGACTGGTTGCTTC
	5_2	AAGCGGCCGCGAACGGAAGCAACTTTGAGC	AAGCGGCCGCTTTAGGAACTGGGACTCTCG
	6	AAGCGGCCGCGCATTGCAGAAAGTGTGTGTC	AAGCGGCCGCAAGGAGGTGCATAGGTAAGC
	7	AAGCGGCCGCAATTCAGGGTTAGGACCAGG	AAGCGGCCGCACTGTGGGCTTGTATGAACC
	8	AAGCGGCCGCAACAGGAAGGGCTATAACG	AAGCGGCCGCCAGGAACAATGCAGCTATG
	9	AAGCGGCCGCAACCTGGAACACTTGACATG	AAGCGGCCGCCGTTTAGGCAGATTCACTGG
	10	AAGCGGCCGCTCTGCTTCACTCTGTAAC	AAGCGGCCGCTTCTTAGTGGGTCTTGCTCC
	11	AAGCGGCCGCTGCTTCTGGGATTCAACG	AAGCGGCCGCCGACTTTCACACAGGCTTAG
	12	AAGCGGCCGCACTGCTGAGTGGGAGTAATG	AAGCGGCCGCTCTCTCATCCCTTAACACTGC
	13	AAGCGGCCGCGTATAACTAGCAAGGCAGC	AAGCGGCCGCGAGTTACCTCAAACAGTAC
	14	AAGCGGCCGCGGGCAAACCTTACAGAGAG	AAGCGGCCGCGGTGTTCTGAGTGAAAGGTG
	15	AAGCGGCCGCGATCACACCACTGCATTAGC	AAGCGGCCGCTTCTCCCTGGTCTGAATAG
	16	AAGCGGCCGCGAGTCAGGGTTCAGAAATG	AAGCGGCCGCACTTCAACATCCCAGGAGTAC



	17_1	AAGCGGCCGCTCTCCTCAGTGTGTGACATG	AAGCGGCCGCTATCGTCTGTGCGGTTCATG
	17_2	AAGCGGCCGCTCAGCAGAATATGTGGGCAG	AAGCGGCCGCTTTAAGATGAGCAGGAACAGC
	18	AAGCGGCCGCCACGCTTAACTGTCTTGAG	AAGCGGCCGCGCTCATCAACTCAGGCATTAG
	19_1	AAGCGGCCGCAAGGTATTGACGGGTCTCAG	AAGCGGCCGCGAGTGCAGAAGGCCACTATTG
	19_2	AAGCGGCCGCTTGATGACGACGAGGAAGAC	AAGCGGCCGCCGATGGTACACAGAGGAGTC
	19_3	AAGCGGCCGCAAGCATCATAGCAACCATCG	AAGCGGCCGCACAGTTGGAAGGGATCTTG
	19_4	AAGCGGCCGCAAGAGGAGGATGAGGACAAG	AAGCGGCCGCCACATCATGTCTACGCTAGG
	19_5	AAGCGGCCGCTCTGTGAGAAATGTCCATG	AAGCGGCCGCTCCTACGCTGGATAAACAAAG
<i>PHOX2B</i>	1	AAGCGGCCGCCAGCCACCTTCTCCATATCC	AAGCGGCCGCGCTATATACGGGCGGAAAGG
	2	AAGCGGCCGCTCCTCACATTCTAGCTCCAG	AAGCGGCCGCGCTCACCCACACCTCCC
	3_1	AAGCGGCCGCCGAAGTAGAACTTGGGCCAC	AAGCGGCCGCAGCCCAGCCTTGTCCAG
	3_2	AAGCGGCCGCCAGGTCCAATCCCAACC	AAGCGGCCGCACAATAGCCTTGGGCCTACC
<i>PTPN11</i>	3	AAGCGGCCGCCCTTGGGTTTCTTTCAACAC	AAGCGGCCGCTCACAAGCCTTTGGAGTCAG
	13	AAGCGGCCGCCATTGCAACATGCTCAGT	AAGCGGCCGCCAGTTGTCTATCAGAGCCTG
<i>HRAS</i>	2	AAGCGGCCGCTGGGTTTGCCCTTCAGATGG	AAGCGGCCGCTAGAGGAAGCAGGAGACAGG
	3	AAGCGGCCGCATGAGAGGTACCAGGGAGAG	AAGCGGCCGCTTGATCTGCTCCCTGAGAGG
<i>KRAS</i>	2	AAGCGGCCGCTTTGTATTAAGGTACTGGTGGAG	AAGCGGCCGCTTGAAACCAAGGTACATTTC
	3	AAGCGGCCGCTGGGTATGTGGTAGCATCTC	AAGCGGCCGCTATGCATGGCATTAGCAAAG
	4	AAGCGGCCGCAGAAGGAAGGAAATTTGGTG	AAGCGGCCGCTTAAGAAGCAATGCCCTCTC
<i>NRAS</i>	2	AAGCGGCCGCAGGCCGATATTAATCCGGTG	AAGCGGCCCGGACAGGTTTTAGAACTTCAGC
	3	AAGCGGCCGCTGGGCTTGAATAGTTAGATGC	AAGCGGCCGCTGTGGTAACCTCATTCCCC

---

	Pool 11	Pool 12	Pool 13	Pool 14	Pool 15	Pool 16	Pool 17	Pool 18	Pool 19	Pool 20
Pool 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pool 2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Pool 3	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Pool 4	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Pool 5	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Pool 6	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Pool 7	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Pool 8	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Pool 9	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Pool 10	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

図 3 プールドディープシーケンス法

例として、患者 100 検体の DNA 濃度を Qbit 測定濃度で揃えて、上記表のような pool 1 から 20 までの 10 人分のプールを作成することにより、実際には 20 サンプル分の PCR を行ってシーケンス用アンプリコンを作成する。ディープシーケンスの結果、pool 6 と pool 13 に変異が検出された場合、実際には青丸で示した 53 番の検体に変異があると同定できる。この 53 番の検体を 2 度目は単体で再度ディープシーケンスを行って確認することで、変異の有無をより確実に判定できる。

また、一回目のプールドディープシーケンスで、変異を認めたサンプルについては、二回目の validation として、単独でディープシーケンスを行って確認することとした。まず、DNA を Qbit®2.0Fluorometer を用いて 25ng/μl に濃度調

整を行い、プールドシーケンスを行う検体については、等量ずつ DNA をプールしたものを使用した。上記遺伝子のコーディング領域における Not I 付きプライマーを設計し（表 4：プライマーのリスト）、PCR によりターゲット領域を増幅させ、アンプリコンを作成した。アンプリコンをサンプルごとにプールして、制限酵素で処理した後に、T4 DNA ligase（TaKaRa Bio Inc.）を用いてライゲーションを行い、CovarisE220（M&S Instruments Inc.）で 200bp に断片化し、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit（New England BioLabs® Inc.）を使用してライブラリを作成した。シーケンスは、HiSeq2000（Illumina, Inc.）および MiSeq（Illumina, Inc.）を使用して行い、sequence depth はプールドディープシーケンスでは 4000 reads 以上、validation としての単独検体によるターゲットディープシーケンス時は 1000 reads 以上確保した。得られた変異候補のうち、dbSNP131 データベース、および、京都大学小川研のデータベースである in-house SNP、1000 ゲノム計画に登録のある既知の多型、アミノ酸置換を伴わない synonymous 変異のうち、COSMIC（<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>）に登録のあるもの以外を除外し、変異アレル頻度 2%以上のものを、変異ありとした。変異解析には、京都大学腫瘍生物学小川誠司研究室と東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンター宮野悟研究室の共同開発による GENOMON（[http://genomon.hgc.jp/exome\\_original/index.html](http://genomon.hgc.jp/exome_original/index.html)）を使用した。

## ALK 免疫染色法

生検時に得られた組織をホルマリン固定パラフィン包埋したブロックをスライスし、抗 ALK モノクローナル抗体（5A4, ニチレイ, 動物種:マウス）を用いて染色した。ALK 陽性細胞の比率をもとに、スコア 4+ : ALK 陽性細胞 75%以上 ; 3+ : ALK 陽性細胞 50%以上~75%未満 ; 2+ : ALK 陽性細胞 20%以上 50%未満 ; 1+ : ALK 陽性細胞 20%未満 ; 0 : ALK 陽性細胞陰性とし、スコア 0、1+、2+を Low、3+および 4+を High と定義した[41]（図 4）。

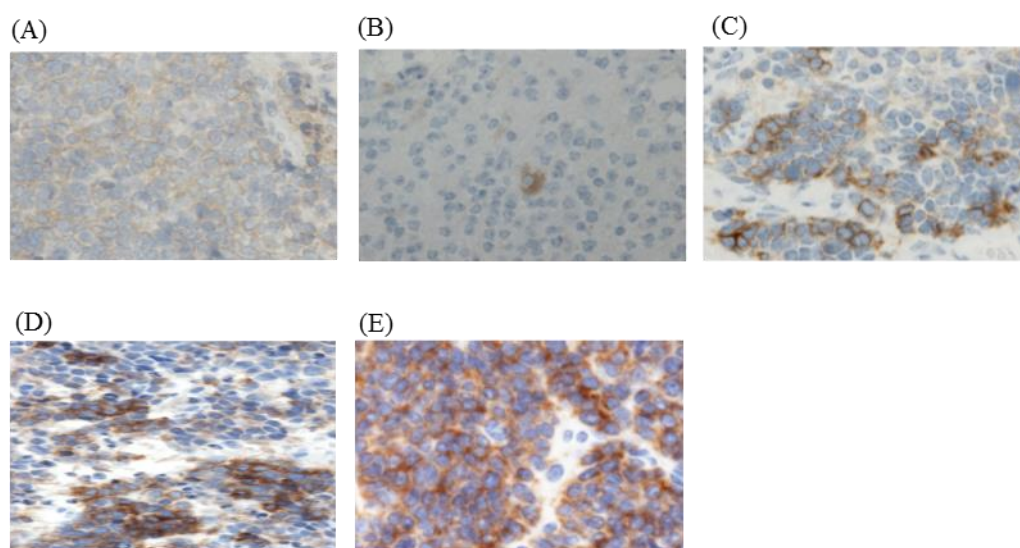


図 4 ALK 免疫染色（写真は東海大学病理診断学 中澤温子先生よりご提供頂いた）

ALK 陽性細胞の比率に応じてスコア化を行った。0、1+、2+を Low とし、3+と 4+を High と定義した。(A) ALK スコア 0 (B) ALK スコア 1+ (C) ALK スコア 2+ (D) ALK スコア 3+ (E) ALK スコア 4+

## 統計解析

統計処理には統計分析ソフト JMP (SAS Institute Inc.)、または、統計分析ソフト R を使用した。全生存曲線、無再発生存曲線については Kaplan-Meier 法を用いてプロットし、群間比較はログランク検定を用いた。また、2つのカテゴリーに分類されたデータの分析にはカイ二乗検定を行った。後述する、遺伝子異常の相互排他性の検討については、各遺伝子異常の相関関係についてフィッシャーの正確確率検定を行い、多重検定による FDR (False Discovery Rate) を調整するために、Benjamini & Hochberg 法 (BH 法) を用いた[42]。

## 結果

### 神経芽腫が 6 つの遺伝子学的サブグループに分けられた

次世代シーケンサーによるディープシーケンス、SNP アレイを用いて、INSS 病期分類 Stage 1-4, 4S の全 Stage を含めた神経芽腫全 500 症例（表 3）の解析を行った結果、得られた遺伝子学的 landscape を図に示す（図 5）。

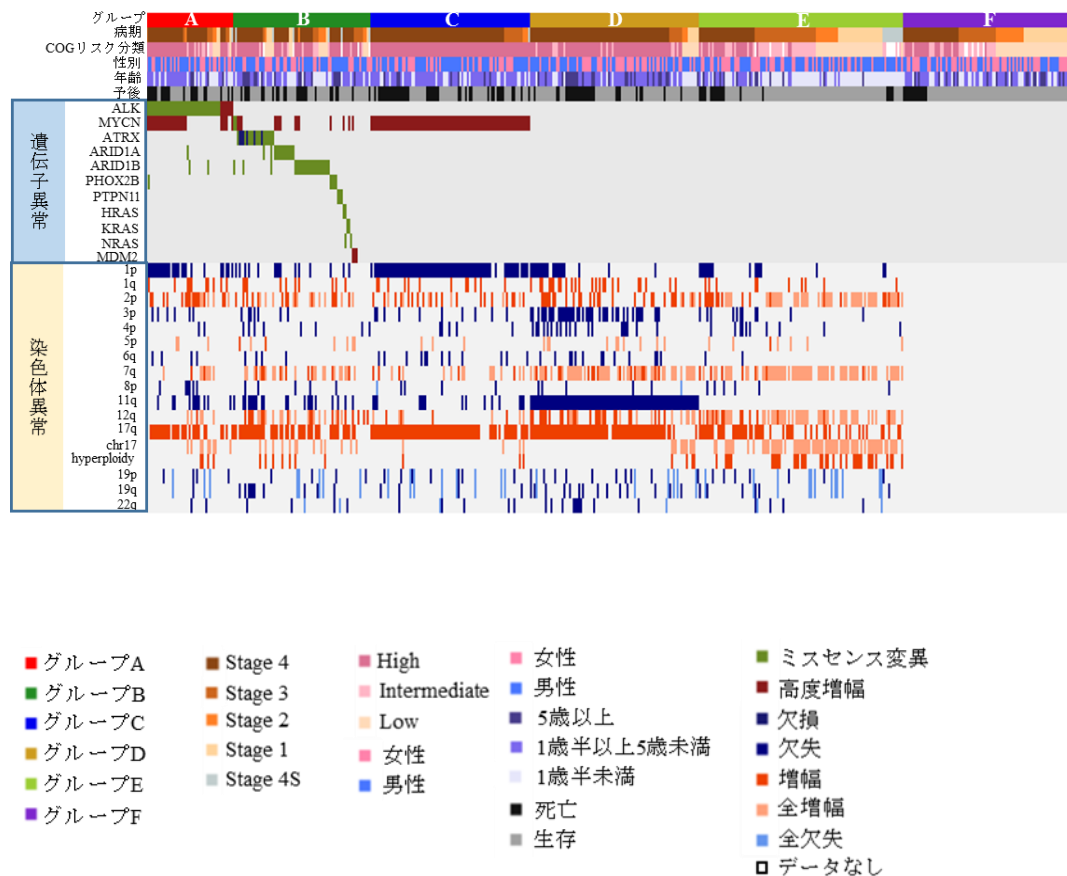


図 5 神経芽腫全 500 例における遺伝子学的 landscape

横軸に全患者 500 例を並べ、縦軸には病期、COG リスク分類、性別など始め臨床学的な情報と、次世代シーケンス解析から得られた遺伝子異常や、SNP アレイ解析から得られた染色体異常を、図示した色の通りに色付けし、遺伝学的な情報をもとに並び替えを行った。

神経芽腫における遺伝子変異で最も頻度の高い *ALK* 変異を主軸として、その他の遺伝子変異を、頻度の高い順に並び替え、続いて、コピー数異常の最も多い *MYCN* 高度増幅、11q LOH の順に並び替えた結果、神経芽腫を 6 つのサブグループに分類された。その内訳は、グループ A : *ALK* 高度増幅/変異のある群、グループ B : *ALK* 以外の遺伝子変異がある群、グループ C : *MYCN* 高度増幅群、グループ D : グループ A から C に属さず、主な異常が 11 番染色体長腕の LOH (11q LOH) である群、グループ E : 17 番染色体増幅を主な異常とする Hyperdiploidy 群、グループ F : 遺伝子変異やコピー数異常を伴わない (silent) 群となった。グループ A、B、C、D には Stage 4 の症例が多く ( $P<0.0001$ )、特にグループ A、C には死亡例が多く含まれた ( $P<0.0001$ )。グループ D の発症年齢は高く (中央値 43.0 か月[0-239])、グループ E の発症年齢は低い (中央値 7 か月[0-264]) 傾向にあった ( $P<0.0001$ ) (表 5)。

表 5 各サブグループにおける臨床学的特徴

	グループ A	グループ B	グループ C	グループ D	グループ E	グループ F	P-value
患者数 (人)	47	71	87	91	110	94	
平均年齢 [範囲](か月)	21.0 [0-163]	37.0 [0-185]	27.0 [1-132]	43.5 [0-239]	7.0 [0-264]	27.0 [0-188]	<0.0001
病期							
Stage 1,2,3, 4S	14	30	15	18	80	62	
Stage 4	33	41	72	73	30	32	<0.0001
予後 (人)							
生存	25	49	45	64	92	79	
死亡	22	22	42	27	18	15	<0.0001

5 年生存率はグループ A、B、C、D は非常に悪く、E、F は予後がよい傾向となった (P<0.0001) (図 6 (A))。従来知られている、1p LOH、3p LOH、11q LOH、17q gain などのコピー数異常に加え、頻度が高かったコピー数異常としては 6q LOH があり、その 94.3% (33/35) は COG リスク分類で高リスク群の症例に認められ、そのうち、51.5% (17/33) は死亡していた。500 例のコピー数解析で得られた主な染色体異常 (1p LOH、1q gain、2p gain、3p LOH、4p LOH、5p gain、7q gain、8p LOH、11q LOH、12q gain、17q gain、19p LOH、19q LOH、22q LOH) と、*MYCN* 高度増幅、*ALK* 高度増幅/変異、*ATRX* 異常を用いて、各因子間の相互排他性を検討したところ (図 6 (B))、これまで知られている通り、1p LOH と *MYCN* 高度増幅群、*MYCN* 高度増幅群と *ALK* 高度増幅/変異群の間には相互関係があった[22, 43-45]。また *MYCN* 高度増幅群と 11q LOH に



についてもこれまでの報告通り排他的であったが[25, 46]、11q LOH は 3p LOH、4p LOH、6q LOH 、19q LOH との間では相互関係を認めた。11q LOH の症例の中で 19q LOH を伴うものは、予後が悪くなる傾向にあった ( $P=0.0712$ )。さらに *ATRX* 変異/欠失のある症例は 19q LOH と共存しやすいことが示された。

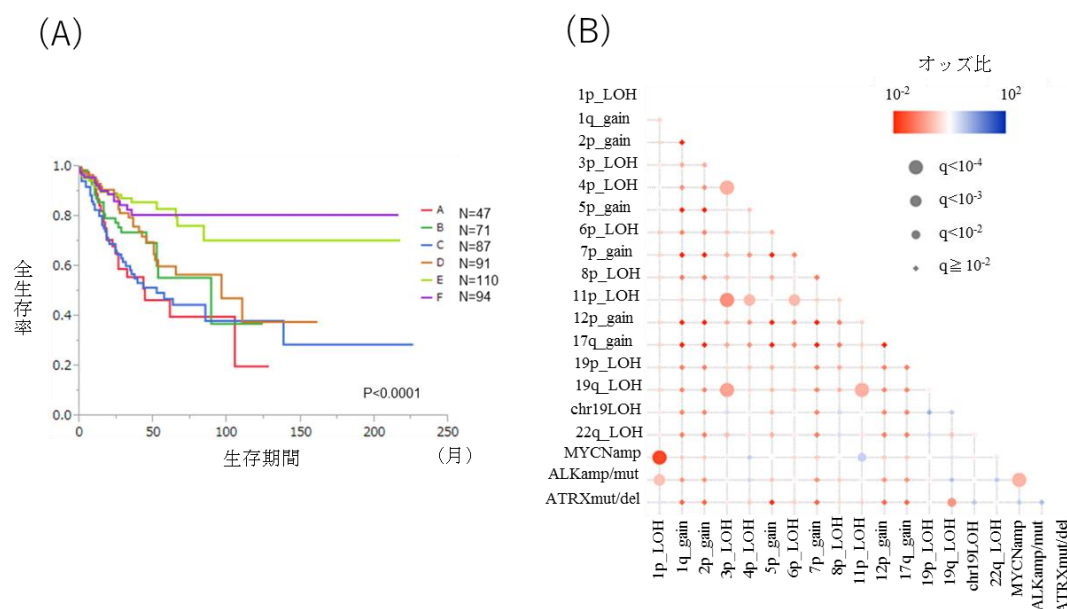


図 6 神経芽腫全 500 例における生存解析と遺伝学的解析

(A) 各サブグループにおける 5 年生存率を示した。

(B) 各ゲノム異常間の相互排他性の検討

各ゲノム異常間の相関関係をオッズ比で示し、オッズ比が小さいほど青く、オッズ比が高いほど赤く色づけしている。各因子間の P 値を Benjamini & Hochberg 法で補正を行い q 値に変換し、q 値に従いプロットする円の半径を調整した。

グループ A (*ALK* 高度増幅/変異群) は 2 群に分けられた

続いて、*ALK* 異常群であるグループ A に着目して解析をおこなった。*ALK* 異常に *MYCN* 高度増幅を伴う群グループ A1 : 40 例と、*ALK* 単独異常のグループ A2 : 47 例の 2 群に分けることができた (図 7)。グループ A1 は *MYCN* 高度増幅と 1p LOH で特徴づけられ、グループ A2 はグループ A1 に比較して Chr 2 gain、Chr 7 gain、11q LOH、Chr 12 gain、Chr 17 gain といった様々なコピー数異常を伴っていた (表 6)。

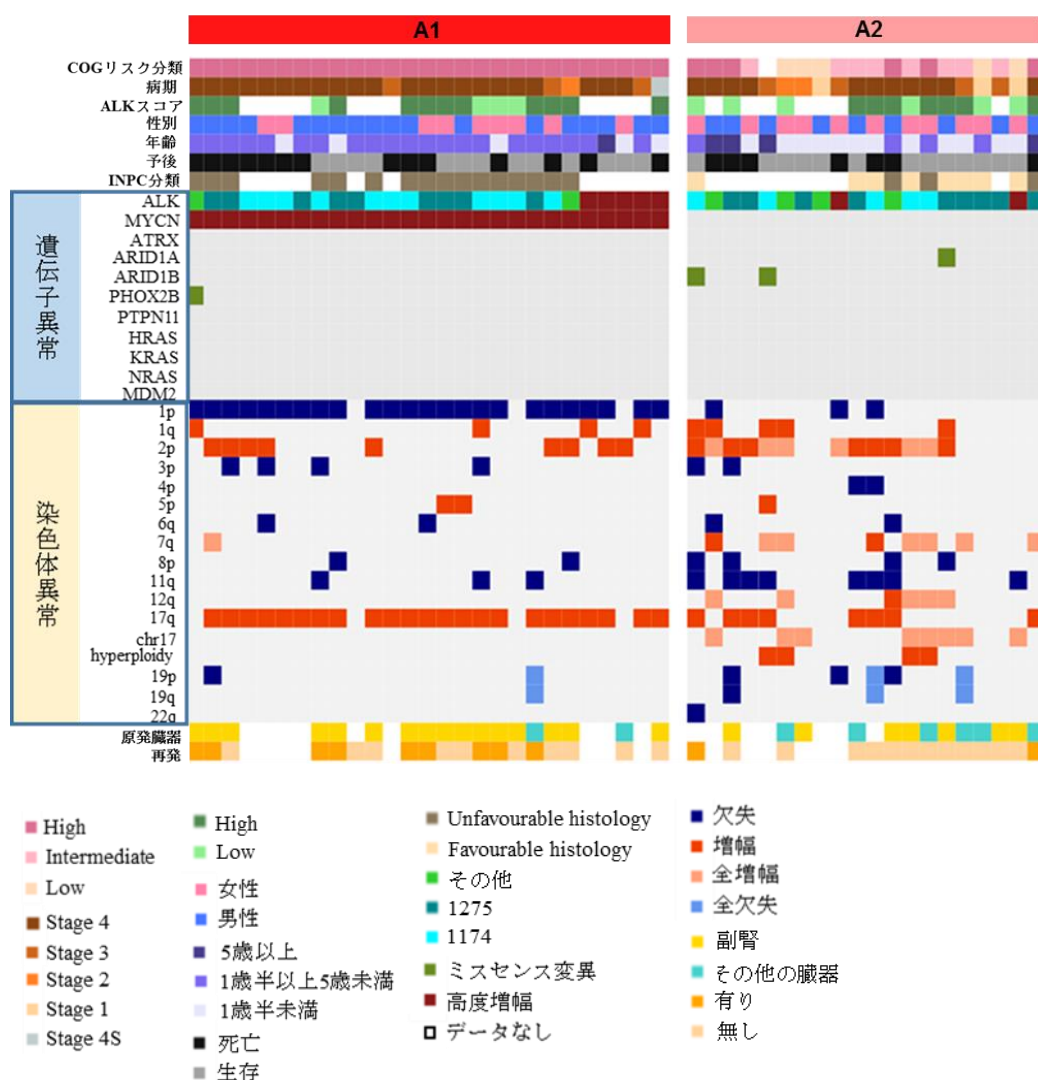


図7 グループ A の遺伝子学的特徴と臨床学的特徴

全 500 例の神経芽腫の landscape のうちグループ A のみを取り出し、MYCN 高度増幅の有無で 2 つのサブグループに分類した。原発臓器のうちその他臓器とは、交感神経節、後腹膜、縦隔などが含まれる。再発無しの症例中には、初発で寛解に至らずに、担がん状態または、原病増悪のものを含む。

原発臓器はグループ A1 では多くが副腎であり、グループ A2 では副腎以外の部位に偏っていた ( $P=0.0268$ )。(再発症例はグループ A1 に多く認めたが ( $P=0.0395$ )、この 2 グループ間では予後に差は認めなかった。 ( $P=0.5436$ )

(図 8)。

表 6

項目	グループ A1 患者数(%)	グループ A2 患者数(%)	P 値
合計 (人)	27	20	
1p LOH	24 (88.9)	3 (15.0)	<u>&lt;0.0001</u>
1q gain	4 (16.7)	5 (25.0)	0.3828
Chr2 gain	9 (33.3)	13 (65.0)	<u>0.0303</u>
2p gain	9 (33.3)	7 (35.0)	0.9052
3p LOH	4 (14.8)	2 (10.0)	0.6210
4p LOH	0 (0)	2 (10.0)	0.0600
5p gain	2 (7.4)	1 (5.0)	0.7355
6q LOH	2 (7.4)	4 (20.0)	0.2024
Chr7 gain	1 (3.7)	8 (40.0)	<u>0.0012</u>
8p LOH	2 (7.4)	4 (20.0)	0.2024
11q LOH	3 (11.1)	8 (40.0)	<u>0.0203</u>
Chr12 gain	0 (0)	6 (30.0)	<u>0.0007</u>
17q gain	23 (85.2)	8 (40.0)	<u>0.0011</u>
17 whole gain	0 (0)	8 (40.0)	<u>&lt;0.0001</u>
19p LOH	2 (7.4)	4 (20.0)	0.2024
19q LOH	0 (0)	1 (5.0)	0.1874
22q LOH	0 (0)	1 (5.0)	0.1874
再発あり	9 (47.4)	2 (14.3)	<u>0.0395</u>
原発臓器：副腎	16 (88.9)	7 (53.8)	<u>0.0268</u>

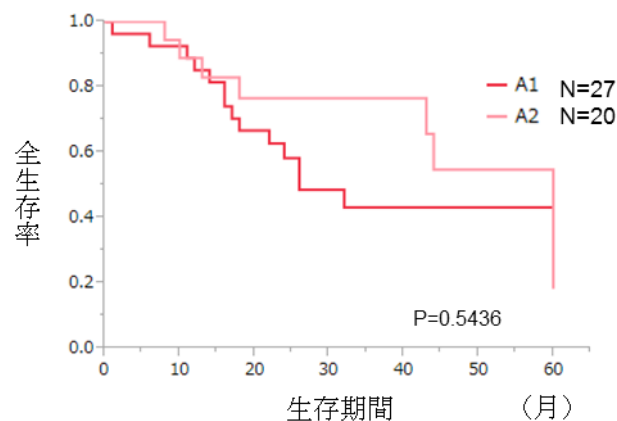


図 8 グループ A1、A2 における 5 年生存率  
赤い実線が *MYCN* 高度増幅に伴う A1、ピンクの実線が *MYCN* 高度増幅を伴わない *ALK* 単独異常の A2 を示す。

## 5 歳以上の神経芽腫の遺伝子学的特徴

神経芽腫の 90%は 5 歳までに発症すると言われているが、本研究には 5 歳以上の症例が 86 例 (17.2%) と多く含まれていた (表 3)。これまで、年長児の神経芽腫の特徴としては、*ATRX* 異常や 11q LOH を認める以外は多くは知られておらず[19, 20, 47-49]、本研究で得られた landscape を 5 歳未満と 5 歳以上の症例の 2 群に分けて比較を行った (図 9)。3p LOH ( $P=0.0039$ )、4p LOH ( $P=0.0335$ )、11q LOH ( $P=0.0011$ )、12q gain ( $P=0.0350$ )、17q gain ( $P=0.0032$ )、19p LOH ( $P=0.0017$ )、19q LOH ( $P=0.0060$ ) と、22q LOH ( $P<0.0001$ ) などの染色体の部分的な変化が 5 歳以上の症例に多く認められた (表 7)。また、19p LOH、19q LOH、22q LOH については 5 歳以上に特に優位に存在することがわかった (図 10)。

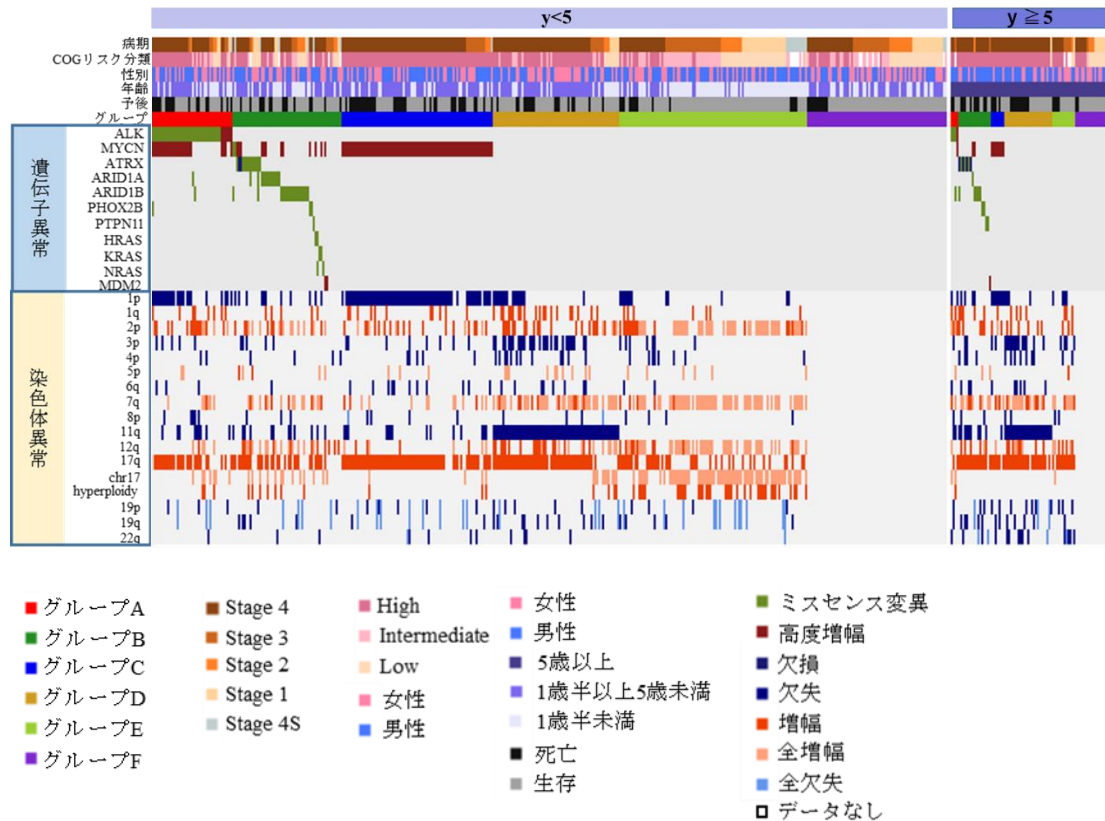


図 9 発症年齢 5 歳未満と 5 歳以上における landscape  
全 500 症例分の landscape を発症年齢で分けて示した。

一方で、5 歳以上の症例は 5 歳未満の症例に比較して予後が悪い傾向にはあるも有意差は認めなかった ( $P=0.3071$ ) (図 11 (A))。5 歳以上の症例のゲノムコピー数の全体図を作成したところ、死亡例に 8p LOH が集積しており、(図 11 (B)) 5 歳以上の症例に限っては、8p LOH を有する一群の予後が悪い結果となった ( $P=0.0313$ ) (図 11 (C))。

表 7 発症年齢 5 歳未満と 5 歳以上における遺伝子学的・臨床学的特徴

項目	5 歳未満 患者数(%)	5 歳以上 患者数(%)	P 値
合計 (人)	414	86	
1p LOH	130 (31.4)	21 (24.4)	0.1921
1q gain	50 (12.1)	16 (18.6)	0.1176
2p gain	79 (19.1)	21 (24.4)	0.2697
3p LOH	56 (13.5)	23 (26.7)	<u>0.0039</u>
4p LOH	31 (7.5)	13 (15.1)	<u>0.0335</u>
Chr5 gain	32 (7.7)	6 (7.0)	0.8086
6q LOH	25 (6.0)	10 (11.6)	0.0830
Chr7 gain	142 (34.3)	39 (45.5)	0.0551
8p LOH	22 (5.3)	7 (8.1)	0.3286
11q LOH	104 (25.1)	37 (43.0)	<u>0.0011</u>
12q gain	42 (10.1)	16 (18.6)	<u>0.0350</u>
Chr12 gain	122 (29.5)	25 (29.1)	0.9411
17q gain	218 (52.7)	60 (70.0)	<u>0.0032</u>
Chr17 gain	305 (73.7)	62 (72.1)	0.7640
19p LOH	20 (4.8)	13 (15.1)	<u>0.0017</u>
19q LOH	24 (5.8)	13 (15.1)	<u>0.0060</u>
22q LOH	12 (2.9)	19 (22.1)	<u>&lt;0.0001</u>
再発有り	66 (22.5)	8 (18.4)	0.5150
原発臓器：副腎	207 (71.9)	34 (66.7)	0.4547

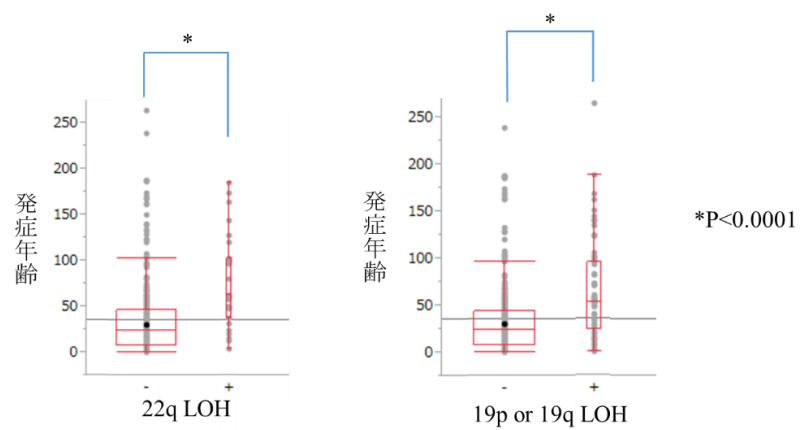


図 10 各染色体異常の有無における発症年齢の比較  
 22q LOH 異常のある群、19p LOH もしくは 19q LOH 異常のある群では、発症年齢が高い。



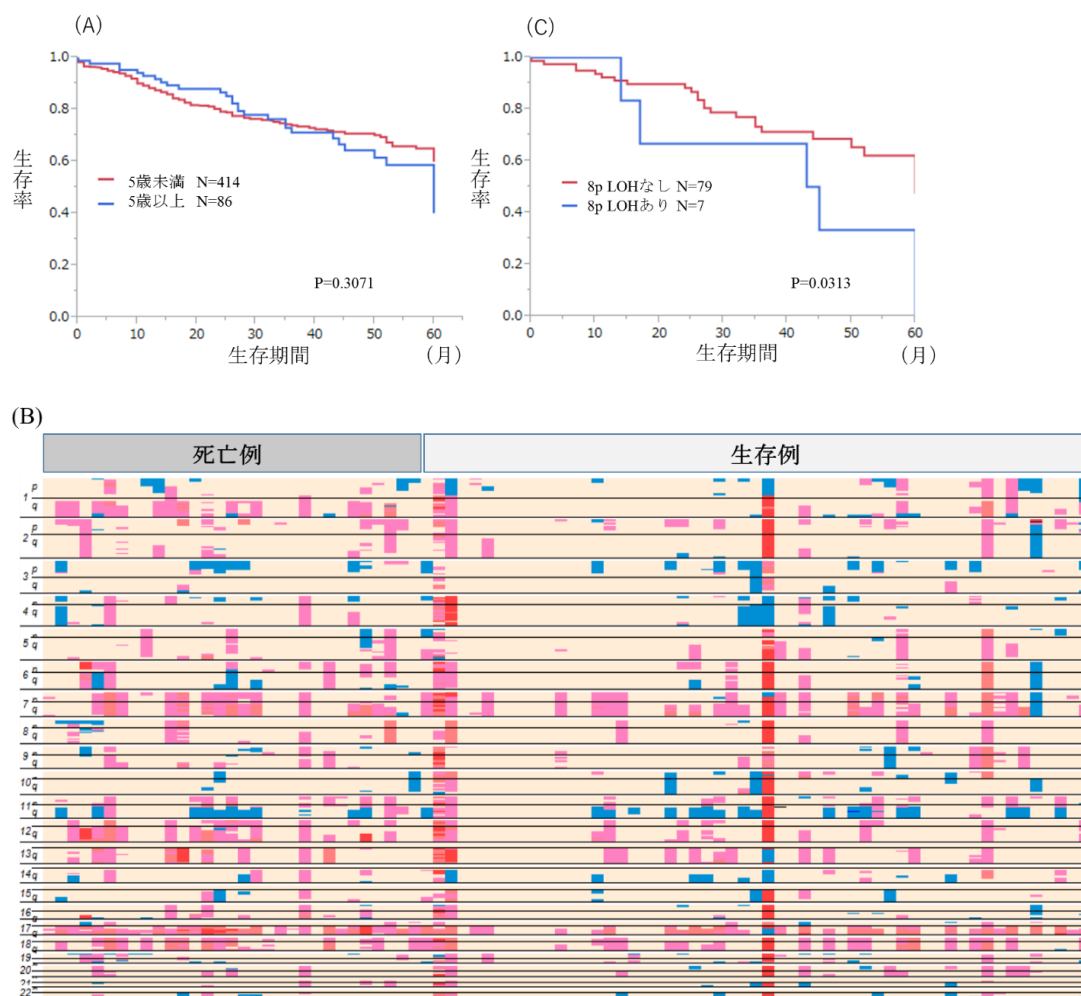


図 11 発症年齢 5 歳以上の症例における予後因子の検討

(A) 発症年齢を 5 歳で分けた場合の 5 年生存率の比較

(B) 5 歳以上の症例のコピー数異常の全体像

ピンク色は増幅、赤色は高度増幅、水色は染色体全欠損（whole deletion）、青色は部分欠損（LOH）を示す。

(C) 発症年齢 5 歳以上における 8p LOH の 5 年生存率

## 中間リスク群の予後予測因子

これまで神経芽腫の中間リスク群（INSS 病期分類 Stage 3、COG リスク分類 Intermediate）の予後についての見解は定まっておらず、それらの群に対するコンセンサスの得られた治療も定まっていない。本研究のコホートでは、INSS

病期分類ステージ3に属する症例は86例、COGリスク分類Intermediateに属する症例が97例含まれていた。LandscapeをINSS病期分類やCOGリスク分類に従って群分けして遺伝子異常や臨床学的特徴について比較検討を行った（図12、13）。

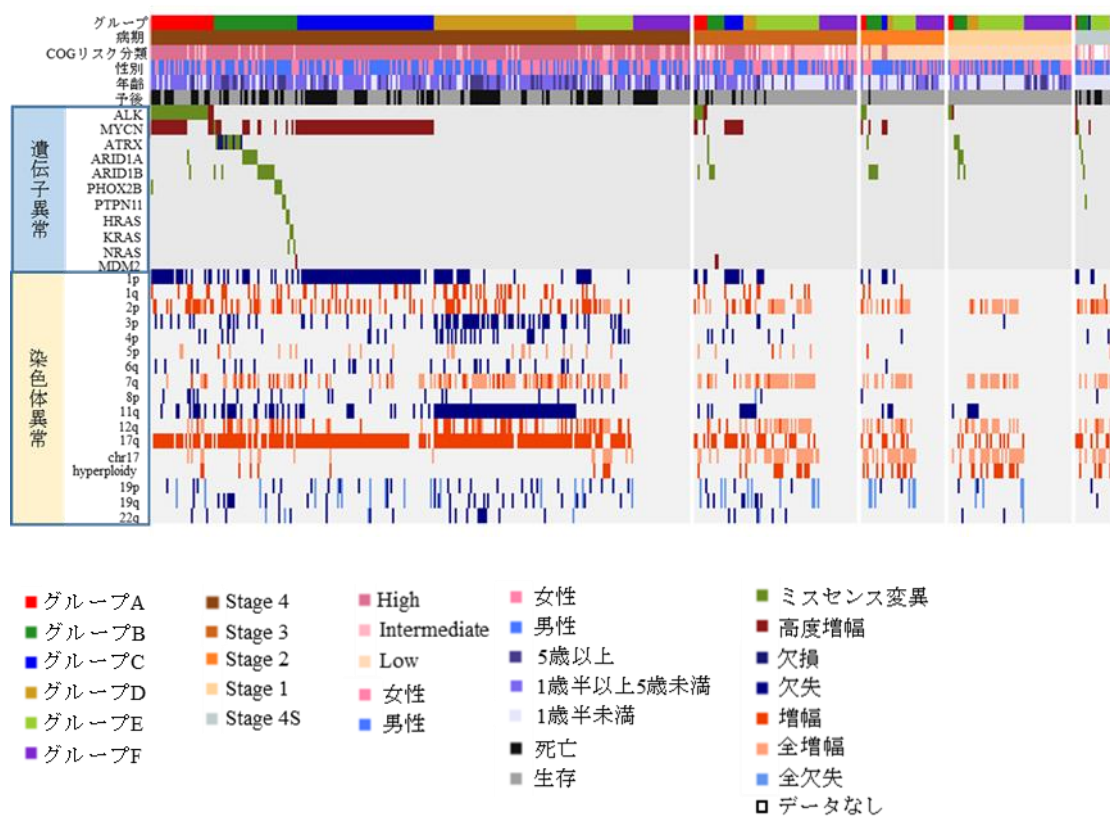


図12 INSS 分類ごとの全 500 例における遺伝子学的 landscape

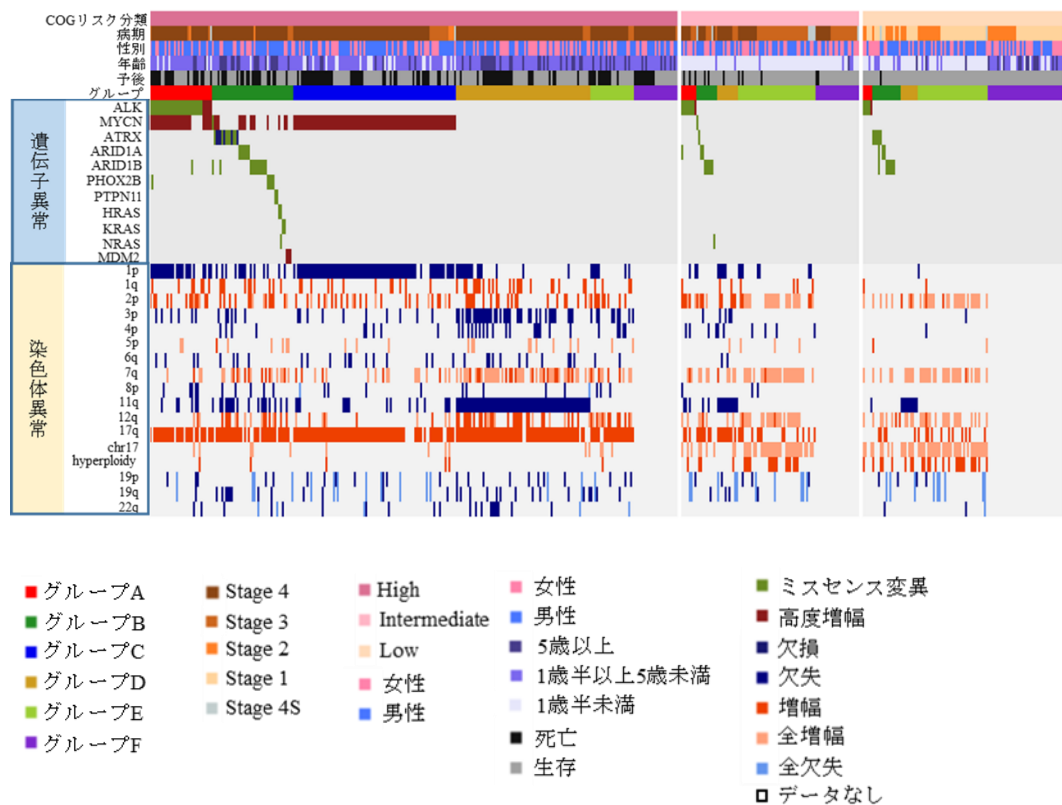


図 13 COG 分類ごとに分けた遺伝子学的 landscape  
COG 分類の得られなかった 19 例を除く全 481 例における landscape を示した。

まず、Stage 3 の 86 例において、本研究で定義した 6 つのサブグループ間での予後を検討したところ、グループ A、B、C、D いずれも予後不良であった。

(図 14 (A))。また各遺伝子異常につき予後を検討したところ、1p LOH、*MYCN* 増幅、2p gain、4p LOH、11q LOH をもつ群の予後が不良であった (図 14 (B)、(C)、(D)、(E)、(F))。

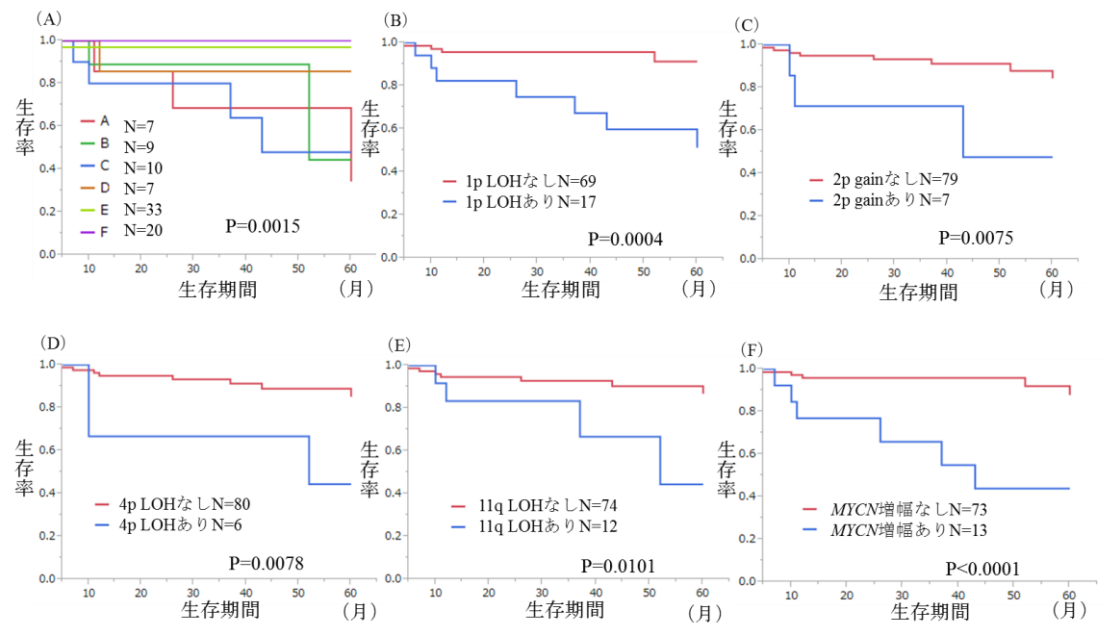


図 14 INSS 分類 Stage 3 症例における生存曲線

一方、COG リスク分類 Intermediate 群 97 例においては、有意差は認めなかったが、グループ A の予後が悪い傾向にあった。(P=0.0929) (図 15 (A)) また、Intermediate 群においても各遺伝子異常につき予後を検討したところ、ステージ 3 に類似して、1p LOH、4p LOH、11p LOH を持つ群が予後不良であった (図 15 (B)、(C)、(D))。

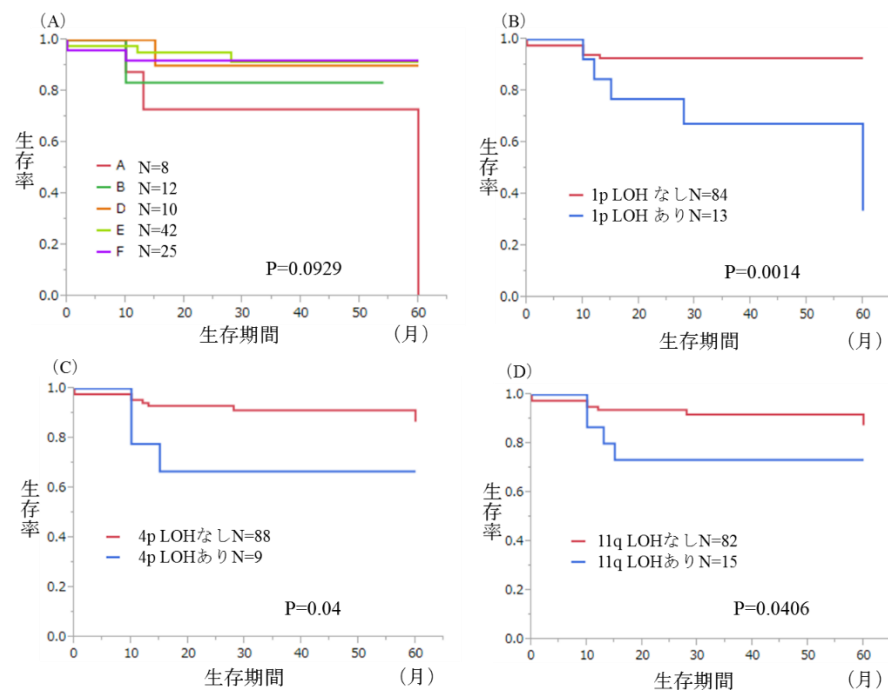


図 15 COG リスク分類 Intermediate 症例における生存曲線

## 再発の有無での比較検討

再発情報が得られたのは 343 例で、そのうち再発有りが 75 例、治療抵抗死亡例 36 例、寛解かつ生存例が 232 例あり、それらについて群分けした landscape を示す。(図 16) 再発 75 例につき、本研究で定義したサブグループごとの予後を検討したところ、グループ F の 5 年生存率は最も良かったが、有意差は認めなかった。

再発例は寛解生存例に比較して腫瘍原発部位は副腎が多く ( $P<0.0465$ )、*MYCN* 高度増幅症例 ( $P<0.0001$ )、Stage 4 症例 ( $P<0.0001$ ) 以外に、1p LOH ( $P<0.0001$ )、1q gain ( $P=0.0004$ )、3p LOH ( $P<0.0001$ )、11q LOH ( $P=0.005$ )、17q gain ( $P<0.0001$ )

といった染色体異常が多く存在し（表 8）、それら各因子はいずれも、無再発 5 年生存率で有意に予後不良であった（図 17）。

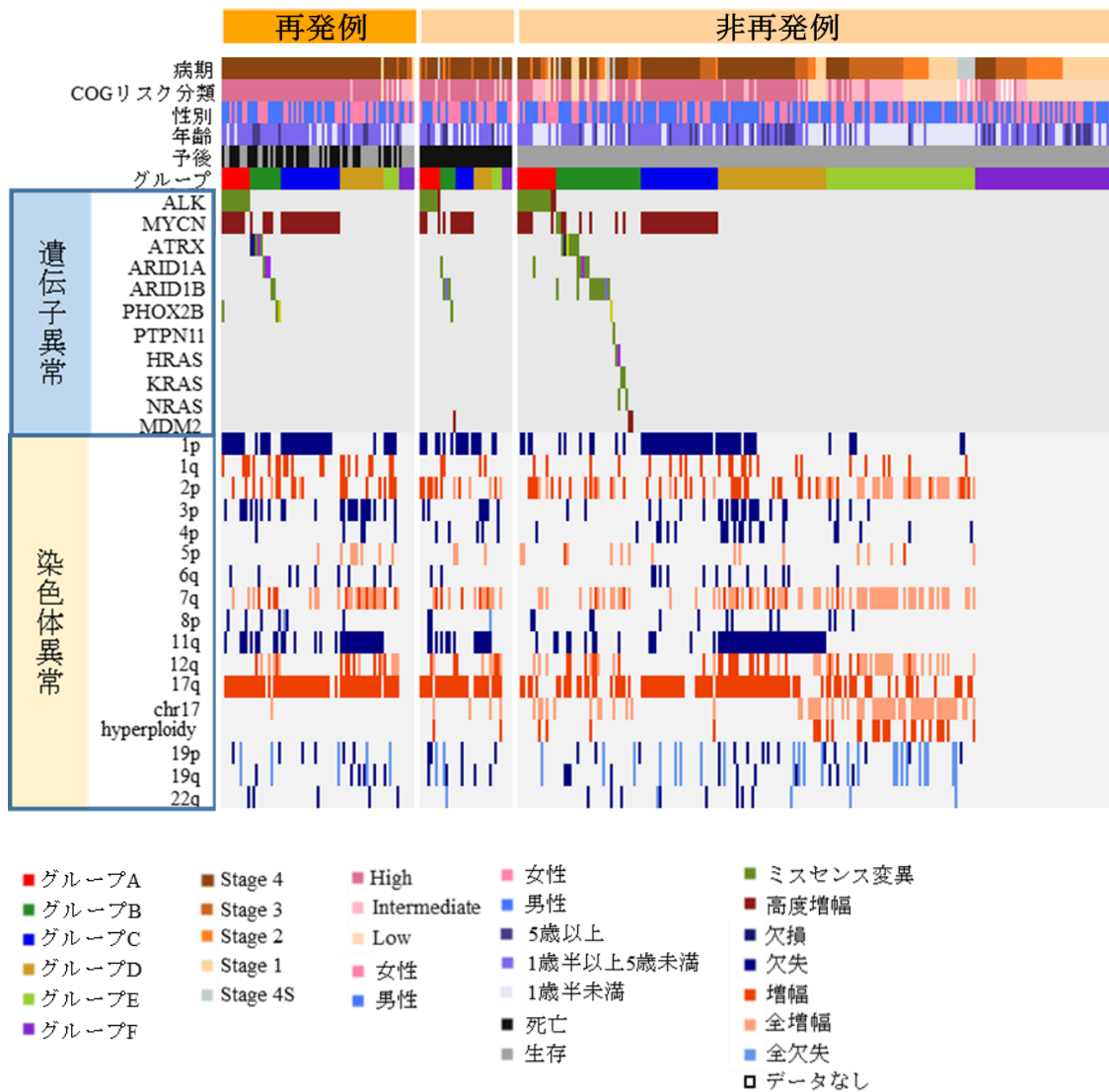


図 16 再発症例と非再発症例に分けた landscape

非再発例 268 例中のうち生存例を非再発寛解例 232 例とする。非再発例のうちの死亡例 36 症例は寛解に至らずに死亡した症例である。

表 8 再発症例と非再発寛解例におけるゲノム異常と臨床像の比較

項目	再発症例 患者数 (%)	非再発寛解例 患者数 (%)	P 値
合計 (人)	75	232	
1p LOH	39 (52.0)	58 (25.0)	<u>&lt;0.0001</u>
1q gain	21 (28.0)	24 (10.3)	<u>0.0004</u>
2p gain	20 (26.7)	41 (17.7)	0.0977
3p LOH	24 (29.3)	26 (11.2)	<u>&lt;0.0001</u>
4p LOH	5 (6.7)	21 (9.1)	0.5088
Chr5 gain	11 (14.7)	19 (8.2)	0.1148
6q LOH	9 (12.0)	12 (5.2)	0.0545
Chr7 gain	28 (37.3)	75 (32.3)	0.4274
8p LOH	7 (9.3)	14 (6.0)	0.3409
11q LOH	31 (41.3)	56 (24.1)	<u>0.0050</u>
11q LOH with 3p LOH	15 (20.0)	12 (5.2)	<u>0.0003</u>
12q gain	9 (12.0)	24 (10.3)	0.6907
Chr12 gain	18 (24.0)	60 (25.9)	0.7464
17q gain	62 (82.7)	101 (43.5)	<u>&lt;0.0001</u>
19p LOH	6 (20.0)	15 (7.1)	0.6526
19q LOH	6 (20.0)	12 (5.2)	0.3806
22q LOH	5 (5.4)	12 (5.2)	0.6296
<i>MYCN</i> amp	37 (49.3)	43 (18.5)	<u>&lt;0.0001</u>
Stage 4	60 (93.3)	95 (40.9)	<u>&lt;0.0001</u>
初発臓器：副腎	55 (73.3)	154 (66.4)	<u>0.0465</u>

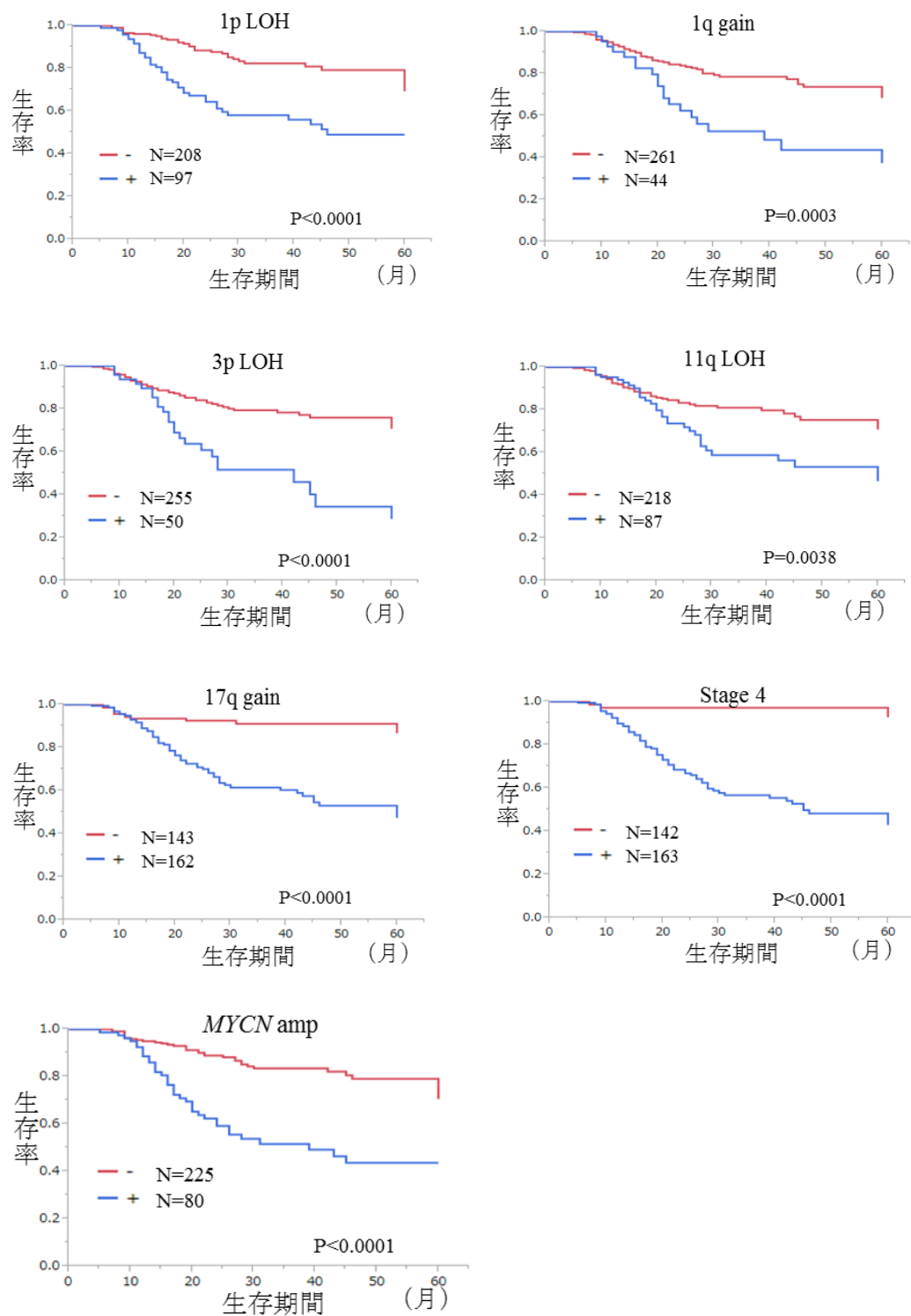


図 17 各因子における無再発生存曲線

各コピー数異常のうち、無再発生存率に影響を示したものと、Stage 4、MYCN 増幅症例における無再発生存率を示した。母集団は再発例 75 例と寛解生存例 232 例を合わせた 307 例中、再発日情報の得られなかった 2 例を除く 305 例。



また、11q LOH と 3p LOH を同時に伴う症例が再発例中 26.7% (20/75) にみられ、寛解生存症例の 7.8% (18/232) に比べて有意に多く認められた ( $P<0.0001$ )。再発症例のみ各遺伝子異常の相互排他性を検討したところ、全 500 症例での解析結果と異なり、再発群では 11q LOH は 3p LOH のみ相互性を認める結果となった (図 18 (A))。11q LOH と 3p LOH を同時に伴う症例の無再発生存率を検討したところ、有意に低かった ( $P=0.0002$ ) (図 18 (B))。ここで、これまでに、再発に関与すると考えられている、*MYCN* 高度増幅、Stage 4 と共に、多変量解析を行った。11q LOH、3p LOH、4p LOH については、全 500 例の遺伝子相互排他性の検討結果から交絡因子と考えられたため、多変量解析を行う際には、11q LOH 単独、3p LOH 単独と検討を行うこととした。なお、4p LOH 単独異常は 0 例であり、解析に用いなかった。多変量解析結果からも 3p LOH を伴う 11q LOH の症例は無再発生存率に強く関連することが示唆された (表 9)。

一方で、寛解に入らずに死亡に至った治療抵抗性の症例 36 例を、寛解症例と比較検討したところ、両群間において、発症年齢に差は認めなかったが ( $P=0.0908$ )、1p LOH ( $P=0.0195$ )、11q LOH ( $P=0.0330$ )、17q LOH ( $P<0.0001$ )、19q LOH ( $P=0.0240$ ) といった染色体異常に加え、*MYCN* 高度増幅 ( $P<0.0001$ ) および Stage 4 ( $P<0.0001$ ) 症例が治療抵抗症例中で、優位に多く存在していた。また、治療抵抗死亡例の生存期間は中央値 10 か月 (0-50 か月) で、再発死亡例

の生存期間（中央値 27 か月（9-138））と比較して診断後早期に死亡していた（ $P<0.0001$ ）。

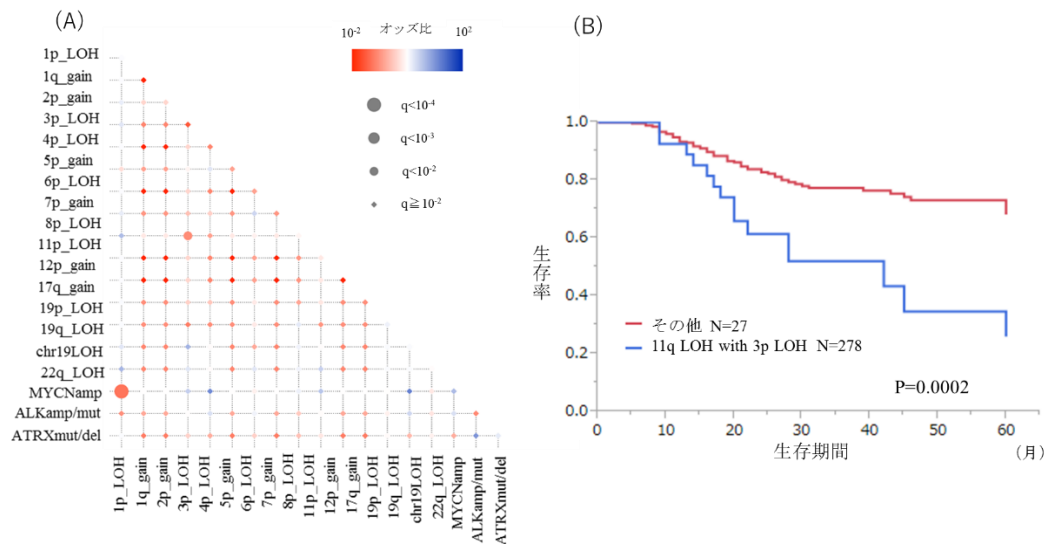


図 18 11q LOH with 3p LOH と再発の関係

(A) 再発症例 75 例における各ゲノム異常間の相互排他性を検討した。11q LOH は 3p LOH のみ相関関係を認めた。(B) 再発日情報を得られた全 305 例における 11q LOH with 3p LOH の無再発生存率への影響。

表 9 各因子の再発リスク

	No.	Odds 比	P 値	95%信頼区間
Stage 4	165	<u>8.084</u>	<u>&lt;0.0001</u>	<u>3.324-24.245</u>
1p LOH	97	0.967	0.9171	0.518-1.817
3p LOH only	12	1.787	0.3210	0.519-4.670
11q LOH only	46	1.255	0.5008	0.631-2.331
11q LOH with 3p LOH	27	<u>1.954</u>	<u>0.0481</u>	<u>1.006-3.606</u>
11q LOH with 3p and 4p LOH	5	2.616	0.0900	0.845-6.705
MYCN amplification	80	<u>2.180</u>	<u>0.0247</u>	<u>1.105-4.300</u>

## ALK スコアとゲノム異常の関係

神経芽腫 500 例のうち標本の得られた 259 例に対して ALK の免疫染色を行い、ALK 陽性細胞の割合に応じて、ALK スコア をつけたところ（前述）、ALK スコア High 群 101 例、ALK スコア Low 群 158 例となった。（図 19）

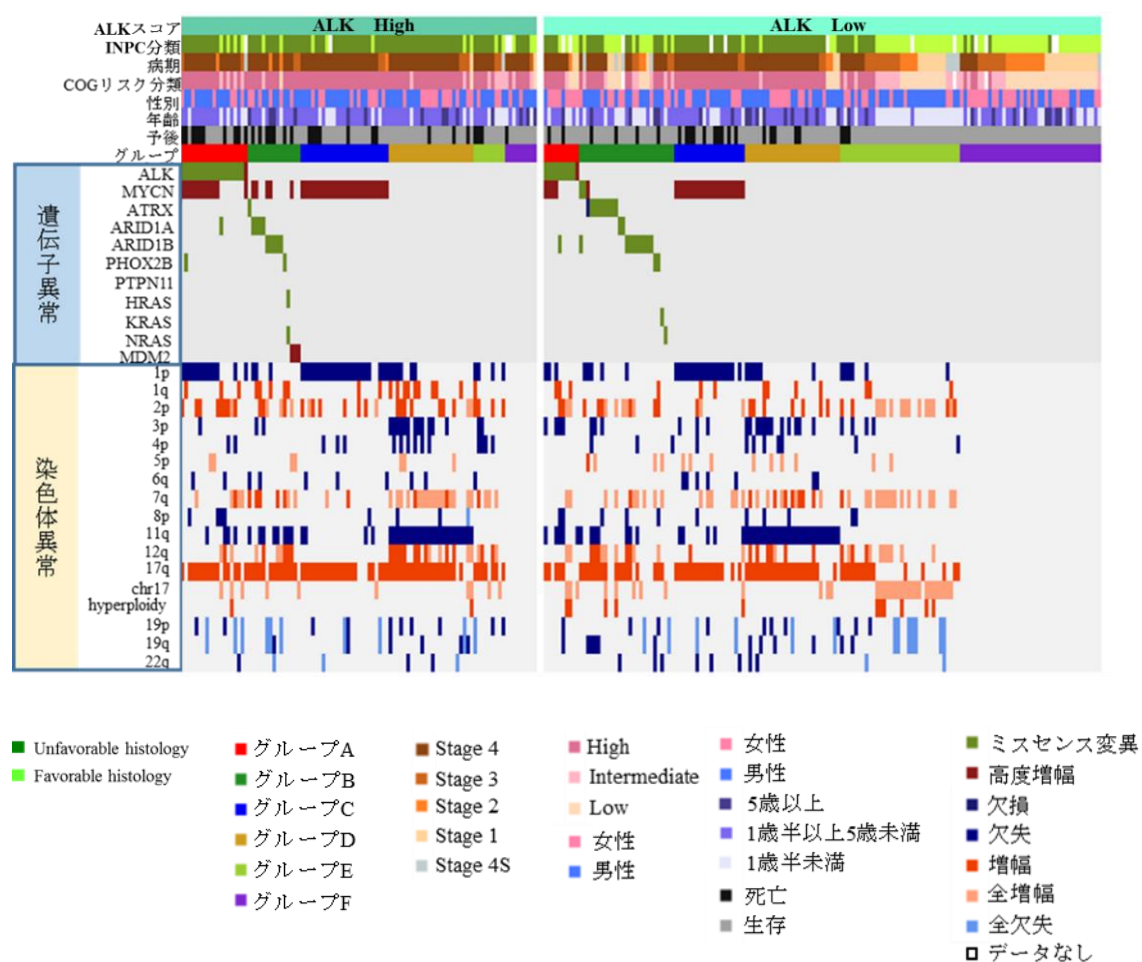


図 19 ALK スコアごとに分けた landscape

ALK スコアが高い群は腫瘍の原発臓器が副腎に多く（ $P=0.0048$ ）、INPC 分類の Unfavorable histology group 症例（ $P<0.0001$ ）、Stage 4 症例（ $P<0.0001$ ）、再発症

例 (P=0.0256)、*ALK* 高度増幅/変異症例 (P=0.0022)、*MYCN* 高度増幅症例 (P<0.0001)が多く存在していた。また、1p LOH (P<0.0001)、1q gain (P=0.0208)、2p gain (P=0.0002)、17q gain (P<0.0001)等の部分的な染色体異常も *ALK* 増幅/変異症例、*MYCN* 増幅症例と同様に *ALK* スコア High 群に多く集積していた (表 10)

表 10 *ALK* スコア間でのゲノム異常と臨床像の比較

項目	<i>ALK</i> High 患者数 (%)	<i>ALK</i> Low 患者数 (%)	P 値
合計 (人)	101	158	
1p LOH	48 (47.5)	38 (24.0)	<u>&lt;0.0001</u>
1q gain	19 (18.8)	14 (8.9)	<u>0.0208</u>
2p gain	33 (32.7)	21 (13.3)	<u>0.0002</u>
3p LOH	17 (16.8)	26 (16.5)	0.9368
4p LOH	14 (13.9)	9 (5.7)	<u>0.0264</u>
5p gain	8 (7.9)	15 (9.5)	0.6622
6q LOH	10 (9.9)	7 (4.4)	0.0877
Chr7 gain	36 (35.6)	46 (29.1)	0.2721
8p LOH	7 (6.9)	11 (7.0)	0.9923
11q LOH	40 (39.6)	44 (27.9)	<u>0.0498</u>
12q gain	17 (16.8)	15 (9.5)	0.0838
17q gain	75 (74.3)	74 (46.9)	<u>&lt;0.0001</u>
19p LOH	9 (8.9)	10 (6.3)	0.4413
19q LOH	6 (5.9)	12 (7.6)	0.6062
22q LOH	5 (5.0)	8 (5.0)	0.9676
再発あり	70 (70.7)	129 (82.7)	<u>0.0256</u>
初発臓器：副腎	75 (78.1)	95 (61.3)	<u>0.0048</u>
INPC 分類	FH:16 UH:81	FH:76 UH:71	<u>&lt;0.0001</u>
<i>MYCN</i> amp	42 (41.6)	25 (15.8)	<u>&lt;0.0001</u>
<i>ALK</i> mut/amp	19 (18.8)	10 (6.3)	<u>0.0022</u>
Stage 4	81 (80.2)	71 (44.9)	<u>&lt;0.0001</u>

ALK スコア High 群と、Low 群において 5 年生存率を比較したところ、ALK スコア High 群が有意に予後不良となった ( $p=0.0040$ ) (図 20 (A))。次に ALK スコア各 2 群において、本研究で定義したサブグループごとの予後を検討したところ (図 20 (B) (C))、ALK スコア High 群においてはグループ A が有意に予後不良となり ( $p=0.0017$ )、また、全体として予後の良い ALK スコア Low 群の中では、*MYCN* 高度増幅で特徴づけられるグループ C が予後不良という結果となった ( $p=0.0010$ )。

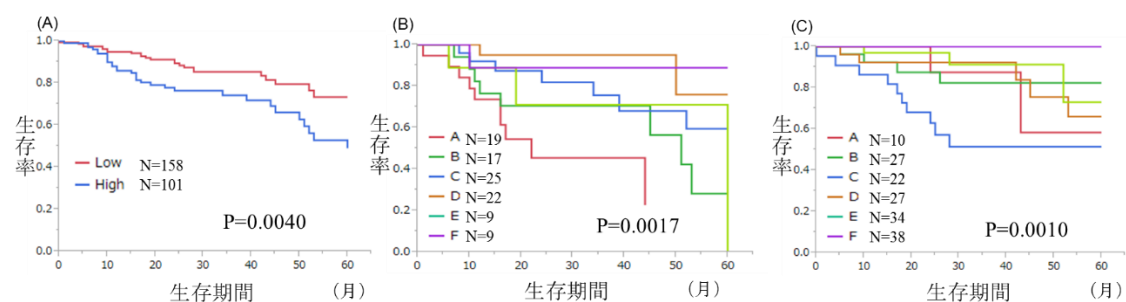


図 20 ALK スコアごとの予後解析

(A) ALK スコア間の生存曲線

(B) ALK スコア High 群における6つのサブグループ間の生存曲線

(C) ALK スコア Low 群における6つのサブグループ間の生存曲線

## 考察

神経芽腫における遺伝子学的な研究は数多くなされているが、Stage 4、乳児例、年長児例、再発例といったある基準で枠組みされたサブグループ内、または、小規模な検体数で行われているものが多い。また、次世代シーケンスによる解析も進み、神経芽腫に関わる遺伝子異常も数多く報告されつつある。本研究では Stage 1、2 といった初期のステージ症例までもも含めた全病期の神経芽腫大規模検体を解析したことで、これまでにすでに報告されていた、個々の遺伝子異常の相互排除関係性や、遺伝子異常と臨床学的特徴との関係、再発マーカーの抽出、予後予測因子を同定できたと考える。各遺伝子学的特徴を元に本研究で提示した、サブグループ A、B、C、D、E、F の 6 つのサブグループは発症年齢や予後、ステージなどの臨床学的な特徴を有しており、サブグループ分類により神経芽腫の heterogeneity と遺伝学的特性の臨床的意義がより明確になった。

神経芽腫の遺伝子学的異常の一つであり、年長児に特に多く認める 11q LOH の領域については、神経芽腫発生に関与する責任遺伝子をさまざまな方法で探索がなされてきている[50-53]。しかし、本研究の解析からすると、11q LOH というのは、単独で神経芽腫の発生に関与しているのではなく、3p LOH、4p LOH、6q LOH、19q LOH といった、その他の染色体コピー数異常と共存することで、神経芽腫の発生に関わることが推測された。そして、それらの染色体異常の組み

合わせにより、臨床学的特徴も異なることが示唆された。これまでの研究から、11q LOH は予後因子の一つとされているが、11q LOH に 19q LOH を伴う方がより予後が悪くなる傾向にあり、特に予後の悪い一群を抽出する手助けになるかもしれない。特に、75 例の再発症例の解析からは、これまでの 11q LOH を持つ群は再発しやすいことが知られており[54, 55]、予後不良因子と考えられている 3p LOH と共に[56, 57]、本コホートにおいても無再発生存率が有意に低い結果となった。ここで、全症例におけるゲノム異常の相互排他性の検討から得られた結果を元に、11q LOH に共存しやすい、各染色体異常との組み合わせを考慮して無再発生存率を検討したところ、11q LOH は単独の場合には再発率に有意差は認めず、11q LOH - 3p LOH - 4p LOH、または 11q LOH - 3p LOH といった異常を伴う群に再発例が多いことが確認された。多変量解析を行ったところ、MYCN 増幅や 1p LOH を伴う症例と同程度に、11q LOH - 3p LOH である症例が再発しやすいことが示された。近年、発がん抑制に関与する miRNA である let-7 family が神経芽腫においても 11q LOH 領域に let-7a2、3p LOH 領域に let-7g が同定され、それらが同時に欠損しやすく、予後に影響を与えることが報告された[58]。11q LOH と 3p LOH が神経芽腫の発生において一つの重要なポイントとなっていることが示唆される。

一方で、神経芽腫の 8-10%に認められる、ALK 高度増幅/変異は、MYCN 高度

増幅と共存しやすいことが本研究においても明らかとなったが、*ALK* 高度増幅/変異群（グループ A1, A2）は *MYCN* 高度増幅の有無で予後に有意差はなく、*MYCN* 高度増幅陰性症例の中においても、*ALK* 異常を伴う群は *ALK* 異常陰性群に比較して有意に予後不良であった。以上により *MYCN* 高度増幅に関わらず、*ALK* 高度増幅/変異を伴う一群は予後が悪いことが示唆された。*MYCN* 高度増幅を伴う *ALK* 高度増幅/変異群（A1）と *MYCN* 高度増幅を伴わない *ALK* 高度増幅/変異群（A2）において、本研究での解析の結果からは、臨床学的にも、遺伝学的背景にも各々に特徴があることから、*ALK* 変異陽性例における heterogeneity が明らかとなった。A1 と A2 では、セカンドドライバーが異なる経路である可能性が示唆され、それぞれの治療戦略をたてる上で有用な知見と考えられた。なお、*MYCN* 高度増幅のある症例に着目してグループ A1 とグループ C の比較検討も行ったが、両群の予後に有意差なく、その他新たな知見は得られなかった。また、全 500 症例のグルーピングについては、本研究は *ALK* の特性を明らかにすることが目的の一つであり、*MYCN* 増幅を有するグループ C を基準としてのグルーピングは行わなかったため、今後検討する余地はある。

神経芽腫における、臨床学的な特徴としては、発症年齢が 1 歳から 5 歳までが予後不良と言われている[2]。今回の解析で、5 歳未満に比較して、5 歳以上では、染色体の部分的な変化が多く認められ、5 歳で神経芽腫の腫瘍の性質が大き



く変わっていることが推測された。その中でも、19q LOH、22q LOH が 5 歳以上に特徴的であることが示され、これらの領域にある遺伝子の解析が、5 歳以上の神経芽腫の発生の解明につながる可能性がある。また、5 歳以上の神経芽腫の中では、8p LOH を伴う症例は有意に予後が悪く、年長児の予後予測に役立つと考えられる。

神経芽腫の治療戦略をたてるうえで病期決定は非常に重要である。これまでの既存の分類としては INSS 病期分類や、COG リスク分類、島田分類がある。これらの分類のうち、INSS の Stage 3 や COG リスク分類の Intermediate 群は中間リスク群という位置づけにあるが、それらの中にも死亡例は存在し、治療戦略にはまだ課題が残されている。既存の病期分類と、本研究において提唱した遺伝学的特徴を元にした 6 つのサブグループを組み合わせることにより、中間リスク群から予後不良群や予後良好群を抽出できたことは、今後、神経芽腫における治療方針の決定の一助となるであろう。本研究では、既存の病理組織学的分類以外に、ALK の免疫学的手法を取り入れたことで、より細分化された予後予測も行え、また、神経芽腫の成因を考える手助けになったと考える。ALK 免疫染色スコアの得られた 259 例を、遺伝学的な 6 つのサブグループと比較検討したことで、病理学的所見と、ALK 異常を含むその他の様々な遺伝学的背景との関連が明らかにできた。これまでと同様に ALK スコアが High の症例の予後が、悪

いことが示されたが、この High の中には、*ALK* 異常群であるグループ A 以外に、*ALK* 遺伝子とは無関係の、グループ B から F まで多数の症例が含まれていた。特に、グループ F のように、染色体の数的異常や、既知の遺伝子異常を認めていない症例においても *ALK* スコア High の症例が存在していたことは非常に興味深いことであろう。*ALK* スコア High の症例は *ALK* の存在する 2p23 を含んだ領域の 2p gain という染色体異常を多く伴っており、これが、*ALK* 蛋白の増殖に関わっていると推察される。神経芽腫において、*ALK* 遺伝子異常は 8-10% に過ぎないが、*ALK* スコア High 群、つまり、*ALK* 蛋白が異常増殖している症例は、今回の解析で 40% 近くを占めており、*ALK* 蛋白増殖に関わる機構が、神経芽腫の発生に大きな役割を担っていることが推察され、*ALK* の下流蛋白阻害剤を含めた、*ALK* 阻害剤の利用が期待される。一方、*ALK* スコア Low 群においては、グループ C が最も予後が悪い傾向にあった。*ALK* 陽性とはいえ、神経芽腫腫瘍組織における *ALK* 陽性細胞の割合は低く、既知の予後不良因子である *MYCN* の方がより強く腫瘍形成に関与し、予後に影響を与えたと推測される。また、*ALK* 変異は一般的にリン酸化 *ALK* 発現を高くすることは既知のことであるが、*ALK* 変異と *ALK* スコアとの関係は知られていない。*ALK* スコアは *ALK* 陽性細胞比率を元にスコア化しており、必ずしも、リン酸化 *ALK* の発現量には一致しておらず、神経芽腫の病勢をどの程度反映しているか、現在のところ定まっ

た知見はない。今後この ALK スコアを臨床応用するためには、ALK スコアとリン酸化 ALK 発現量の相関関係を解析する必要がある。ALK の神経芽腫発生における役割について、未だ不明な点が多く、さらなる解明に期待したい。

以前より神経芽腫は病理組織像も幅広いこと、年齢ごとにも予後の違いがあることから、ヘテロな疾患と言われて来ていたが[1]、本研究結果からも、さまざまなゲノム異常が複雑に絡み合って、それにより腫瘍としての表現型まで変化させていることが明確となった。本研究において、次世代シーケンサー、SNP アレイを用いて全病期を含めた大規模検体を網羅的に解析し、それらの相互関係と臨床像との関連を明らかにしたことで、既存の病期分類とは違った観点で、神経芽腫をグループ化できたことは、今後、治療戦略を決定する上で、役立つと考える。将来的に、次世代シーケンサーを使った遺伝子変異解析、ゲノムコピー数解析などが、今後、臨床医にも短時間で安価に検査できる見込みがあり、臨床の場においては、疾患診断時の検査として頻用されると考える。近年では、がんの診断における cell free DNA (cfDNA) の利用価値が高いと、さまざまながん種で報告されており[59-61]、神経芽腫においては、腫瘍原発部位の性状と一致するどころか、再発に関わるマイナークローンや、骨髄などの転移巣があることも cfDNA は反映し、また、heterogeneity により局所の生検部位からは検出できなかったゲノム異常も捉えることができるなど、非常に有用性が高いことが報告さ

れた。小児がん領域では、児の全身状態が不良であった場合や、がんの発生部位により容易に生検できないことも多く、今後神経芽腫においても、cfDNA が活用される時代が来るであろうと考えられる[62-66]。このように、がん診療はゲノム異常をもとに治療戦略をたてる時代となり、これまで病期、病理診断、転移の有無、年齢などを元に、治療戦略がたてられてきたが、これまでの既存の分類に、本研究で提示したような遺伝子異常を元にした6つのサブグループを組み合わせたり、ALK スコアを組み合わせることで予後予測が容易になり、診断時からより細分化された最適な治療が行えるようになるであろうと考えられる。また、大規模な神経芽腫を年齢別、再発の有無、ALK スコアとの比較などにより詳細に検討したことで、神経芽腫における新たな遺伝子学的特徴がいくつか見出され、これらの解析が、神経芽腫の全体像のさらなる解明に役立つと考える。

## 結論

本研究において、神経芽腫を、遺伝子学的特徴をもとに新たに6つのサブグループに分類でき、それらは、臨床学的特徴を有していた。また ALK score high かつグループ A の症例は予後不良であることが同定され、ゲノム解析の情報に免疫学的手法を加えたことで、より予後不良の一群を抽出できた。本研究で得られた6つの分類は既存の病期分類やリスク分類、病理学的診断と組み合わせることで治療戦略に役立つと考える。また、11q LOH は以前より再発リスク因子と考えられてきたが、3p LOH を伴うことで再発のリスクが高くなることが本研究において強く示唆された。5 歳以上の症例においては 19q LOH や 22q LOH といった神経芽腫では新たな異常が多く検出され、8p LOH は予後不良因子となることが示された。本研究は神経芽腫の病態の更なる解明に貢献し、かつ、今後はゲノム異常をもとに、治療が細分化されるであろう神経芽腫の治療戦略に、大いに役立つと期待される。

## 引用文献

1. Maris, J.M., M.D. Hogarty, R. Bagatell, and S.L. Cohn, *Neuroblastoma*. The Lancet, 2007. **369**(9579): p. 2106-2120.
2. Smith, M.A., S.F. Altekruze, P.C. Adamson, G.H. Reaman, and N.L. Seibel, *Declining childhood and adolescent cancer mortality*. Cancer, 2014. **120**(16): p. 2497-506.
3. Lisa A. Takeuchi, M.D., M.D. YoichiHachifanda, M.D. William G. Woods, M.D. Mendel Tuchman, M.D. Bernard Lemieux, M.D. Linda Brisson, M.D. Mark Bernstein, M.D. Josee Brossard, M.D. Jean M. Leclerc, M.S. Timothy D. Byrne, M.D. TimothyJ. Triche, Ph.D., and M.D. Hiroyuki Shimada, Ph.D., *Screening for Neuroblastoma in North America*. CANCER, 1995. **76**(No.11): p. 2363-2370.
4. Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, Robison LL, Bernstein M, Weitzman S, Bunin G, Levy I, Brossard J, Dougherty G, Tuchman M, and L. B., *Screening of infants and mortality due to neuroblastoma*. N Engl J Med., 2002. **346**(14): p. 1041-6.
5. Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, Klein G, Sander J, Schwarz K, Treuner J, Zorn U, and M. J., *Neuroblastoma screening at one year of age*. N Engl J Med. , 2002. **346**(14): p. 1047-53.
6. Castleberry RP, Kun LE, Shuster JJ, Altshuler G, Smith IE, Nitschke R, Wharam

- M, McWilliams N, Joshi V, and H. FA., *Radiotherapy improves the outlook for patients older than 1 year with Pediatric Oncology Group stage C neuroblastoma.* J Clin Oncol. , 1991. **9**(5): p. 789-95.
7. West DC, Shamberger RC, Macklis RM, Kozakewich HP, Wayne AS, Kreissman SG, Korf BR, Lavally B, and G. HE., *Stage III neuroblastoma over 1 year of age at diagnosis: improved survival with intensive multimodality therapy including multiple alkylating agents.* J Clin Oncol., 1993. **11**(1): p. 84-90.
  8. Brodeur, G.M., J. Pritchard, F. Berthold, N.L. Carlsen, V. Castel, R.P. Castleberry, B. De Bernardi, A.E. Evans, M. Favrot, and F. Hedborg, *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment.* J Clin Oncol, 1993. **11**(8): p. 1466-77.
  9. Shimada, H., I.M. Ambros, L.P. Dehner, J. Hata, V.V. Joshi, B. Roald, D.O. Stram, R.B. Gerbing, J.N. Lukens, K.K. Matthay, and R.P. Castleberry, *The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system).* Cancer, 1999. **86**(2): p. 364-72.
  10. Shimada, H., S. Umehara, Y. Monobe, Y. Hachitanda, A. Nakagawa, S. Goto, R.B. Gerbing, D.O. Stram, J.N. Lukens, and K.K. Matthay, *International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with*

*peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group.*

Cancer, 2001. **92**(9): p. 2451-61.

11. Joshi, V.V., *Peripheral neuroblastic tumors: pathologic classification based on recommendations of international neuroblastoma pathology committee (Modification of shimada classification).* Pediatr Dev Pathol, 2000. **3**(2): p. 184-99.
12. Castel, V., P. Garcia-Miguel, A. Canete, C. Melero, A. Navajas, J.I. Ruiz-Jimenez, S. Navarro, and M.D. Badal, *Prospective evaluation of the International Neuroblastoma Staging System (INSS) and the International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) in a multicentre setting.* Eur J Cancer, 1999. **35**(4): p. 606-11.
13. Park, J.R., R. Bagatell, W.B. London, J.M. Maris, S.L. Cohn, K.K. Mattay, and M. Hogarty, *Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma.* Pediatr Blood Cancer, 2013. **60**(6): p. 985-93.
14. Nakagawara, A., K. Ikeda, T. Tsuda, and K. Higashi, *N-myc oncogene amplification and prognostic factors of neuroblastoma in children.* J Pediatr Surg, 1987. **22**(10): p. 895-8.
15. Chen, Y., J. Takita, Y.L. Choi, M. Kato, M. Ohira, M. Sanada, L. Wang, M. Soda,



- A. Kikuchi, T. Igarashi, A. Nakagawara, Y. Hayashi, H. Mano, and S. Ogawa, *Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 971-4.
16. Mosse, Y.P., M. Laudenslager, L. Longo, K.A. Cole, A. Wood, E.F. Attiyeh, M.J. Laquaglia, R. Sennett, J.E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N.J. Schork, G.M. Brodeur, G.P. Tonini, E. Rappaport, M. Devoto, and J.M. Maris, *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 930-5.
  17. Janoueix-Lerosey, I., D. Lequin, L. Brugieres, A. Ribeiro, L. de Pontual, V. Combaret, V. Raynal, A. Puisieux, G. Schleiermacher, G. Pierron, D. Valteau-Couanet, T. Frebourg, J. Michon, S. Lyonnet, J. Amiel, and O. Delattre, *Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 967-70.
  18. George, R.E., T. Sanda, M. Hanna, S. Frohling, W. Luther, 2nd, J. Zhang, Y. Ahn, W. Zhou, W.B. London, P. McGrady, L. Xue, S. Zozulya, V.E. Gregor, T.R. Webb, N.S. Gray, D.G. Gilliland, L. Diller, H. Greulich, S.W. Morris, M. Meyerson, and A.T. Look, *Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 975-8.

19. Molenaar, J.J., J. Koster, D.A. Zwijnenburg, P. van Sluis, L.J. Valentijn, I. van der Ploeg, M. Hamdi, J. van Nes, B.A. Westerman, J. van Arkel, M.E. Ebus, F. Haneveld, A. Lakeman, L. Schild, P. Molenaar, P. Stroecken, M.M. van Noesel, I. Ora, E.E. Santo, H.N. Caron, E.M. Westerhout, and R. Versteeg, *Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes*. Nature, 2012. **483**(7391): p. 589-93.
20. Cheung, N.K., J. Zhang, C. Lu, M. Parker, A. Bahrami, S.K. Tickoo, A. Heguy, A.S. Pappo, S. Federico, J. Dalton, I.Y. Cheung, L. Ding, R. Fulton, J. Wang, X. Chen, J. Becksfort, J. Wu, C.A. Billups, D. Ellison, E.R. Mardis, R.K. Wilson, J.R. Downing, and M.A. Dyer, *Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma*. Jama, 2012. **307**(10): p. 1062-71.
21. Sausen, M., R.J. Leary, S. Jones, J. Wu, C.P. Reynolds, X. Liu, A. Blackford, G. Parmigiani, L.A. Diaz, Jr., N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, and M.D. Hogarty, *Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma*. Nat Genet, 2013. **45**(1): p. 12-7.
22. Fong, C.T., N.C. Dracopoli, P.S. White, P.T. Merrill, R.C. Griffith, D.E. Housman, and G.M. Brodeur, *Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in*

- human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3753-7.
23. Schleiermacher, G., M. Peter, J. Michon, J.P. Hugot, P. Vielh, J.M. Zucker, H. Magdelenat, G. Thomas, and O. Delattre, *Two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **10**(4): p. 275-81.
  24. Srivatsan, E.S., K.L. Ying, and R.C. Seeger, *Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1993. **7**(1): p. 32-7.
  25. Plantaz, D., J. Vandesompele, N. Van Roy, M. Lastowska, N. Bown, V. Combaret, M.C. Favrot, O. Delattre, J. Michon, J. Benard, O. Hartmann, J.C. Nicholson, F.M. Ross, C. Brinkschmidt, G. Laureys, H. Caron, K.K. Matthay, B.G. Feuerstein, and F. Speleman, *Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification*. Int J Cancer, 2001. **91**(5): p. 680-6.
  26. Gilbert, F., M. Feder, G. Balaban, D. Brangman, D.K. Lurie, R. Podolsky, V. Rinaldt, N. Vinikoor, and J. Weisband, *Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17*. Cancer Res, 1984. **44**(11): p. 5444-9.

27. Plantaz, D., G. Mohapatra, K.K. Matthay, M. Pellarin, R.C. Seeger, and B.G. Feuerstein, *Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization*. Am J Pathol, 1997. **150**(1): p. 81-9.
28. Look , A.T., F.A. Hayes , R. Nitschke , N.B. McWilliams , and A.A. Green *Cellular DNA Content as a Predictor of Response to Chemotherapy in Infants with Unresectable Neuroblastoma*. New England Journal of Medicine, 1984. **311**(4): p. 231-235.
29. Hayashi, Y., T. Inaba, R. Hanada, and K. Yamamoto, *Chromosome findings and prognosis in 15 patients with neuroblastoma found by VMA mass screening*. J Pediatr, 1988. **112**(4): p. 567-71.
30. Pugh, T.J., O. Morozova, E.F. Attiyeh, S. Asgharzadeh, J.S. Wei, D. Auclair, S.L. Carter, K. Cibulskis, M. Hanna, A. Kiezun, J. Kim, M.S. Lawrence, L. Lichenstein, A. McKenna, C.S. Peadarallu, A.H. Ramos, E. Shefler, A. Sivachenko, C. Sougnez, C. Stewart, A. Ally, I. Birol, R. Chiu, R.D. Corbett, M. Hirst, S.D. Jackman, B. Kamoh, A.H. Khodabakshi, M. Krzywinski, A. Lo, R.A. Moore, K.L. Mungall, J. Qian, A. Tam, N. Thiessen, Y. Zhao, K.A. Cole, M. Diamond, S.J. Diskin, Y.P. Mosse, A.C. Wood, L. Ji, R. Sposto, T. Badgett, W.B. London, Y.

- Moyer, J.M. Gastier-Foster, M.A. Smith, J.M. Guidry Auvil, D.S. Gerhard, M.D. Hogarty, S.J. Jones, E.S. Lander, S.B. Gabriel, G. Getz, R.C. Seeger, J. Khan, M.A. Marra, M. Meyerson, and J.M. Maris, *The genetic landscape of high-risk neuroblastoma*. Nat Genet, 2013. **45**(3): p. 279-84.
31. Morris, S.W., M.N. Kirstein, M.B. Valentine, K.G. Dittmer, D.N. Shapiro, D.L. Saltman, and A.T. Look, *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma*. Science, 1994. **263**(5151): p. 1281-4.
32. Soda, M., Y.L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama, and H. Mano, *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 561-6.
33. Pittaluga, S., I. Wlodarska, K. Pulford, E. Campo, S.W. Morris, H. Van den Berghe, and C. De Wolf-Peeters, *The monoclonal antibody ALK1 identifies a distinct morphological subtype of anaplastic large cell lymphoma associated with 2p23/ALK rearrangements*. Am J Pathol, 1997. **151**(2): p. 343-51.
34. Pulford, K., L. Lamant, S.W. Morris, L.H. Butler, K.M. Wood, D. Stroud, G. Delsol, and D.Y. Mason, *Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and*

- nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. Blood, 1997. 89(4): p. 1394-404.*
35. Boland, J.M., S. Erdogan, G. Vasmatazis, P. Yang, L.S. Tillmans, M.R. Johnson, X. Wang, L.M. Peterson, K.C. Halling, A.M. Oliveira, M.C. Aubry, and E.S. Yi, *Anaplastic lymphoma kinase immunoreactivity correlates with ALK gene rearrangement and transcriptional up-regulation in non-small cell lung carcinomas. Hum Pathol, 2009. 40(8): p. 1152-8.*
  36. Takeuchi, K., Y.L. Choi, Y. Togashi, M. Soda, S. Hatano, K. Inamura, S. Takada, T. Ueno, Y. Yamashita, Y. Satoh, S. Okumura, K. Nakagawa, Y. Ishikawa, and H. Mano, *KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. Clin Cancer Res, 2009. 15(9): p. 3143-9.*
  37. Duijkers, F.A., J. Gaal, J.P. Meijerink, P. Admiraal, R. Pieters, R.R. de Krijger, and M.M. van Noesel, *High anaplastic lymphoma kinase immunohistochemical staining in neuroblastoma and ganglioneuroblastoma is an independent predictor of poor outcome. Am J Pathol, 2012. 180(3): p. 1223-31.*
  38. Yan, B., C.H. Kuick, M. Lim, K. Venkataraman, C. Tennakoon, E. Loh, D. Lian, M.Y. Leong, M. Lakshmanan, V. Tergaonkar, W.K. Sung, S.Y. Soh, and K.T.

- Chang, *Platform comparison for evaluation of ALK protein immunohistochemical expression, genomic copy number and hotspot mutation status in neuroblastomas*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106575.
39. Nannya, Y., M. Sanada, K. Nakazaki, N. Hosoya, L. Wang, A. Hangaishi, M. Kurokawa, S. Chiba, D.K. Bailey, G.C. Kennedy, and S. Ogawa, *A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6071-9.
  40. Yamamoto, G., Y. Nannya, M. Kato, M. Sanada, R.L. Levine, N. Kawamata, A. Hangaishi, M. Kurokawa, S. Chiba, D.G. Gilliland, H.P. Koeffler, and S. Ogawa, *Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(1): p. 114-26.
  41. Wu, Y.C., I.C. Chang, C.L. Wang, T.D. Chen, Y.T. Chen, H.P. Liu, Y. Chu, Y.T. Chiu, T.H. Wu, L.H. Chou, Y.R. Chen, and S.F. Huang, *Comparison of IHC, FISH and RT-PCR methods for detection of ALK rearrangements in 312 non-small cell lung cancer patients in Taiwan*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70839.
  42. Suzuki, H., K. Aoki, K. Chiba, Y. Sato, Y. Shiozawa, Y. Shiraishi, T. Shimamura,

- A. Niida, K. Motomura, F. Ohka, T. Yamamoto, K. Tanahashi, M. Ranjit, T. Wakabayashi, T. Yoshizato, K. Kataoka, K. Yoshida, Y. Nagata, A. Sato-Otsubo, H. Tanaka, M. Sanada, Y. Kondo, H. Nakamura, M. Mizoguchi, T. Abe, Y. Muragaki, R. Watanabe, I. Ito, S. Miyano, A. Natsume, and S. Ogawa, *Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas*. Nat Genet, 2015. **47**(5): p. 458-68.
43. Takeda, O., C. Homma, N. Maseki, M. Sakurai, N. Kanda, M. Schwab, Y. Nakamura, and Y. Kaneko, *There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **10**(1): p. 30-9.
44. De Brouwer, S., K. De Preter, C. Kumps, P. Zabrocki, M. Porcu, E.M. Westerhout, A. Lakeman, J. Vandesompele, J. Hoebeeck, T. Van Maerken, A. De Paepe, G. Laureys, J.H. Schulte, A. Schramm, C. Van Den Broecke, J. Vermeulen, N. Van Roy, K. Beiske, M. Renard, R. Noguera, O. Delattre, I. Janoueix-Lerosey, P. Kogner, T. Martinsson, A. Nakagawara, M. Ohira, H. Caron, A. Eggert, J. Cools, R. Versteeg, and F. Speleman, *Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(17): p. 4353-62.



45. Schonherr, C., K. Ruuth, S. Kamaraj, C.L. Wang, H.L. Yang, V. Combaret, A. Djos, T. Martinsson, J.G. Christensen, R.H. Palmer, and B. Hallberg, *Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells*. *Oncogene*, 2012. **31**(50): p. 5193-200.
46. Guo, C., P.S. White, M.J. Weiss, M.D. Hogarty, P.M. Thompson, D.O. Stram, R. Gerbing, K.K. Matthay, R.C. Seeger, G.M. Brodeur, and J.M. Maris, *Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas*. *Oncogene*, 1999. **18**(35): p. 4948-57.
47. Castel, V., E. Villamon, A. Canete, S. Navarro, A. Ruiz, C. Melero, A. Herrero, Y. Yanez, and R. Noguera, *Neuroblastoma in adolescents: genetic and clinical characterisation*. *Clin Transl Oncol*, 2010. **12**(1): p. 49-54.
48. Souzaki, R., T. Tajiri, R. Teshiba, Y. Kinoshita, R. Yosue, K. Kohashi, Y. Oda, and T. Taguchi, *Correlation between the number of segmental chromosome aberrations and the age at diagnosis of diploid neuroblastomas without MYCN amplification*. *J Pediatr Surg*, 2011. **46**(12): p. 2228-32.
49. Schleiermacher, G., V. Mosseri, W.B. London, J.M. Maris, G.M. Brodeur, E. Attiyeh, M. Haber, J. Khan, A. Nakagawara, F. Speleman, R. Noguera, G.P. Tonini, M. Fischer, I. Ambros, T. Monclair, K.K. Matthay, P. Ambros, S.L. Cohn, and A.D.

- Pearson, *Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project*. Br J Cancer, 2012. **107**(8): p. 1418-22.
50. Ando, K., M. Ohira, T. Ozaki, A. Nakagawa, K. Akazawa, Y. Suenaga, Y. Nakamura, T. Koda, T. Kamijo, Y. Murakami, and A. Nakagawara, *Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation*. Int J Cancer, 2008. **123**(9): p. 2087-94.
  51. Michels, E., J. Hoebeeck, K. De Preter, A. Schramm, B. Brichard, A. De Paepe, A. Eggert, G. Laureys, J. Vandesompele, and F. Speleman, *CADM1 is a strong neuroblastoma candidate gene that maps within a 3.72 Mb critical region of loss on 11q23*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 173.
  52. Santo, E.E., M.E. Ebus, J. Koster, J.H. Schulte, A. Lakeman, P. van Sluis, J. Vermeulen, D. Gisselsson, I. Ora, S. Lindner, P.G. Buckley, R.L. Stallings, J. Vandesompele, A. Eggert, H.N. Caron, R. Versteeg, and J.J. Molenaar, *Oncogenic activation of FOXR1 by 11q23 intrachromosomal deletion-fusions in neuroblastoma*. Oncogene, 2012. **31**(12): p. 1571-81.
  53. Mandriota, S.J., L.J. Valentijn, L. Lesne, D.R. Betts, D. Marino, M. Boudal-

- Khoshbeen, W.B. London, A.L. Rougemont, E.F. Attiyeh, J.M. Maris, M.D. Hogarty, J. Koster, J.J. Molenaar, R. Versteeg, M. Ansari, and F. Gummy-Pause, *Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) silencing promotes neuroblastoma progression through a MYCN independent mechanism*. *Oncotarget*, 2015. **6**(21): p. 18558-76.
54. Deyell, R.J. and E.F. Attiyeh, *Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma*. *Cancer Genet*, 2011. **204**(3): p. 113-21.
55. Attiyeh, E.F., W.B. London, Y.P. Mosse, Q. Wang, C. Winter, D. Khazi, P.W. McGrady, R.C. Seeger, A.T. Look, H. Shimada, G.M. Brodeur, S.L. Cohn, K.K. Matthay, and J.M. Maris, *Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(21): p. 2243-53.
56. Spitz, R., B. Hero, K. Ernestus, and F. Berthold, *Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(1): p. 52-8.
57. Ejekkar, K., H. Aburatani, J. Abrahamsson, P. Kogner, and T. Martinsson, *Loss of heterozygosity of 3p markers in neuroblastoma tumours implicate a tumour-suppressor locus distal to the FHIT gene*. *Br J Cancer*, 1998. **77**(11): p. 1787-91.

58. Powers, J.T., K.M. Tsanov, D.S. Pearson, F. Roels, C.S. Spina, R. Ebright, M. Seligson, Y. de Soysa, P. Cahan, J. Theissen, H.C. Tu, A. Han, K.C. Kurek, G.S. LaPier, J.K. Osborne, S.J. Ross, M. Cesana, J.J. Collins, F. Berthold, and G.Q. Daley, *Multiple mechanisms disrupt the let-7 microRNA family in neuroblastoma*. Nature, 2016. **535**(7611): p. 246-51.
59. Mandel, P. and P. Metais, *[Not Available]*. C R Seances Soc Biol Fil, 1948. **142**(3-4): p. 241-3.
60. Sorenson, G.D., D.M. Pribish, F.H. Valone, V.A. Memoli, D.J. Bzik, and S.L. Yao, *Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994. **3**(1): p. 67-71.
61. Vasioukhin, V., P. Anker, P. Maurice, J. Lyautey, C. Lederrey, and M. Stroun, *Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia*. Br J Haematol, 1994. **86**(4): p. 774-9.
62. Combaret, V., C. Bergeron, R. Noguera, I. Iacono, and A. Puisieux, *Circulating MYCN DNA predicts MYCN-amplification in neuroblastoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8919-20; author reply 8920.
63. Gotoh, T., H. Hosoi, T. Iehara, Y. Kuwahara, S. Osone, K. Tsuchiya, M. Ohira, A.

- Nakagawara, H. Kuroda, and T. Sugimoto, *Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction*. J Clin Oncol, 2005. **23**(22): p. 5205-10.
64. Combaret, V., S. Brejon, I. Iacono, G. Schleiermacher, G. Pierron, A. Ribeiro, C. Bergeron, A. Marabelle, and A. Puisieux, *Determination of 17q gain in patients with neuroblastoma by analysis of circulating DNA*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **56**(5): p. 757-61.
65. Combaret, V., I. Iacono, A. Bellini, S. Brejon, V. Bernard, A. Marabelle, C. Coze, G. Pierron, E. Lapouble, G. Schleiermacher, and J.Y. Blay, *Detection of tumor ALK status in neuroblastoma patients using peripheral blood*. Cancer Med, 2015. **4**(4): p. 540-50.
66. Chicard, M., S. Boyault, L. Colmet Daage, W. Richer, D. Gentien, G. Pierron, E. Lapouble, A. Bellini, N. Clement, I. Iacono, S. Brejon, M. Carrere, C. Reyes, T. Hocking, V. Bernard, M. Peuchmaur, N. Corradini, C. Faure-Conter, C. Coze, D. Plantaz, A.S. Defachelles, E. Thebaud, M. Gambart, F. Millot, D. Valteau-Couanet, J. Michon, A. Puisieux, O. Delattre, V. Combaret, and G. Schleiermacher, *Genomic copy number profiling using circulating free tumor DNA highlights heterogeneity in neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2016.

## 謝辞

本研究に対し、直接ご指導いただいた 東京大学小児科 滝田 順子准教授、同 岡 明教授、東京大学無菌治療部 樋渡 光輝講師、またご支援いただいた東京大学小児科 西村 力先生、同 関 正史先生、東京大学小児外科 星野 論子先生、京都大学腫瘍生物学 小川 誠司教授、同 吉田 健一先生、同 片岡 圭亮先生、同 鈴木 啓道先生、同 佐藤 悠佑先生、吉里 哲一先生、千葉県立がんセンター 大平 美紀先生、同 上條 岳彦先生、同 永瀬 浩喜先生、日本神経芽腫研究グループ 中川原 章先生、同 田尻 達郎先生、埼玉県立小児医療センター 康 勝好先生、花田 良二先生、群馬赤十字血液センター 林 泰秀院長、富山大学医学部小児科 金兼 弘和先生、亀田総合病院 上原 貴博先生、東京大学ゲノム医学センター 辻 省次教授、同 三井 純先生、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター 宮野 悟 先生、成育医療研究センター 瀧本 哲也先生、同 加藤 元博先生に深謝申し上げます。また解析面でご支援いただきましたと東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター 白石友一先生、同 千葉健一先生、同 田中 洋子先生に深謝申し上げます。最後に実験技術面で丁寧にご指導をいただいた、本研究室実験助手松村雅世氏、殷毅氏、星野直幸氏、事務手続き等でのサポートをいただいた斉藤文江氏に深謝申し上げます。