

神経芽腫群腫瘍におけるソマトスタチン受容体
サブタイプ発現に関する臨床病理学的検討

日本大学医学部病態病理学系病理学分野

渡辺 紀子

申請年 2015 年

指導教員 根本 則道

神経芽腫群腫瘍におけるソマトスタチン受容体
サブタイプ発現に関する臨床病理学的検討

日本大学医学部病態病理学系病理学分野

渡辺 紀子

申請年 2015 年

指導教員 根本 則道

目 次

論文略語集	1
要旨	2
1. 緒言	3
2. 目的	8
3. 実験 I	9
4. 実験 II	17
5. 実験 III	21
6. 考察	32
7. 結語	40
8. 謝辞	41
9. 表	42
10. 図	56
11. 引用文献	80
12. 研究業績目録	88

論文略語集

(アルファベット順)

GN ; ganglioneuroma

GNB ; ganglioneuroblastoma

INPC ; International Neuroblastoma Pathology Classification

IRS ; immunohistochemical reactive score

MKI ; mitosis-karyorrhexis-index

NB ; neuroblastoma

NET ; neuroendocrine tumor

NTs ; neuroblastic tumors

PRRT ; peptide receptor radionuclide therapy

RT-PCR ; reverse-transcriptase polymerase chain reaction

SSTR ; somatostatin receptor

TH ; tyrosine hydroxylase

要 旨

ソマトスタチン受容体 (SSTR) は様々な腫瘍に発現し、ソマトスタチンアナログ製剤が分子標的治療薬として用いられている。オクトレオチドは SSTR-1, 2, 3, 4, 5 のサブタイプ中、特に SSTR-2 に選択性が高いが、近年、複数のサブタイプに結合するソマトスタチンアナログ製剤の開発が進んでおり、その有効活用のためには SSTR 全サブタイプの検索が必要である。小児固形腫瘍で最多を占める神経芽腫 (NB) でも、SSTR-2 の発現および予後良好因子としての報告は見られるが、SSTR-2 以外のサブタイプの発現や、予後との関連を検討した報告はほとんどない。

本研究の実験 I では、神経芽腫群腫瘍 (NTs) 63 例における SSTR サブタイプの発現を免疫組織化学染色法と 37 例についてはリアルタイム RT-PCR 法を用いて検索し、国際組織分類 (INPC) を用いて組織型および予後との関連を検討した。90%以上の症例で SSTR-1 または 2 の発現を認めた。より分化した組織型、favorable histology group、生存群で SSTR-1, 2, 3, 4 は高発現の傾向で、SSTR-1, 4 の陽性例は陰性例よりも有意に全生存率が良好であった。実験 II では、NTs の発生母地とされている副腎髄質や交感神経節における SSTR サブタイプ発現を発生段階的に検索した。成熟細胞の方が未熟細胞よりも SSTR-1, 2, 3, 4 は高発現の傾向であった。実験 III では、NB で発現が報告されている様々な蛋白や転写因子の発現を検索し、SSTR 発現や予後との関連を検討した。その結果、thyrosine hydroxylase、シナプトフィジン、CD44 も発現が予後良好因子と考えられたが、SSTR との関連性が示されたのはソマトスタチンのみであった。

現在、ソマトスタチンアナログ製剤は切除不能や標準的治療抵抗性の成人神経内分泌腫瘍の治療に用いられているが、今後小児腫瘍にも広まってゆくと期待される。NTs は高率に SSTR-1, 2 を発現したことから適応例は多いと考えられる。Unfavorable histology group や死亡例では SSTR サブタイプ全般的に低発現であったが、死亡例の一部で SSTR-2 の高発現例が見られたことから、難治性の NB であっても SSTR の発現に応じて治療の適応となる可能性が示唆された。

1. 緒言

1-1 ソマトスタチンについて

ソマトスタチンは14個または28個のアミノ酸が結合したペプチドホルモンで、主に下垂体、膵ランゲルハンス島、腸管の神経内分泌細胞で産生・分泌される。その他、中枢神経、末梢神経、甲状腺などの臓器や炎症細胞、活性化した免疫細胞、腫瘍細胞からも分泌が報告されている。当初、成長ホルモン放出抑制因子として報告されたが、広く外分泌抑制および細胞増殖抑制作用を有することが明らかとなり、全身の内分泌系において抑制的な役割を担う数少ないホルモンである。

1-2 ソマトスタチン受容体について

ソマトスタチンは血中半減期が短いことから、代謝されにくく血中濃度が安定し、かつ選択的結合性の高いアナログやアンタゴニストが従来から開発されてきた(図1)。それと共に、affinity binding や autoradiography などの手法を用いてソマトスタチン受容体(SSTR)の研究が進んだ^{1),2)}。その結果、SSTRは全身組織に広く分布する他、神経内分泌腫瘍(NET)、下垂体腺腫、褐色細胞腫、パラングリオーマ、甲状腺髄様癌、乳癌、前立腺癌、腎細胞癌、神経系腫瘍など様々な腫瘍組織においても存在することが知られるようになった。

その後、分子クローニングの技術によってSSTR-1, 2, 3, 4, 5のサブタイプが同定され、5種類のサブタイプ全て7回膜貫通型受容体であり、Gタンパク質との結合を介して細胞内シグナル伝達に関わることが明らかにされた。サブタイプ全てに共通する働きとして、アデニル酸シクラーゼの抑制、タンパク質チロシンホスファターゼの活性、MAPK(mitogen-activated protein kinase)の調節が報告されている(表1)。外分泌抑制作用については、cAMP産生抑制やCaイオン流入抑制、カルシニューリンなどのタンパク質チロシンホスファターゼ活性化が関

与するとされる。細胞増殖抑制作用については、cAMP 産生抑制や Ca イオン流入抑制に加えて、EGF (epidermal growth factor) 受容体や IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) 受容体などの受容体型チロシンキナーゼの抑制、MAPK 調節による成長停止、p53 活性化によるアポトーシス誘導が関与するとされる¹⁾。サブタイプ別の作用としては、SSTR-1, 2, 4, 5 は Rb (retinoblastoma gene) や p21 を誘導して細胞周期停止をもたらす³⁾、SSTR-3 は p53 や Bcl-2 ファミリーのメンバーである Bax を活性化してアポトーシスを促進することが報告されている⁴⁾。また、下垂体からの GH、TSH の分泌は SSTR-2, 5 を介して⁵⁾、膵ランゲルハンス島からのインスリン分泌は SSTR-5、グルカゴン分泌は SSTR-2 を介して抑制されること^{6,7)}が報告されている。GH やインスリン分泌の調節には SSTR-1 の関与も報告されている^{8,9)}。正常組織や腫瘍における各サブタイプの局在については、RT-PCR 法¹⁰⁾、Western blot 法、免疫組織化学染色法¹¹⁻¹³⁾、蛍光抗体法など、様々な検索手法により検索されている。免疫組織化学染色法においては、近年、各サブタイプのモノクローナル抗体の入手が可能となり、ポリクローナル抗体に比べ特異性が高く交差反応が少ないとして、病理診断に有用性が高いと期待されている¹⁴⁾。

1-3 ソマトスタチンアナログ治療について

多数のソマトスタチンアナログ製剤およびアンタゴニスト製剤が開発されてきたが、最も汎用されているのはソマトスタチンアナログ製剤のオクトレオチドである。オクトレオチドは、20 年以上前から先端巨大症やホルモン産生腫瘍の症状改善を目的とする治療に使用されており、使用経験が長いという点で安定した治療薬である。近年更に、消化管 NET に対して過剰なホルモン分泌に起因する症状の改善および腫瘍増殖抑制効果が認められ、切除不能な NET において治療選択肢の一つとなっている¹⁵⁾。その腫瘍増殖抑制効果については、SSTR を介し

ての直接的な抗腫瘍効果だけでなく、血管新生抑制のような間接的な抗腫瘍効果がある¹⁶⁾。オクトレオチドに放射線同位体を結合させて SSTR を発現する組織に取り込ませるオクトレオスキャンも、欧米諸国では従来から腫瘍の局在診断に用いられており¹⁷⁾、更に近年では、細胞破壊効果を有す放射性同位体を結合させたソマトスタチンアナログ製剤を使って、腫瘍の局在診断と同時に治療を行う peptide receptor radionuclide therapy (PRRT)も行われている。本邦では、2011年に初めてオクトレオチド（サンドスタチン®）に対して、消化管 NET に対する保険適用（効能としては消化管ホルモン産生腫瘍に対する諸症状の改善）が承認され、PRRT も一部の施設にて臨床研究レベルで行われ始めている。

オクトレオチドは、特に SSTR-2 に結合性が高いため、それらのサブタイプを発現していない腫瘍の場合、高い治療効果が期待されないことになるが、近年は複数のサブタイプに結合性の高いアナログが開発されている。SOM230 がその代表であり、SSTR-1, 2, 3, 5 に対して高い結合性を示すと報告されている^{18,19)}。これら multi-receptor targeting somatostatin analogs を効果的に使用してゆくためにも、個々の腫瘍における SSTR サブタイプの発現解析は重要である。

1-4 神経芽腫群腫瘍と組織分類について

神経芽腫群腫瘍（NTs）は、小児固形腫瘍で最も頻度が高く、小児がんにおいては白血病、脳腫瘍に次いで多く、悪性腫瘍全体の約 10%を占める。胎児の神経堤細胞の発達を模倣するように腫瘍細胞が成熟分化するというユニークな生物学的特性を示し^{20,21)}、交感神経節や副腎髄質を発生母地として体幹に好発する。症例によって悪性度が様々で、その予測のため多数の予後因子が提唱されている²²⁾。個々の症例は予後因子からリスク分類され、リスクに応じた治療が選択される²³⁾。日本神経芽腫研究グループの推定では、3年生存率は低リスク群で 90%以上、中間リスク群で 60~80%、高リスク群では約 30%と、高リスク群の予後は不良で

あり強力な集学的治療が選択される²⁴⁾。代表的な予後因子としては、発症年齢、臨床病期、MYCN 遺伝子増幅、DNA ploidy、1pLOH、11qLOH、17q gain の他、組織分類がある。

予後因子として使用される組織分類は、島田分類を継承して 1999 年に提唱された International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) である²⁵⁻²⁸⁾。INPC では、腫瘍細胞の形態学的分化度に基づいて、神経芽腫 (NB)、神経節芽腫 (GNB) intermixed、神経節腫 (GN)、GNB nodular に分類するカテゴリ分類と、各カテゴリに発症年齢と核分裂・崩壊数 (MKI) の情報を加味して、favorable histology group と unfavorable histology group の二つに大別する予後分類を定めている。図 2 の如く、予後分類では、GN と GNB のカテゴリは大部分が favorable histology group に分類されるのに対して、NB は、MKI と発症年齢の影響をより強く受けて、favorable histology group と unfavorable histology group へ分けられる。大規模スタディによれば、概ね半数ずつになる²⁶⁾。従って、INPC 予後分類は、組織分類の範疇にあるものの、組織形態のみならず時間経過と細胞増殖能の機能的要素を含んだものと言える。INPC 予後分類は、大規模スタディによって 5 年無イベント生存率が favorable histology group で 90.8%、unfavorable histology group 31.2% ($p < 0.0001$) と報告されていることから確立した予後因子として扱われており、リスク分類に重要な役割を果たしている²⁶⁾。

1-5 NB における SSTR 発現と治療への応用について

NB はカテコラミンを産生するという点では NET と捉えられ、分子生物学的手法が開発される以前から SSTR の発現が指摘されてきた。文献によって異なるものの affinity binding や autoradiography ではヒト NB 組織の概ね 80% に SSTR 発現が報告されている²⁹⁻³¹⁾。一方、サブタイプ別の発現を検索した報告は数少なく、RT-PCR 法と免疫組織化学染色法による報告がそれぞれ見られるのみである

32,33)。

予後との関連については、サブタイプ同定以前から **SSTR** 発現が予後良好因子であるとの報告があり^{30,31)}、感度において優る **metaiodobenzylguanidine (MIBG)** シンチグラフィとオクトレオスキャンを併用して局在診断と共に予後予測に役立てられるという報告もある^{34,35)}。サブタイプとの関連では、**RT-PCR** 法による **SSTR-2** の高発現が予後良好因子であるという一連の報告がある³⁶⁻³⁹⁾。

治療への応用については、欧米諸国の一部の施設で試験的に開始されている段階であり、まだ症例数は少ないが、悪性度の高い難治性の **NB** 例に対して **PRRT** の部分奏功の報告がなされている⁴⁰⁻⁴²⁾。成人 **NET** における成果が蓄積されれば、オクトレオチド(サンドスタチン®)による化学療法や、**multi-receptor targeting somatostatin analogs** による治療も、将来的に治療の選択肢に入ってくる可能性があるものと期待される。

2. 目的

緒言で述べたように、NB では悪性度に応じた至適治療が行われることで予後は大幅に改善しているが、高リスク群では未だ予後不良であり、悪性度の高い難治例に対する治療法は定まっていない。緒言で述べたように、NB では SSTR の高率な発現が報告されており、ソマトスタチンアナログ製剤を利用した治療が今後展開される可能性がある。未だ明らかにされていない SSTR-2 以外のサブタイプ発現と予後との関連を検討することで、難治例に対する multi-receptor targeting somatostatin analogs の適用に繋がるかもしれない。

そこで、実験 I では SSTR サブタイプの発現と予後との関連を明らかにすることを目的とした。SSTR サブタイプは免疫組織化学染色法とリアルタイム RT-PCR 法で検索し、予後の指標として INPC 予後分類と転帰を用いた。また、対象は NB だけでなく GN および GNB も含めた NTs として、SSTR 発現と形態学的分化度との関連も検討した。

実験 II では、実験 I で検討した SSTR 発現と形態学的分化度との関連が、NTs の発生母地とされる副腎髄質や交感神経節においても同様に見られるのか、発達段階的に SSTR サブタイプ発現を検索して比較検討した。

最後に、NB との関連が文献的に報告されている様々な蛋白や転写因子の発現と SSTR 発現との間に関連が見られるか実験 III で検討した。具体的には、実験 I で用いた腫瘍組織と実験 II で用いた正常組織を使用して、ソマトスタチン、シナプトフィジン、TH、CD44、PHOX2B、SOX10 の発現を免疫組織化学染色法で検索した。そして、実験 I、II で得られた SSTR サブタイプの発現結果と臨床的予後因子を含めて多変量解析を行った。

3. 実験 I

3-1 目的

NTsにおけるSSTR各サブタイプの発現を免疫組織化学染色法およびリアルタイムRT-PCR法で検索し、INPCに応じた組織型ならびに予後との関連を検討する。

3-2 対象

1991年～2012年に、当院および国立成育医療センターで、病理組織診断目的に提出されたNTs 63例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを対象とした。全例、未治療の状態で腫瘍生検または腫瘍切除によって得られた検体である。2名以上の病理専門医によってINPCの基準に従って分類が行われ、63例中、NBが54例（27例がunfavorable histology group、27例がfavorable histology group）、GNBが4例（2例がGNB intermixed、2例がGNB nodule）、GNが5例であった。63例の臨床情報および病理組織型の詳細は表2に示す。転帰が追跡できた62例のうち死亡は10例で、全てNBで腫瘍関連死であった。MYCN増幅を12例に認めた。International Neuroblastoma Staging Systemによる臨床病期分類⁴³⁾では、stage 1が14例、stage 2が10例、stage 3が11例、stage 4が26例、stage 4sが2例であった。

検体使用については当院臨床研究倫理審査委員会の承認を得た(RK-121109-9)。

3-3 方法

3-3-1 免疫組織化学染色法

SSTR-1, 2, 3, 4, 5の免疫組織化学染色を、自動免疫組織化学染色機(Histostainer; Nichirei Bioscience)を用いて以下の手順で行った。陽性コント

ロールとしては剖検例の隣組織を用いた。

- ① ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを 4 μ m 厚に薄切し、切片をシランコーティングスライドガラスにマウントした。
- ② キシレン系列に順次、スライドガラスを浸漬し脱パラフィン操作を行った。
- ③ エタノール系列に順次、スライドガラスを浸漬し脱キシレン化した。
- ④ 水洗、蒸留水で水洗後、phosphate buffered saline (PBS) で親水化した。
- ⑤ 抗原賦活処理として、クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸漬してウォーターバスにて煮沸浴 (95°C、40 分間) した後、常温放置し PBS で洗浄した。
- ⑥ 非特異反応のブロックのため、5%ヤギ血清を室温で 10 分間反応させた。
- ⑦ PBS 洗浄後、一次抗体を室温で 30 分間湿潤箱内で反応させた。一次抗体の詳細は表 3 に記載した。
- ⑧ 陰性コントロールとしては一次抗体の代わりに PBS を反応させた。
- ⑨ PBS 洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ除去を目的に 0.3%過酸化水素加メタノールを室温で 10 分間反応させた。
- ⑩ PBS 洗浄後、二次抗体 (Envision, Dako) を室温で 30 分間、湿潤箱内で反応させた。
- ⑪ PBS 洗浄後、過酸化水素加 DAB 溶液で反応産物の可視化を行った。
- ⑫ 流水水洗後、マイヤーのヘマトキシリンで 1 分間の核染色を行った。
- ⑬ 水洗後、脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入した。

3-3-2 免疫組織化学染色法の結果判定

SSTR-1, 2, 3, 4, 5 の結果は、immunoreactive score (IRS)を用いて評価した。IRS は乳癌のエスロゲン受容体発現の評価として提唱され、近年では、NET の免疫組織化学の評価にも使用されている^{44,45)}。表 4 の如く、陽性細胞比率と陽性強度を乗じた値であり、0 点~12 点の範囲をとり、2 点以上を陽性と判断した。

3-3-3 リアルタイム RT-PCR 法

3-3-3-1 検体の準備

3-3-1 で用いたものと同じホルマリン固定，パラフィン包埋ブロックを用いた。腫瘍組織のみを含むブロックの場合は $8\mu\text{m}$ 厚の切片を数枚薄切し対象とした。非腫瘍組織が含まれているブロックについては、メンブレンフィルム貼布スライドガラス上に $8\mu\text{m}$ 厚の切片をマウントし、 60°C で一晩静置した。脱パラフィン操作後トルイジンブルーで染色し、顕微鏡下に観察しながら腫瘍部のみをマイクロダイセクトし、ミネラルオイルを充填したエッペンドルフチューブに回収した。

3-3-3-2 Total RNA の抽出

回収した腫瘍組織を RNA extraction buffer $200\mu\text{l}$ (2% SDS, 0.1mM EDTA, 10mM Tris-HCl) および Proteinase K $5\mu\text{l}$ と混和し、切片が完全に溶解するまで 55°C で 1 昼夜反応させた。2M 酢酸ナトリウム溶液 $20\mu\text{l}$ 、クエン酸飽和フェノール $220\mu\text{l}$ 、クロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) $60\mu\text{l}$ を加えて攪拌し、1~2 分間静置した後に遠心分離 (15000rpm 、15 分間) した。氷冷下で上清のみを新しいエッペンドルフチューブに移し、イソプロパノール $200\mu\text{l}$ 、グリコーゲン $2\mu\text{l}$ を加えて転倒混和後、ただちに氷冷し、 -80°C で 30 分間以上静置した。遠心分離 (15000rpm 、30 分間、 4°C) 後、丁寧に上清を除去し、70% エタノール $200\mu\text{l}$ を加え遠心分離 (15000rpm 、5 分間、 4°C) し、再度丁寧に上清を除去し氷冷下で 30 分間乾燥させた。 $5\sim 10\mu\text{l}$ (4°C) の RNase フリー水に溶解させ、 $1\mu\text{l}$ は Nanodrop 1000 を用いて 260nm の吸光度を測定し RNA 濃度の測定を行い、残りは -80°C で保存した。

3-3-3-3 cDNA 合成

cDNA 合成キット QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN) を使用した。テンプレート RNA を氷上で解凍し、表 5 に従って氷上でゲノム DNA 除去反応液を調整し、42°C で 2 分間反応させて直ちに氷上に置いた。

表 6 に従って、氷上で逆転写反応マスターミックスを調整し先ほどのゲノム DNA 除去反応液全量を添加し、42°C で 15 分間反応させた。Quantiscript Reverse Transcriptase を不活化するため、95°C で 3 分間反応させ 4°C で保存した。

3-3-3-4 リアルタイム RT-PCR 法による mRNA 発現の定量

SSTR 各サブタイプと GAPDH のリアルタイム RT-PCR 用プライマーを表 7 の通りに設計した⁴⁶⁾。

SYBR® Green Master Mix (Life Technologies) を用いて、表 8 の如く、マスターミックスを調整した。反応液を 96 ウェルプレートに分注し、シールした後に ABI Prism7000 sequence detection system (Life Technologies) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応条件は、95°C 10 分間の酵素活性反応の後、95°C 15 秒、60°C 1 分間を 45 サイクルとした。

定量は相対定量解析法を用いて行った。まず、増幅曲線と閾値の交点から Cycle time (Ct) 値を求め、SSTR-1, 2, 3, 4, 5 mRNA の Ct 値と内因性コントロールである GAPDH mRNA の Ct 値の差を発現レベルの差に換算する $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて、各サンプルにおける SSTR-1, 2, 3, 4, 5 の mRNA 発現量を測定した ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{各 SSTR mRNA}) - \Delta Ct(\text{GAPDH mRNA})$)、相対発現量 = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ⁴⁷⁾。

一方で、抽出した total RNA は、Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) による評価にて質の低下を認めたため、念のため、上記の RT-PCR 産物をアガロースゲル中に電気泳動を行いターゲット増幅の確認を行った (図 3)。

3-3-4 統計法

本実験の統計解析は、エクセル統計 2012（社会情報サービス）のソフトウェアを用いた。統計法は各々の結果の箇所および図表内に記載した。p<0.05 を有意とした。

3-4 結果

3-4-1 免疫組織化学染色法による SSTR 各サブタイプの発現および INPC との関連

免疫組織化学染色法は、全 63 例を対象とした。SSTR 各サブタイプの陽性数は、SSTR-1 が 45/63 (71.4%)、SSTR-2 が 53/63 (84.1%)、SSTR-3 が 9/63 (14.3%)、SSTR-4 が 29/63 (46.0%)、SSTR-5 が 0/63 (0%)であった。57/63 (90.5%)で SSTR-1 または 2 が陽性を示し、SSTR-3 または 4 の単独発現例は見られなかった。60%以上の症例で SSTR-1 と 2 が共発現していた。全サブタイプ陰性は 6/63 (9.5%)であった。陽性部位は、SSTR-1, 3, 4 は細胞質、SSTR-2 は膜または膜および細胞質であった。

INPC で分類した SSTR 各サブタイプの陽性数を表 9-1 に示した。GN と GNB は全例で SSTR-1, 2, 4 陽性であり、発現の見られなかった SSTR-5 を除く全サブタイプにおいて、NB よりも発現率が高かった。また、NB の中では、favorable histology group の方が unfavorable histology group よりも、SSTR-1, 2, 3, 4 全て、 χ^2 検定にて有意に高い発現率であった。代表的な陽性例の写真を図 4 に示した。サブタイプ全般的に、神経節様細胞や神経芽細胞の中でも大型の分化の良いと考えられる腫瘍細胞に染まる傾向が見られた。IRS による半定量的比較では(図 5)、SSTR-1, 3, 4 において、GN と GNB は NB よりも高スコアの傾向を認めたが、SSTR-2 に関しては GN および GNB はそれほど高いスコアは示さなかった。NB の中では、favorable histology group の方が unfavorable histology group よ

りも SSTR-1, 2, 3, 4 全て高スコア傾向であり、SSTR-1, 2, 4 において Kruskal-Wallis 検定および Steel 法にて有意差を認めた。従って、形態学的分化度が高いほど、また、予後良好な腫瘍ほど、SSTR-1, 2, 3, 4 全般的に発現率、IRS スコア共に高いことが示された。

3-4-2 リアルタイム RT-PCR 法による SSTR 各サブタイプの発現量と INPC との関連

リアルタイム RT-PCR 法は、当院の検体 37 例を対象とした。SSTR-1, 2 を発現している例が多く、SSTR-3, 4 の単独発現は見られなかった。SSTR-5 は全例陰性であった。図 6 に、INPC で分類した SSTR-1, 2, 3, 4 の mRNA 相対量を示した。SSTR-4 では、GN, GNB の発現量は、NB に比べやや高い傾向を認めたが、それ以外のサブタイプでは、GN, GNB の発現量が低く、INPC カテゴリの違いによる一定の傾向は見られなかった。NB だけで見ると、免疫組織化学染色法の結果と似て、SSTR-1, 2, 4 において、favorable histology group の方が、unfavorable histology group に比べて発現量が高く、SSTR-1 で有意差を認めた (Kruskal-Wallis 検定および Steel 法)。NB 例 (28 例) における mRNA 量と対応する症例の IRS で、スピアマンの順位相関係数を計算すると、SSTR-1 が 0.71 ($p < 0.01$)、SSTR-2 が 0.51 ($p < 0.01$)、SSTR-3 が 0.40 ($p < 0.05$)、SSTR-4 が 0.66 ($p < 0.01$) と、総じて良好な相関関係を示した。

3-4-3 転帰別での SSTR 各サブタイプの発現

本研究においては 10 例の死亡例が見られたが、全て NB で、そのうち 9 例が unfavorable histology group で、1 例が favorable histology group であった。転帰不明の 1 例を除く NB 53 例において、SSTR 各サブタイプの発現を転帰別に比較した。

免疫組織化学染色法では、死亡群の発現は、SSTR-1 が 4/10 (40%)、SSTR-2 が 8/10 (80%)、SSTR-3, 4, 5 は発現を認めず、SSTR-1, 2 に限局していた(表 9-2)。IRS による半定量的検討(図 7)では、生存群に比べ、死亡群では SSTR-1, 4 の発現が Mann-Whitney 検定にて有意に低値であった。一方で、SSTR-2 に関しては、死亡群でも点数が高く、ほとんど差を認めなかった。リアルタイム RT-PCR 法では、生存群に比べ、死亡群では、SSTR-1, 2, 4 の発現量が低かったが、有意差を得る程ではなかった(図 8)。表 10 に死亡例における IRS と mRNA 値の詳細を示した。一部の症例(No.29, 49, 54)においては、SSTR-2 の発現がよく保たれていることが分かる。これらの症例の組織型や臨床情報について、他の症例と特に違いが見られることはなかった。

SSTR-1, 4 については、免疫組織化学染色法による結果を使用した Kaplan-Meier 法による生存分析においても、転帰追跡できた NTs 62 例における発現の有無別で生存曲線に有意な差を認めた(図 9)。

3-5 結論

実験 I では、NTs における SSTR 各サブタイプの発現を、免疫組織化学染色法とリアルタイム RT-PCR 法で検索した。主な結果は下記の如くであった。

- ・ 陽性率は、SSTR-1 が 71.4%、SSTR-2 が 84.1%、SSTR-3 が 14.3%、SSTR-4 が 46.0%、SSTR-5 が 0%。90%以上の症例で SSTR-1 または SSTR-2 が発現し、60%以上の症例で SSTR-1 と SSTR-2 が共発現していた。
- ・ INPC カテゴリ別では、形態学的分化度が高い GN/GNB で 3 つ以上の SSTR サブタイプが発現し、発現量も高い傾向を認めた。mRNA 量では差が明らかではなかったが、腫瘍細胞の密度による影響の為と推測された。
- ・ NB では、favorable histology group の方が unfavorable histology group よりも SSTR-1, 2, 3, 4 の発現率および発現量が高い傾向を認めた。免疫組織化

学の半定量的評価と mRNA 相対量は良好な相関を示した。

- ・ 転帰別では、生存群の方が複数のサブタイプを発現し、SSTR-1, 4 では有意に発現量が高かった。SSTR-2 に関しては、大きな差を認めなかった。死亡群の一部で SSTR-2 の発現量が高い症例があったためと考えられた。

4. 実験 II

4-1 目的

NTs の正常カウンターパート組織とされる副腎髄質および交感神経節組織における SSTR 各レセプタの発現を発達段階的に調べ、実験 I の結果と対比できるかを検討した。

4-2 対象

未熟な段階の正常組織としては、自然流産検体 6 例に偶発的に含まれていた正常な副腎髄質と交感神経節（交感神経幹神経節および大動脈前神経節）のパラフィン包埋検体を用いた。成熟した段階の正常組織としては、実験 I で用いた腫瘍検体中に含まれていた正常な副腎髄質 8 例と交感神経節 4 例ならびに当院の手術症例に含まれていた正常交感神経節 4 例を対象とした。用いた症例の臨床情報は、表 11 に示した。検体は全て、治療のため摘出された検体に偶発的に含まれていた組織であり、検体使用については厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針に準じ、当院の臨床研究倫理審査委員会の承認を得た（RK-121109-9）。

4-3 胎生期の副腎組織、交感神経節について

正常な副腎髄質、交感神経節の発生と本実験で使用した検体の所見について記載を加えておく。

発生第 3 週末、神経板の側方縁が持ち上がり神経ヒダとなる。神経堤細胞は神経ヒダの細胞集団であり、体幹部では第 4 週の神経管形成後に二手に分かれて遊走を開始する。一方は背側へ遊走し皮膚へ分布してメラノサイトとなり、もう一方は腹側へ遊走して後根神経節、交感神経系および消化管の神経細胞、シュワン細胞、副腎髄質細胞へ分化する。

副腎の発生は、発生第 5 週頃より中胚葉由来の間葉系細胞が、腸間膜根部と発生中の生殖腺との間に集合増殖することに始まる。徐々に好酸性の多角形細胞となり細胞は大型化かつ急激に増殖し、第 7 週頃には胎生皮質を形成しその辺縁を将来の固有皮質となる小型細胞が取り囲む。形成を始めた胎生皮質内へ交感神経幹からの細胞が散在性に侵入し、暗調な核を有す小型細胞 (neuroblasts) と vesicular な核を有すより大型の細胞 (pheochromoblasts) の 2 種類の細胞へ分化してゆく。初期は neuroblasts が大部分を占めるが、出生前には pheochromoblasts が優勢となり副腎中心近くに存在するようになる。出生後、胎生皮質は変性を始め、出生 10 日目には大部分が壊死に陥り、辺縁を取り囲んでいた小型細胞のみが生き延びて固有皮質となり、思春期頃までに網状帯、束状帯、球状帯に分化してゆく。髄質細胞は、出生後の胎生皮質の崩壊に伴って副腎中心部のみが取り残され、副腎髄質組織となる^{48,49)}。

本実験で使用した流産検体は 6~12 週相当の胎芽ならびに胎児で、交感神経節細胞は 10~17 μ m 径程度と小型で (出生後の交感神経節細胞は 50~60 μ m 径程度)、胎齡の早い例では細胞質境界が不明瞭であった。副腎組織は胎生皮質が主体で、辺縁部を固有皮質の前駆細胞と考えられるやや小型の細胞が数層取り囲んでいた。副腎内側に近接する大動脈前交感神経節周囲から侵入するように、副腎内には neuroblasts と考えられる小型細胞が少数集簇して疎らに分布していた。これらは胎齡に矛盾しない組織像と考えられた。

4-4 方法

3-3-1 と同じ手技で、対象症例のパラフィンブロックを用いて、SSTR 各レセプタの免疫組織化学染色を行った。

4-5 結 果

副腎髓質、交感神経節では、未熟組織、成熟組織ともに、実験 I の結果と同様、SSTR-5 を除く SSTR-1, 2, 3, 4 の発現を様々な程度に認め、SSTR-1, 3, 4 は細胞質、SSTR-2 は膜に陽性を示した。SSTR 各レセプタの発現結果を表 12, 13 に示した。

胎芽・胎児例では、SSTR-1 は副腎髓質、交感神経節ともに全例で弱～中等度の陽性像を示した。その他、脊髄～末梢神経、腸管神経叢にかけて広く陽性であった。SSTR-2 は後根神経節へ入る神経線維や腸管の筋間神経節には陽性であったが、それ以外の神経線維は陰性で、交感神経節、副腎髓質も全例陰性であった。SSTR-3 は非特異的な陽性像が多く見られたが、1 例(胎-5)のみで副腎髓質、交感神経節ともに中等度の陽性像を示した。SSTR-4 は交感神経節で全例弱い陽性像を示し、副腎髓質では全例陰性であった。また、脊髄～末梢神経、腸管神経叢にかけて広く弱い陽性像を示し、染色強度は弱いものの陽性部位の分布は SSTR-1 と似ていた。代表的な陽性例の写真を図 10 に示した。

出生後の副腎髓質および交感神経節では、細胞が大型かつ細胞質境界が比較的明瞭で、胎児・胎芽例に比べて染色強度は全体に強い傾向であった(図 11)。SSTR-1, 2, 4 の陽性率はほぼ 100%、SSTR-3 の陽性率は 40%程度で、実験 I の GN/GN における発現率と極めてよく似た結果であった。

4-6 結 論

- ・ NTs の正常カウンターパート組織では、SSTR-5 を除く SSTR-1, 2, 3, 4 が様々な発現し、全体的に未熟組織よりも成熟組織で染色強度および発現率が高かった。実験 I で得られた、NTs においては形態的分化度が高いほど複数のサブタイプが発現し発現量も高い、という結論と同様の結果であった。
- ・ 成熟組織の発現プロファイルは、実験 I の GN/GNB と極めてよく似ていたが、

未熟組織では SSTR-2 が全例陰性であり、実験 I の NB で SSTR-2 が 81.5% の高陽性率であったことと大きく異なる結果であった。従って、NTs と正常カウンターパート組織の SSTR レセプタ発現結果はそのまま対比できるものではないと考えられた。

5. 実験Ⅲ

5-1 目的

実験Ⅰ、Ⅱの結果から、NTs および正常カウンターパート組織においては SSTR-1, 2, 3, 4 の発現が様々に見られ、形態学的分化度や予後との関連が示された。実験Ⅲでは、文献的に NB での発現が報告されている様々な物質の発現を免疫組織化学的に検索し、SSTR 発現や予後との関連について検討した。

用いた免疫染色抗体は、ソマトスタチン、シナプトフィジン、TH、CD44、PHOX2B、SOX10 である。ソマトスタチンについては緒言で既述した。それ以外の特徴は以下の様である。

シナプトフィジン：神経細胞シナプス小胞や神経内分泌細胞に発現する膜糖蛋白。NB、NET、下垂体腺腫、副腎髄様癌、褐色細胞腫、パラガングリオーマなどの診断補助に汎用される。

TH：カテコラミン合成過程において、チロシンから DOPA を合成する酵素。副腎髄質、交感神経節、中脳などに分布する。NB、褐色細胞腫、パラガングリオーマなどの診断補助に使用される。NB では特異度が高く、診断補助および骨髄や末梢血内の微小残存腫瘍の検出に有用とされる。

CD44：接着分子として正常組織・細胞に広く発現する膜糖蛋白。主たるリガンドであるヒアルロン酸との結合を介して、接着分子としての作用だけでなく細胞内外のシグナル伝達に関わる。20 のエクソンから構成されるが、一部のエクソンが選択的スプライシングを受けることにより、CD44S (standard form)、CD44E

(epithelial form)、CD44v (variant form) など多数の同位体 (isoform) を生じる。炎症促進作用、様々な腫瘍において浸潤転移への関与、近年では癌幹細胞での発現が注目を集めている。NB では、予後良好因子としての CD44 の発現についての臨床病理学的研究が様々に見られる⁵⁰⁻⁵⁴⁾。

PHOX2B: PHOX2A を paralogue とする paired-like homeodomain 転写因子で、自律神経前駆細胞～発達分化した自律神経細胞に発現し、自律神経系の発達に必須とされる⁵⁵⁾。GDNF (glial cell-derived neurotrophic growth factor) 受容体のサブユニット *ret* の発現やニューロン分化を促進する転写因子である *Mash1* (Mammalian achaete-scute homolog 1) の発現維持に必要とされる。NB とヒルシュスプルング病を併発しやすいと言われる先天性中枢性低喚起症候群患者の多くに PHOX2B の変異が報告されており、PHOX2B 変異マウスでは、PHOX2B の発現減少と共に SOX10 の発現亢進が見られ、グリア細胞への偏った分化が見られるとの報告がある⁵⁶⁾。また、NB 検体において、PHOX2B の免疫組織化学染色は極めて陽性率が高く、他の抗体に比べて診断補助に有用との報告もある⁵⁷⁾。

SOX10: SRY (Sex-determining region Y) box 10 遺伝子によってコードされる転写因子。自律神経前駆細胞～発達分化したグリア細胞とメラノサイトに発現し、神経堤細胞からグリア細胞やメラノサイトへの分化に必須とされる。ワーデンブルグ症候群 TypeIV (皮膚や毛髪の色素欠損、虹彩の色素異常、難聴、ヒルシュスプルング病) の責任遺伝子とされる。SOX10 の標的遺伝子として *ret* や *Mitf* (Microphthalmia transcription factor) など複数の遺伝子の報告がある⁵⁸⁾。腫瘍では、神経鞘腫、神経線維腫、メラノーマ、神経節腫のシュワン様細胞に発現が見られる他、低分化な NB でも弱い発現が見られたという報告がある⁵⁹⁾。

5-2 対象

実験 I で用いた NTs 組織 63 例と、実験 II で用いた副腎髄質組織及び交感神経節組織を対象とした。

5-3 方法

対象症例について、ソマトスタチン、シナプトフィジン、TH、CD44、PHOX2B、SOX10 の免疫組織化学染色を下記の通りに行った。

- ① ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから、4 μ m 厚に切片を薄切し、シリコーティングスライドガラスにマウントした。
- ② キシレン系列に順次、スライドガラスを浸漬し脱パラフィンした。
- ③ エタノール系列に順次、スライドガラスを浸漬し脱キシレン化した。
- ④ 水洗、蒸留水で水洗後、PBS に通した。
- ⑤ 抗原賦活処理として、クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸漬して、ウォーターバスにて煮沸浴 (95°C、20 分間または 40 分間) または、オートクレーブにかけて (105°C、10 分)、常温放置し、PBS で洗浄した (表 14)。
- ⑥ 非特異反応のブロックのため、5%ヤギ血清を室温で 10 分間反応させた。
(ソマトスタチン染色においては、⑤、⑥の操作は省略した)
- ⑦ PBS 洗浄後、一次抗体を室温で 30 分間、湿潤箱内で反応させた。使用抗体の詳細は、表 14 に記載した。
- ⑧ 陰性コントロールとしては一次抗体の代わりに PBS を反応させた。
- ⑨ PBS 洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ除去を目的に 0.3%過酸化水素加メタノールを室温で 10 分間反応させた。
- ⑩ PBS 洗浄後、二次抗体を室温で 30 分間、湿潤箱内で反応させた。使用抗体の詳細は、表 14 に記載した。
- ⑪ PBS 洗浄後、過酸化水素加 DAB 溶液で反応産物の可視化を行った。

⑫ 流水水洗後、マイヤーのヘマトキシリンで1分間の核染色を行った。

⑬ 水洗後、脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入した。

5-4 結果

5-4-1 陽性率とその特徴

NTs および正常カウンターパート組織における各蛋白や転写因子の発現率を表15に、陽性代表例の写真を図12に示した。陽性率では、PHOX2B、シナプトフィジン、THの陽性率が高く、SSTR-2やSSTR-1よりも高率であった。次いで高いのはCD44で、ソマトスタチン、SOX10は低率であった。各々の染色動態は様々であり、特徴を列挙した。

ソマトスタチン: NTsにおける陽性例は63例中7例(11.1%)だけで、かつ、数%~50%程度の部分的な陽性像であった。陽性例7例中、GN/GNBが3例(GN/GNB全体の33%)、NBが4例(NB全体の7.4%)であり、また、一つの症例中でも、神経節様の分化の良い細胞に染まる傾向が見られ、形態学的分化度の高い腫瘍の方が陽性を示す傾向があるものと考えられた。

正常カウンターパート組織においても陽性率は低かった。交感神経節は8例全て陰性、副腎髄質は8例中1例のみで10%程度の細胞質に陽性を示したのみで、胎芽・胎児例では小腸上皮の基底顆粒細胞と考えられる細胞に陽性を示す以外、全て陰性であった。

シナプトフィジン: NTsにおける陽性例は、63例中60例(95.2%)で、極めて高い陽性率であった。陰性例3例は、全てNB, poorly differentiated type / unfavorable histology group かつ死亡例であり、陰性は予後不良因子と考えられた。染色性は、NBでは主に神経細線維に陽性を示したため、神経細線維に富む

ことの多い favorable histology group では瀰漫性に陽性で、神経細線維に乏しい unfavorable histology group では部分的な陽性像を示す傾向が見られた。NTs の形態学的分化に従って神経細線維が減少または消失し、腫瘍細胞の細胞質が明瞭化すると、細胞質に陽性を示す傾向であった。

GN や正常交感神経節では、神経節細胞および神経節様細胞の細胞質に様々な程度に陽性を示す他、細胞周囲やシュワン細胞内に dot 状の陽性像が観察され、シナプス小胞を反映しているものと推測された。副腎髄質では、瀰漫性に細胞質に強陽性を示し、神経内分泌機能を反映しているものと考えられた。胎児例においては、脊髄～末梢の神経線維、後根神経節、交感神経節、副腎髄質、筋間神経叢まで、神経系および神経内分泌系全般に陽性を示した。

TH : NTs における陽性例は、63 例中 56 例 (88.9%) で、かなり高い陽性率であった。陰性例 7 例は、全て NB, undifferentiated or poorly differentiated type / unfavorable histology group で、かつ 5 例は死亡例であり、シナプトフィジンと同様に陰性は予後不良因子と考えられた。染色性もシナプトフィジンと似て、NB では主に細線維に陽性を示し、形態学的分化度に従って、腫瘍細胞の細胞質が明瞭化すると、細胞質に陽性を示すように見えた。

GN や正常交感神経節では、細胞質に強陽性を示すものと弱陽性または陰性を示すものが混在し、様々なカテコラミン合成能を有す細胞が混在しているものと推測された。細胞周囲やシュワン細胞内には、シナプトフィジンと同様に dot 状の陽性像が観察され、シナプス小胞を反映しているものと推測された。副腎髄質では瀰漫性に細胞質に強陽性を示し、カテコラミン合成能を反映しているものと考えられた。胎児例においては、シナプトフィジンは神経および神経内分泌系全般に陽性であったのに対して、**TH** は交感神経幹～大動脈前交感神経節～副腎髄質にかけての交感神経系に限局して陽性であった。胎芽・胎児例でも、神経線維

は dot 状陽性を示し交感神経節や副腎髄質は細胞質に強陽性を示して、神経線維と細胞質の境界も大変明瞭であった。

CD44 : NTs における陽性例は 63 例中 32 例 (50.8%) で、陽性例の多くは、細線維に弱陽性を示す NB であった。そのためか、細線維に乏しい低分化な NB や GN/GNB では陰性例が多く見られた。一部の GN や交感神経節では膜に陽性を示したが、その他の交感神経節や副腎髄質は陰性であった。胎芽・胎児例では全て、観察されるあらゆる組織に陰性であった。NB だけで見ると陽性を示したのは、favorable histology group 27 例中 21 例 (77.8%) に対し、unfavorable histology group では 27 例中 8 例 (29.6%) のみで、死亡例 10 例中での陽性例は 1 例のみであった。これらの結果から、CD44 発現は形態学的分化との関連は乏しいが、予後との関連は強く、発現は予後良好因子と考えられた。

PHOX2B : NTs では、63 例中 62 例 (98.4%) と、ほぼ全例で核陽性を示した。陰性の 1 例は、全体に腫瘍細胞に挫滅を伴っており、そのため、核陽性像が不明瞭になったものと推測された。染色性では、NB では GN/GNB よりも、瀰漫性に強陽性を示す傾向が見られた。正常カウンターパート組織の発現も腫瘍細胞よりも弱く、陰性例も数例見られた。胎児例の副腎髄質および交感神経節においても発現は弱く、陰性例も見られたが、後根神経節、交感神経節、副腎髄質、筋間神経叢まで、広く自律神経系の細胞核に陽性を示していた。これらの結果から PHOX2B は NTs および自律神経系全般に発現し、NB では過剰発現している可能性が推測された。

SOX10 : NTs では腫瘍細胞自体は全例陰性であったが、NB では細線維が豊富な症例において見られる隔壁の紡錘形細胞核に陽性であった。GN/GNB では、間質

のシュワン様細胞の核と衛星細胞を有す場合は衛星細胞の核に陽性を示した。正常カウンターパート組織においても、交感神経節では周囲神経線維のシュワン核や衛星細胞核に陽性で、副腎髄質では実質細胞とは異なって見える小型楕円形の核に散在性に陽性で、シュワン系の支持細胞に発現しているものと考えられた。胎児例では交感神経節や副腎髄質に散在性に陽性像が見られ、シュワン系の支持細胞に分化してゆく細胞を示しているものと考えられた。

5-4-2 INPC 分類および転帰との関連

NTs における各種蛋白や転写因子の発現結果と INPC 分類および転帰との関連を検討した。

まず、陽性率が高い順にグラフ化し INPC カテゴリ別の陽性率の内訳を示した(図 13)。実験 I で得られた SSTR-1, 2, 3, 4 の陽性率も含め検討した。INPC カテゴリ別の内訳では、CD44 を除く全てで NB よりも GN/GNB において陽性率が高く、形態学的に分化した腫瘍の方が、蛋白や転写因子の種類に関わらず陽性率が高い傾向にあるものと考えられた。ただ、統計学的に有意であったのは SSTR-1, 3, 4, ソマトスタチンのみであった (Cochran-Armitage 検定)。PHOX2B、シナプトフィジン、TH、SSTR-2 は、NB でも発現率が高いために INPC カテゴリによる差が明瞭でなかったものと思われた。

次に、INPC 予後分類および転帰との関連を見るため、図 14 の如く、NB における陽性率を示した。INPC 予後分類別も生死別も似通った傾向のグラフで、発現率の極めて高い PHOX2B と低いソマトスタチンに関しては明らかな傾向が見られないが、それ以外の抗体では全て、予後良好群で発現率が高く予後不良群で発現率が低い傾向を示した。INPC 予後分類別では、シナプトフィジン、TH、CD44、SSTR-1, 2, 3, 4 で有意差を認めた (χ^2 検定)。生死別では、シナプトフィジン、TH、CD44、SSTR-4 で有意差を認めた (χ^2 検定)。

5-4-3 COX 比例ハザードによる予後因子としての検討

5-4-2の結果から発現と予後との関連が見られる蛋白がいくつか見られたため、更に、予後因子としての検討を行った。既知の予後因子の情報も加えて、COX 比例ハザード分析による多変量解析を行った。

対象：転帰を追跡できた NB 53 例

目的変数： 生 / 死

説明変数： SSTR-1,2,3,4 陰性 / 陽性

somatostatin 陰性 / 陽性

synaptophysin 陰性 / 陽性

TH 陰性 / 陽性

CD44 陰性 / 陽性

PHOX2B 陰性 / 陽性

発症年齢 1.5 才未満 / 以上

臨床病期 1 / 2 / 3 / 4 (4s は 2 として解析を行った)

MYCN 増幅 無 / 有

INPC 予後分類 favorable / unfavorable

MKI 低 / 中 / 高

NB subtype differentiating / poorly differentiated / undifferentiated

COX 比例ハザードモデルによる単変量解析および多変量解析の結果は、表 16 の如くで、単変量解析では、TH、シナプトフィジン、MKI、NB subtype、CD44、INPC 予後分類、臨床病期、年齢、SSTR-1、MYCN 増幅の順に、転帰への影響が示唆された。多変量解析では、変数増減法にて、TH、NB subtype、臨床病期が選択され、その中では、TH が最も強い予後因子であった ($p=0.016$)。

5-4-4 主成分分析による解析

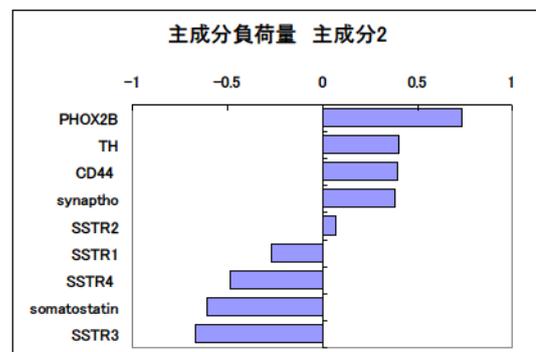
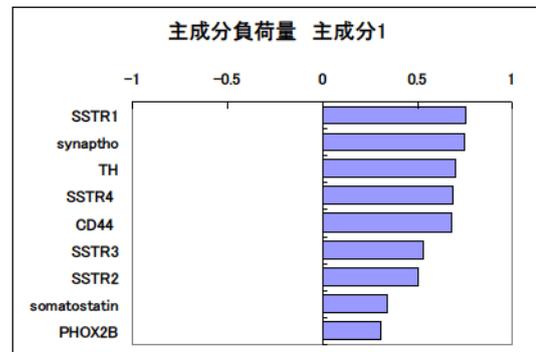
最後に、主成分分析を使用して、これまでに得られた蛋白および転写因子の発現の相互関連を検討した。主成分分析は多変量解析の一つであり、多くの特性を有す多変量データに共通な成分を探って、一種の合成変数を作り出す手法である。

NTs 全 63 例において、SSTR-1, 2, 3, 4 は実験 I の IRS の点数を用い、その他は陽性細胞比率 80%以上を 2 点、10~80%を 1 点、10%未満を 0 点として点数化して用いた。各点数を標準化して解析を行った。

結果は、下記表の如く、固有値 1 以上で 2 成分が抽出され、寄与率は主成分 1 で 36.8%、主成分 2 で 24.0%、累積寄与率 60.8%であった。

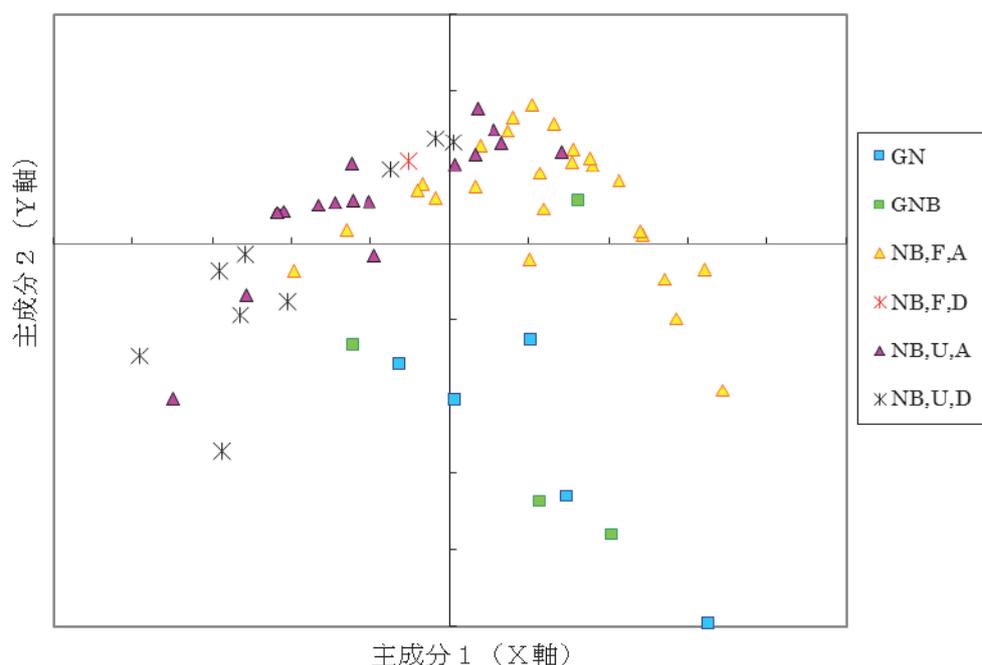
主成分 1、2 の主成分負荷量を各々図に示したものが下図である。主成分 1 の負荷量が多い SSTR-1, シナプトフィジン、TH、SSTR-4、CD44 はいずれも、これまでの実験結果から発現が予後良好因子と考えられたため、主成分 1 は「予後」を表す変数と推察された。主成分 2 については、SSTR-1, 2, 3, 4 と

		主成分 1	主成分 2
主成分負荷量	SSTR-1	0.759	-0.267
	synaptophysin	0.752	0.383
	TH	0.698	0.406
	SSTR-4	0.688	-0.490
	CD44	0.680	0.398
	SSTR-3	0.529	-0.674
	SSTR-2	0.502	0.069
	somatostatin	0.344	-0.608
	PHOX2B	0.310	0.740
	固有値		3.310
寄与率		36.8%	24.0%
累積寄与率		36.8%	60.8%



ソマトスタチンがまとまって検出され、「ソマトスタチン関連」とそれ以外を表す変数と思われた。すなわち、SSTR 各サブタイプおよびソマトスタチンは互いに関連性が高く、それ以外とは関連性が低いことが示唆された。

次に、各症例の主成分 1, 2 の得点から散布図を作成した。主成分 1 (X 軸) で負の得点を示しているのは主に死亡例や NB, unfavorable group の症例で、主成分 1 が「予後」を表す成分として矛盾しない結果であった。主成分 2 (Y 軸) では、NB が正の得点、GN/GNB が負の得点を示す傾向が見られ、「ソマトスタチン関連」と共に「形態学的分化度」も表しているものと推測された。すなわち、ソマトスタチン関連の蛋白発現は形態学的分化度の高さと関わりが強いことが示唆された。但し、主成分 2 の負荷量からは、ソマトスタチン関連の中でも SSTR-2 だけが正の負荷量を示しており、SSTR-2 だけは他の SSTR-1, 3, 4, ソマトスタチンと傾向が異なる可能性もまた示唆された。



主成分得点の散布図

GN: ganglioneuroma, GNB: ganglioneuroblastoma, NB: neuroblastoma,

F: favorable histology group, U: unfavorable histology group, A: alive, D: dead

5 - 5 結論

実験Ⅲでは文献的に NB での発現が報告されている様々な蛋白や転写因子の発現を検索し、INPC 分類、予後、SSTR 発現との関連について検討した。主な結果は以下の如くであった。

- ・ ソマトスタチン：発現率は低く、発現が見られても限局性であった。NTs の形態学的分化度との関連は示唆されたが、予後との関連は見られなかった。SSTR 発現との関連が示唆された。
- ・ シナプトフィジンと TH：発現率は極めて高く、発現陰性は予後不良因子と考えられた。
- ・ CD44：腫瘍組織における陽性率は 50%程度。分化した腫瘍や正常組織での発現が乏しく形態学的分化度との関連は見られなかったが、予後との関連が見られ、発現陽性は予後良好因子と考えられた。
- ・ PHOX2B：発現率は極めて高く、NTs および自律神経系全般に発現が見られた。分化した腫瘍や正常組織に比べ、NB では過剰発現している可能性が推測された。
- ・ SOX10：シュワン様細胞に陽性を示し、腫瘍細胞自体は全例陰性であった。

以上の如く、NTs においては発現率、形態学的分化度、予後との関連が様々に見られたが、SSTR 発現との関連が示されたのはソマトスタチンのみであった。

6. 考 察

6-1 実験 I

本研究の実験 I では、NTs における SSTR 全サブタイプの発現を免疫組織化学染色法とリアルタイム RT-PCR 法の両方を用いて検索し、INPC 分類と転帰との関連を検討した。文献的には数少ないが、NB における SSTR 全サブタイプの発現を検索した報告があり、Albers らは、RT-PCR 法を用いて SSTR-1, 2, 3, 4, 5 の発現数は、32/32 (100%)、27/32 (84%)、11/32 (34%)、26/32 (81%)、7/32 (22%) で、臨床病期が上がるにつれて全体的に発現率が低くなる傾向が見られたと報告している³²⁾。また、Georgantzi らは、免疫組織化学染色法を用いて SSTR-1, 2, 3, 4, 5 の発現数は、9/11 (82%)、10/11 (91%)、7/11 (64%)、2/11 (18%)、8/11 (73%) と報告している³³⁾。これらの報告では SSTR-3, 4, 5 に関しては違いが大きいですが、SSTR-1, 2 に関しては 80% 以上の高率な発現という点で一致している。本研究では、免疫組織化学染色法にて SSTR-1 が 71.4%、SSTR-2 が 84.1%、SSTR-3 が 14.3%、SSTR-4 が 46.0%、SSTR-5 が 0% であり、SSTR-1, 2 の発現率が高いという点では、既報告と同様の結果であった。既報告ではレセプタ相互の関係性についての指摘はなされていないが、本研究では SSTR-1, 2 の共発現例が多く SSTR-3, 4 の単独発現は見られず、レセプタ間に階層的な関係性がある可能性も窺われた。しかし、このようなレセプタ相互の関係性については、他の腫瘍における SSTR の解析においても特に指摘されているわけではないため、真の関係性であるのか SSTR-1, 2 の発現率が高いための見かけ上の関係性であるのかは不明であった。

免疫組織化学染色法による陽性部位については、本研究では SSTR-1, 3, 4 は細胞質のみに、SSTR-2 は膜または膜および細胞質に陽性を示した。SSTR は膜貫通型の受容体でありながら免疫組織化学染色法にて細胞質のみに陽性を示す現象

は諸家の研究でも見られ、同じ腫瘍を対象としていても必ずしも一致しない^{12,14,46)}。細胞質に陽性を示す理由としては、サブタイプによって抗体が認識するエピトープが異なること、レセプタの内在化や再利用に伴う現象でありサブタイプによってその速度が異なること、細胞質内で合成された受容体の膜への輸送障害などが言われている。陽性部位の違いが機能を反映するか否かについては様々な見解が見られる。ポリクローナル抗体を使用した研究であるが、SSTR-2A (SSTR-2はスプライシングの違いによりSSTR-2Aと2Bが存在し、ポリクローナル抗体においては区別されてきた)では、様々な部位のNETにおいて膜陽性を示す場合の方が細胞質のみ陽性を示す場合に比べ、オクトレオスキヤンの取り込みとの一致率が有意に高く、治療への反応率も高かったという報告がある⁶⁰⁾。一方で、副腎皮質腺腫において機能性腫瘍の方が非機能性腫瘍に比べてSSTR-1, 2B, 5の陽性率が高かったが、膜や細胞質の陽性部位とは関連がなかったという報告もある⁶¹⁾。本研究ではSSTR-2以外のサブタイプは全例細胞質のみに陽性で、SSTR-2は全例膜に陽性であり、形態学的分化度や予後との関連は認めなかった。

次に、INPC分類との関連については、免疫組織化学染色法によるINPCカテゴリ別では、腫瘍の形態学的分化度が高い程SSTR1, 2, 3, 4の発現が高い傾向が示された。リアルタイムRT-PCR法では、免疫組織化学染色法で認めた程の違いは見られなかったが、その原因としてNBに比べてGNBおよびGNでは検体内の腫瘍細胞密度が非常に低く、対GAPDH比としてのmRNA量が低く計測されたためと推測された。INPC予後分類別ではカテゴリ別よりも違いが明瞭であり、免疫組織化学染色法でfavorable histology groupの方がunfavorable histology groupに比べてSSTR-1, 2, 3, 4の発現率が有意に高く、半定量的比較においても高スコアの傾向を認めた。リアルタイムRT-PCR法でも、SSTR-1, 2, 4でfavorable histology groupの方が高値であった。緒言にて述べたように、INPC予後分類は組織型に加えて発症年齢と核分裂崩壊数の影響を受けるシステムとな

っていることから、この予後分類別での SSTR-1, 2, 3, 4 の発現の違いは、形態学的分化度に加えて細胞増殖能などの機能的要素の違いをも反映しているものと推測された。

同様に、転帰との関連についても、生存群では死亡群よりも発現するサブタイプの種類が多く、発現率、発現量共に高い傾向を認めた。SSTR-1, 4 に関しては有意差を認め、発現別の生存曲線でも有意差を認めた。既報告では SSTR-2 の発現が予後良好因子であるとの指摘は複数見られる。1990 年代では、SSTR-2 に選択性の高いとされるオクトレオチドを使った autoradiography や affinity binding を用いて、SSTR 非発現例では死亡例が多いという報告や³¹⁾臨床病期が上がるという報告³⁰⁾がある。2000 年代では、competitive RT-PCR やシンチグラフィを用いて SSTR-2 の発現量が高いほど生存率が高いというイタリアのグループの一連の報告がある³⁶⁻³⁹⁾。しかし、本研究では SSTR-2 に関しては生存群と死亡群の間に有意な差は認められなかった。この原因としては発現量が高い症例が死亡例中に数例含まれていたためと考えられた。従って、本実験 I では、INPC 予後分類から検討すると予後不良群では SSTR-2 の発現量が低くソマトスタチンアナログ製剤治療の適用になり難いと考えられたが、転帰からの検討では予後不良群の一部で SSTR-2 の発現量が高い症例があるため、これらの症例にとってソマトスタチンアナログ製剤は良い適応になると考えられた。

6-2 実験 II

本研究の実験 II では、NTs の正常カウンターパート組織とされる副腎髄質および交感神経節組織における SSTR レセプタの発現について、胎芽・胎児例と出生後例でどのように異なるか、免疫組織化学染色法で検討した。

胎芽・胎児例では、SSTR-1 は副腎髄質、交感神経節とも全例で弱～中等度陽性、SSTR-4 は交感神経節で全例弱陽性、SSTR-2, 3, 5 は全例ほぼ陰性であった。

胎芽・胎児例の陽性像は出生後例と比べると染色性としては弱いものであった。出生後例では、SSTR-1, 2, 4 が全例で強～弱陽性、SSTR-3 が半分弱の症例で陽性で、実験 I の GN/GNB における発現と極めてよく似た結果であった。胎芽・胎児例を NB、出生後例を GN/GNB と対応させれば、正常カウンターパート組織も NTs も形態学的分化に伴って SSTR 全般的に発現が高まる結果と考えられた。しかしながら、SSTR-2 に関しては、胎芽・胎児の正常カウンターパート組織では全く発現が見られず、実験 I で NB において SSTR-2 が SSTR サブタイプ中、最も発現率が高かったことと相反する結果であった。従って、SSTR サブタイプ発現においては、NTs の形態学的分化と正常カウンターパート組織の発達分化は似ている点もあるが、そのまま対比できるわけではないと考えられた。形態的に NB と未熟な正常カウンターパート組織は似ているが、NB では SSTR-2 が過剰発現している可能性も考えられた。また、胎芽・胎児の正常カウンターパート組織においては、SSTR サブタイプによって発現の差が大きかったことから、SSTR の発現する時期がサブタイプの種類によって異なる可能性も考えられたが、文献的に胎芽・胎児での SSTR 発現を検索した報告は、中枢神経や下垂体での profiling の報告が散見される程度で⁶²⁾ほとんど見られないため、既報告との比較検討は出来なかった。

6-3 実験Ⅲ

実験Ⅲでは、実験 I、II で使用した検体を用いて、ソマトスタチンの他、文献的に NB で発現が報告されている様々な蛋白や転写因子の発現を免疫組織化学染色法にて検索し、形態学的分化度や予後、SSTR 発現との関連について検討した。

ソマトスタチンは、発現率は低く、発現が見られても限局的であった。文献的にソマトスタチン添加が NB の形態学的分化を促進するという報告は複数見られるが⁶³⁻⁶⁵⁾、腫瘍細胞自身のソマトスタチン発現に関しては、全例で発現が見られ

たという報告から全例陰性という報告まで様々である^{32,33,64})。SSTR 活性におけるソマトスタチンのオートクリンやパラクリンの経路はそれ程重要ではないのかもしれない。しかし一方で、本実験では SSTR との関連が示されたのはソマトスタチンのみであり、同時に形態学的分化度の高さとの関連が示唆された。

シナプトフィジンと TH は、共に極めて高い発現率であった。発現陰性例は少数ながらも予後不良例ばかりであり、多変量解析では TH が今回解析した中で最も強い予後因子となった。文献的に、シナプトフィジンは NTs や NET に感度が高く診断補助に有用との報告が多い。感度が高すぎるためか予後との関連を指摘した報告は少ないが、再発の無い NB では再発の有る NB よりも有意にシナプトフィジンの免疫染色陽性の範囲が大きかったという報告がある⁶⁶)。TH は、NB に対する特異度が高く、文献的には診断補助および骨髄や末梢血内の微小残存腫瘍の検出に有用との報告が多いが^{67,68})、発現が予後良好因子であるとの報告も見られる⁶⁹)。

CD44 は、GNB や GN など分化した腫瘍や正常カウンターパート組織での発現が乏しく、形態学的分化との関連は指摘できなかったが予後との関連は見られ、発現は予後良好因子と考えられた。文献的にも予後因子であるとの報告が様々に見られ⁵⁰⁻⁵⁴)、今回の結果も同様と考えられた。一方で、文献的には正常副腎髄質や胎児の交感神経節および副腎髄質にも発現が見られると報告されているが^{20,21,70,71})、本実験ではこれらは全て陰性であった。CD44 には複数の同位体があることから、使用する一次抗体によって既報告と結果が異なった可能性が推測された。

PHOX2B と SOX10 は、文献的には自律神経系の細胞に発生初期から発現し、発達に伴って PHOX2B は神経節細胞に SOX10 はグリア系細胞に発現するとされ、本実験の正常組織での発現においても同様の結果が見られた。共に NB で発現が見られるとの報告があるが^{57,59})、今回 SOX10 は腫瘍細胞自体には全例陰性で、

間質の紡錘形細胞や周囲のシュワン様細胞に陽性であった。一方、PHOX2B は今回解析した中で最も高率に腫瘍細胞に発現していた。文献的にも、陽性率が極めて高いことから低分化な NB の診断補助に有用であるという報告や⁵⁷⁾、微小残存病変の検出に有用であるという報告が見られる⁷²⁾。また、本実験では GN/GNB や正常組織における発現に比べ、NB で過剰発現する傾向を認めたが、予後との関連は特に認めなかった。

以上の如く、実験Ⅲで調べた蛋白および転写因子では様々な発現傾向と予後との関連を認め、実験Ⅰで予後良好因子と考えられた SSTR サブタイプは、これらの発現や臨床的予後因子と共に解析すると強い予後因子とは言えない結果となった。例えば、実験Ⅰの生存分析では SSTR-1, 4 の発現は有意な予後因子であったが、実験Ⅲでは SSTR-1 は生死別での発現率に有意差を認めず COX 比例ハザードモデルによる解析では転帰に対する影響は弱かった。原因としては解析に含めた人数の違いと統計手法の違いによるものと考えられたが、他の変数と比較した場合には SSTR サブタイプはそれ程強い予後因子ではないものと考えられた。

6-4 本研究で得られた SSTR サブタイプ発現の意義と今後の展望

本研究で明らかとなった NTs における SSTR サブタイプの発現と形態学的分化度および予後との関連について、文献的に報告されている SSTR サブタイプの生物学的特性から考察を加える。

NB の細胞株を使って SSTR サブタイプの研究を行った報告は幾つかあり、SSTR-1, 2 共に細胞増殖抑制作用を有することが示されている。NB の細胞株 SY5Y において SSTR-1, 2 それぞれが、血小板由来増殖因子刺激による MAPK 活性を抑制し DNA 合成能の抑制をもたらしたという報告や⁷³⁾、SSTR-1, 2 それぞれを発現させた NB 細胞株 SKNSH をヌードマウスに移植したところ、それぞれ腫瘍形成までの時間が野生株に比較して有意に延長したという報告がある³²⁾。本

実験 I では、favorable histology group は unfavorable histology group に比べ、免疫組織化学染色法による発現率および半定量的比較とも SSTR-1, 2 の発現が有意に高く、定量的 RT-PCR 法でも SSTR-1 は有意に高く SSTR-2 も高い傾向であった。従って、favorable histology group は unfavorable histology group に比べて細胞増殖が抑制されている状態であったと考えられる。一方、NB の形態学的分化と SSTR サブタイプとの関連に言及した先行研究は見いだせなかった。しかし、SSTR-1、SSTR-2 ノックアウトマウスの実験から、網膜の桿体双極細胞において SSTR-1, 2 とソマトスタチンの均衡が網膜の正常発達に関与している可能性を指摘した報告がある⁷⁴⁾。もしも交感神経節や副腎髄質の正常発達にも SSTR-1, 2 が関わっているのならば、本研究で見られた出生後の交感神経節や副腎髄質、GN/GNB ではほぼ全例に SSTR-1, 2, 4 が見られたのは正常な分化の結果であるのかもしれない。SSTR-4 については、SSTR-4 ノックアウトマウスによる実験から炎症抑制作用を介在するとの報告が見られるが⁷⁵⁾、細胞増殖の抑制や分化に関連する報告は見いだせなかった。そのため本研究で見られた SSTR-4 の発現の意義については解釈が難しいが、SSTR-4 は SSTR-1 と構造やアナログへの結合性が似ていることから⁷⁶⁾SSTR-1 発現に伴って発現が亢進していた可能性も考えられた。

一方で、本研究の SSTR-2 の発現に関しては他の SSTR サブタイプの発現とやや異なる傾向が認められた。中でも、実験 I で死亡例の一部で SSTR-2 の高発現例を認めたことは、これまで述べてきた SSTR の細胞増殖抑制作用と対立する結果と思われた。この点に関して、SSTR-2 遺伝子は 17 染色体長腕に位置することから、NB の染色体および遺伝子異常の中で予後不良因子として知られている 17q gain が SSTR-2 の発現亢進に寄与しているのではないかという指摘がある⁷⁷⁾。その報告によれば、NB50 例の SSTR-2 発現をリアルタイム RT-PCR にて高発現群と低発現群に分けて 17q gain の頻度を調べたところ、高発現群で有意に 17q gain

の頻度が高かったという。本実験の NB 例における 17q gain の有無は不詳であり検討は出来なかったが、そうであれば、NB における SSTR-2 の発現は、多くの場合は細胞増殖抑制が効いている状態を表す予後良好因子であるが、一部の症例では遺伝子異常によって SSTR-2 の発現が亢進した悪性度の高い状態を反映している可能性が推測された。

従来の研究では SSTR アナログの代表であるオクトレオチドが特に SSTR-2 に結合性が高いことから、SSTR-2 が標的とされてきた。そのため、SSTR-2 以外のサブタイプの発現と NB の予後についての関連を検討した報告は見られなかった。本研究にて SSTR-2 以外のサブタイプで予後との関連を明らかにすることで、将来的な multi-receptor targeting somatostatin analogs の適用の可能性に繋がることを期待したが、結果としては、SSTR-2 に次いで発現率が高かった SSTR-1, 4 も予後不良な NB では低発現であるという結論となり、難治例の NB に対する治療の標的には成り得ないものと考えられた。しかし一方で、少数ではあるが悪性度の高い NB において SSTR-2 が過剰発現している例があることが明らかとなり、難治性の NB に対して海外の一部の施設で試験的に行われている PRRT³³⁻³⁵⁾を支持する根拠を与えることが出来た。また、SSTR-2 が治療の標的として有効となれば、現在 NET で使用されているソマトスタチンアナログ製剤をそのまま難治性の NB に適用できる可能性もある。SSTR-2 は他の SSTR サブタイプよりも遥かに多くの研究があり、抗癌剤や oncolytic adenovirus を組み合わせるなどの応用治療的研究も見られることから^{78,79)}、今後治療の選択肢が広がることも期待される。将来的に、難治性の NB においてソマトスタチンアナログ製剤を使用した治療が有効な選択肢の一つとなることを期待したい。

7. 結 語

本研究では NTs における SSTR 全サブタイプの発現を解析し、SSTR-1, 2 の高率な発現と、SSTR-1, 2, 3, 4 の発現が腫瘍細胞の分化や予後と相関し予後良好因子であることを明らかにした。NTs の正常カウンターパート組織においても、未熟な細胞に比較して成熟した細胞に SSTR-1, 2, 3, 4 は高発現の傾向であった。TH、シナプトフィジン、CD44 の発現も予後良好因子と考えられたが、SSTR 発現との関連性が示されたのはソマトスタチンのみであった。SSTR-2 の発現は他の SSTR サブタイプの発現とやや異なる傾向であり、死亡例の一部で SSTR-2 の高発現例が見られたことから、難治性の NB であっても SSTR の発現に応じて治療の適応となる可能性が示唆された。

(実験 I の要旨は、*Acta Histochemica et Cytochemica* 47: 219-229, 2014 にて掲載発表した⁸⁰⁾)

8. 謝 辞

本研究の遂行にあたり、御指導ご鞭撻を賜りました根本則道教授、研究の趣旨をご理解頂き、快くご協力下さいました国立成育医療研究センター病理診断部の中澤温子部長、研究方法をご指導下さいました中西陽子先生、標本作製にご協力下さいました尾花ゆかり技師ならびに板橋病院病理診断科、日本大学病院病理診断科、国立成育医療研究センター病理診断部の技師の皆様に深謝致します。また、大荷澄江前医局長ならびに日本大学病院病理診断科の絹川典子科長を初めとする病理学教室の皆様には、温かく見守って頂き心より感謝致します。最後に、ここまで支えてくれた家族にこの場を借りて感謝の意を表します。

本研究は、成育医療研究開発費（21 指-16）ならびに文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（2010）の援助を一部受けました。

9. 表

表1 ヒト SSTR 各サブタイプの特徴のまとめ ¹⁾¹⁸⁾

	SSTR-1	SSTR-2	SSTR-3	SSTR-4	SSTR-5
位置	14q13	17q24	22q13.1	20p11.2	16p13.3
分子量 (kDa)	53-72	71-95	65-85	45	52-66
G 蛋白結合性	+	+	+	+	+
アデニル酸シクラーゼ ^β 活性	↓	↓	↓	↓	↓
チロシンホスファターゼ ^β 活性	↑	↑	↑	↑	↑
MAPK 活性	↑	↓	↓ ↑	↑	↓
Ca ²⁺ チャネル	↓	↓			
主な体内分布	脳、下垂体 ラ氏島、胃 肝、腎	脳、下垂体 ラ氏島、胃、 腎	脳、下垂体 ラ氏島、胃	脳、胃、 ラ氏島、肺、 胎盤	脳、下垂体 ラ氏島、胃
結合性 (IC ⁵⁰)					
SST-14	0.1-2.26	0.2-1.3	0.3-1.6	0.3-1.8	0.2-0.9
SST-28	0.1-2.2	0.2-4.1	0.3-6.1	0.3-7.9	0.05-0.4
Octreotide	290-1140	0.4-2.1	4.4-34.5	> 1000	5.6-32
Pasireotide (SOM230)	9.3	1.0	1.5	> 100	0.16

表 2 神経芽腫群腫瘍 63 例の臨床情報および病理組織型

組織型 (INPC category / prognostic group)	No.	年齢	性	部位	INPC category subtype	MKI	病期	MYCN 増幅	転帰
Ganglioneuroma	1	14 歳	男	後腹膜	Mature	-	1	未施行	無病生存 8 年
	2	19 歳	男	縦隔	Mature	-	1	未施行	不詳
	3	21 歳	男	縦隔	Mature	-	1	未施行	無病生存 4 年
	4	31 歳	男	副腎	Mature	-	1	未施行	無病生存 2 年
	5	51 歳	男	副腎	Mature	-	1	未施行	不詳
Ganglioneuroblastoma intermixed	1	2 歳	女	右副腎		-	1	無	無病生存 6 年
	2	3 歳	男	後縦隔		-	2A	無	無病生存 20 年
Ganglioneuroblastoma nodular	3*	2 歳	男	左副腎		Low	4	無	無病生存 3.5 年
	4**	3 歳	女	傍脊椎		-	4	無	有病生存 2.5 年
Neuroblastoma/ favorable histology group	1	6 日	女	傍脊椎	Poorly	Low	3	無	無病生存 7 年
	2	16 日	男	後腹膜	Poorly	Low	3	無	無病生存 4 年
	3	3 ヶ月	男	後腹膜	Poorly	Low	1	無	無病生存 2 年
	4	4 ヶ月	男	傍脊椎	Poorly	Low	1	無	無病生存 3 年
	5	4 ヶ月	男	右副腎	Poorly	Low	1	無	無病生存 4 年
	6	6 ヶ月	女	右副腎	Poorly	Intermediate	4S	無	無病生存 4 年
	7	7 ヶ月	男	後縦隔	Poorly	Low	2A	無	無病生存 8 年
	8	7 ヶ月	男	右副腎	Poorly	Low	2B	無	無病生存 17 年
	9	7 ヶ月	男	左副腎	Differentiating	Intermediate	2B	無	無病生存 16 年
	10	7 ヶ月	女	傍脊椎	Poorly	Low	4	無	原病死 1.5 年
	11	8 ヶ月	男	左副腎	Poorly	Intermediate	3	無	不詳
	12	8 ヶ月	男	傍脊椎	Poorly	Low	4S	無	無病生存 19 年
	13	8 ヶ月	女	左副腎	Poorly	Low	1	無	無病生存 11 年

	14	9ヶ月	男	後腹膜	Poorly	Low	3	無	無病生存 12年
	15	9ヶ月	女	右副腎	Poorly	Intermediate	1	無	無病生存 11年
	16	9ヶ月	女	後腹膜	Poorly	Low	2A	無	無病生存 12年
	17	10ヶ月	女	右副腎	Poorly	Low	2B	無	無病生存 2.5年
	18	10ヶ月	女	左副腎	Poorly	Low	2B	無	無病生存 15年
	19	11ヶ月	男	右副腎	Poorly	Low	2B	無	無病生存 1.5年
	20	11ヶ月	女	左副腎	Poorly	Low	1	無	無病生存 12年
	21	12ヶ月	男	傍脊椎	Poorly	Low	3	無	再発後 7年無病生存
	22	12ヶ月	女	後腹膜	Differentiating	Low	1	無	無病生存 8年
	23	13ヶ月	男	後腹膜	Poorly	Low	2	無	無病生存 4年
	24	14ヶ月	女	縦隔	Poorly	Low	4	無	無病生存 3年
	25	15ヶ月	女	右副腎	Differentiating	Low	3	無	無病生存 13年
	26	17ヶ月	女	右副腎	Poorly	Low	4	無	有病生存 2.5年
	27	2歳	男	左副腎	Differentiating	Low	1	無	無病生存 5年
Neuroblastoma/ unfavorable histology group	28	9ヶ月	女	右副腎	Poorly	High	2	有	無病生存 4年
	29	16ヶ月	男	右副腎	Poorly	High	4	有	原病死 1.3年
	30	18ヶ月	男	右副腎	Poorly	High	4	有	無病生存 5年
	31	20ヶ月	男	右副腎	Poorly	High	4	有	無病生存 4.5年
	32	20ヶ月	女	後腹膜	Poorly	Low	3	無	無病生存 5年
	33	21ヶ月	男	後腹膜	Undifferentiated	High	3	有	原病関連死 6ヶ月
	34	23ヶ月	男	右副腎	Poorly	High	4	有	無病生存 2年
	35	2歳	男	後腹膜	Poorly	Low	4	有	無病生存 8年
	36	2歳	男	後腹膜	Poorly	Low	4	無	10ヶ月後担癌状態転院
	37	2歳	男	左副腎	Poorly	Low	4	無	無病生存 9年
	38	2歳	男	上縦隔	Poorly	Intermediate	3	有	無病生存 3.5年

39	2 歳	女	右副腎	Poorly	Intermediate	4	有	無病生存 6 年
40	2 歳	女	縦隔	Poorly	High	4	無	原病関連死 1.8 年
41	3 歳	男	右副腎	Poorly	Low	4	無	原病死 4.3 年
42	3 歳	男	左副腎	Poorly	Intermediate	4	無	有病生存 4 年
43	4 歳	男	左副腎	Poorly	Low	4	無	無病生存 3.5 年
44	4 歳	男	後腹膜	Poorly	High	4	有	原病関連死 1.5 年
45	4 歳	男	後腹膜	Poorly	Low	3	無	無病生存 1.5 年
46	4 歳	女	左副腎	Poorly	High	4	有	原病死 4m
47	5 歳	男	左副腎	Poorly	Low	4	無	再発後 1.8 年 無病生存
48	5 歳	男	右副腎	Poorly	High	4	有	無病生存 9 年
49	5 歳	男	右副腎	Poorly	High	4	無	原病死 3.3 年
50	6 歳	男	後腹膜	Poorly	Intermediate	4	無	有病生存 3 年
51	10 歳	女	リンパ節	Poorly	Intermediate	3	無	原病関連死 2 ヶ月
52	11 歳	男	傍脊椎	Poorly	Intermediate	4	無	1 年後フォロー脱落
53	12 歳	男	後腹膜	Differentiating	Intermediate	4	無	有病生存 2 年
54	12 歳	女	左副腎	Poorly	Low	4	無	原病死 3.3 年

*: GNB nodular with mixed feature with GNB intermixed and NB poorly differentiated subtype,

** : GNB nodular with only GN feature in specimen examined in this study

表 3 一次抗体の詳細

一次抗体	製造元	動物種	Clone / Code	希釈率
SSTR-1	Gramsch	Rabbit	Poly / SS-840	×400
SSTR-2	Abcam	Rabbit	UMB1 / ab134152	×200
SSTR-3	Gramsch	Rabbit	Poly / SS-850	×400
SSTR-4	GeneTex	Rabbit	Poly / GTX70677	×100
SSTR-5	Gramsch	Rabbit	Poly / SS-890	×400

表 4 Immunoreactive score (IRS)

陽性細胞比率	0%	0点
	< 10%	1点
	10~50%	2点
	51~80%	3点
	> 80%	4点
陽性強度	陰性	0点
	弱陽性	1点
	中等度陽性	2点
	強陽性	3点

陽性細胞比率点数 × 陽性強度点数 = IRS (0~12点)

IRS 2以上を陽性と判定した

表 5 ゲノム DNA 除去反応液成分

成分	容量
テンプレート RNA	5 μ l (1 μ g までの total RNA を含む)
gDNA Wipeout Buffer	2 μ l
RNase フリー水	7 μ l
トータル容量	14 μ l

表 6 逆転写反応液成分

成分	容量
〈逆転写反応マスターミックス〉	
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 μ l
Quantiscript RT Buffer	4 μ l
RT Primer Mix	1 μ l
ゲノム DNA 除去反応液	14 μ l
トータル容量	20 μ l

表7 リアルタイム RT-PCR 用プライマー

Target	Primer sequence	Products (bp)
SSTR-1	Forward 5'-tgagtcagctgtcggtcac-3' Reverse 5'-ggaaagagcgcttgaagttg-3'	93
SSTR-2	Forward 5'-ctttgtggtggtcctcacct-3' Reverse 5'-gcagaggacattctggaagc-3'	100
SSTR-3	Forward 5'-ttcctcctaccgettcaa-3' Reverse 5'-ctcctcctcctcctcctc-3'	123
SSTR-4	Forward 5'-tctttgtgctctgctggatg-3' Reverse 5'-ggataaggacacgtggttg-3'	96
SSTR-5	Forward 5'-cccttctcaccgtcaacat-3' Reverse 5'-gttggcgtaggagaggatga-3'	102
GAPDH	Forward 5'-ggaaggtgaaggtcggagtca-3' Reverse 5'-gtcattgatggcaacaatatccact-3'	101

表8 リアルタイム RT-PCR 反应用マスターミックス

成分	容量
SYBR® Green Master Mix	10 μ l / 1sample
Forward primer (10 μ M)	0.2 μ l
Reverse primer (10 μ M)	0.2 μ l
精製水	8.6 μ l
Template cDNA	1 μ l
トータル容量	20 μ l

表 9-1 INPC で分類した SSTR 各サブタイプの陽性数 (陽性率)

	SSTR-1	SSTR-2	SSTR-3	SSTR-4	SSTR-5
GN (n=5)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	2/5 (40%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)
GNB (n=4)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	2/4 (50%)	4/4 (100%)	0/4 (0%)
NB (n=54)	36/54 (66.7%)	44/54 (81.5%)	5/54 (9.3%)	20/54 (37.0%)	0/54 (0%)
<i>Favorable (n=27)</i>	<u>24/27 (88.9%)</u>	<u>25/27 (92.6%)</u>	<u>5/27 (18.5%)</u>	<u>16/27 (59.3%)</u>	
<i>Unfavorable (n=27)</i>	<u>12/27 (44.4%)</u>	<u>19/27 (70.4%)</u>	<u>0/27 (0%)</u>	<u>4/27 (14.8%)</u>	
Total (n=63)	45/63 (71.4%)	53/63 (84.1%)	9/63 (14.3%)	29/63 (46.0%)	0/63 (0%)

表 9-2 NB における生死別 SSTR 各サブタイプ陽性数 (陽性率) (n=53; 転帰不明の 1 例を除く)

	SSTR-1	SSTR-2	SSTR-3	SSTR-4	SSTR-5
Alive (n=43)	31/43 (72%)	35/43 (81.4%)	5/43 (11.6%)	20/43 (46.5%)	0/43 (0%)
Dead (n=10)	4/10 (40%)	8/10 (80%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)

** P<0.01, * P<0.05 with Chi-square test for comparison between the two groups

表 10 死亡例における IRS と mRNA 値

No	IRS		mRNA level		somatostatin	Histology	MKI	MYCN amplification	Duration of disease
	SSTR1	SSTR2	SSTR1	SSTR2					
10	4	2	nd	nd	—	NB, poorly, F	low	—	1.5m
29	0	9	nd	nd	—	NB, poorly, U	high	+	1.3y
33	3	0	0.12	0	—	NB, undiff, U	high	+	6m
40	0	0	nd	nd	—	NB, poorly, U	high	—	1.8y
41	4	6	nd	nd	+ (50%)	NB, poorly, U	low	—	4.3y
44	0	6	nd	nd	—	NB, poorly, U	high	+	1.5y
46	4	3	0.03	0.07	—	NB, poorly, U	high	+	4m
49	0	12	0	0.18	—	NB, poorly, U	high	—	3.3y
51	0	8	nd	nd	—	NB, poorly, U	inter	—	2m
54	0	12	0	0.92	—	NB, poorly, U	low	—	3.3y

Numbers correspond to those in Table 2. All cases were negative for SSTR-3, 4 and 5. The SSTR-2 expressions are well preserved in numbers 29, 49 and 54. IRS: immunoreactive score, nd: not done, NB: neuroblastoma, poorly: poorly differentiated subtype, undiff: undifferentiated subtype, F: favorable histology group, U: unfavorable histology group, MKI: mitosis-karyorrhexis index

表 11 正常副腎髄質、交感神経節を含む対象症例の臨床情報

	No.	胎齢 / 年齢	原疾患
胎芽・胎児例 (6例)	胎-1	6-7 週相当	Abortion
	胎-2	6-7 週相当	Abortion
	胎-3	8-9 週相当	Abortion
	胎-4	9-10 週相当	Abortion
	胎-5	10-11 週相当	Abortion
	胎-6	11-12 週相当	Abortion
腫瘍検体中 副腎髄質 (8例) (No.は表2と 対応する)	6	6ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	9	7ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	15	9ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	17	10ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	18	10ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	19	11ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	25	15ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	27	2歳	Neuroblastoma, favorable histology group
腫瘍検体中 交感神経節 (4例)	7	7ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	12	8ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	18	10ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
	23	13ヶ月	Neuroblastoma, favorable histology group
手術検体中 交感神経節 (4例)	手-1	61歳	Esophageal cancer
	手-2	67歳	Ovarian cancer
	手-3	66歳	Prostatic cancer
	手-4	72歳	Prostatic cancer

表 12 胎芽・胎児例における SSTR 各サブタイプの陽性数および染色性

	SSTR-1	SSTR-2	SSTR-3	SSTR-4	SSTR-5
副腎髄質 (n=6)	6/6 (100%)	0/6 (0%)	1/6 (16.7%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
	弱 (4 例; 胎-1,2,3,6) 中 (2 例; 胎-4,5)		中 (1 例; 胎-5)		
交感 神経節 (n=6)	6/6 (100%)	0/6 (0%)	1/6 (16.7%)	6/6 (100%)	0/6 (0%)
	中 (4 例; 胎-2,3,4,5) 弱 (2 例; 胎-1,6) (胎-5 以外は、細胞質という より細線維に陽性)		中 (1 例; 胎-5)		

表 13 出生後例における SSTR 各サブタイプの陽性数および染色性

	SSTR-1	SSTR-2	SSTR-3	SSTR-4	SSTR-5
副腎髄質 (n=8)	8/8 (100%)	7/8 (87.5%)	3/8 (37.5%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)
	強 (6 例) 中 (1 例) 弱 (1 例)	弱 (6 例) 中 (1 例)	弱 (2 例) 中 (1 例)	中 (4 例) 弱 (4 例)	
	瀰漫性～約 60%	約 60%～数%	瀰漫性	瀰漫性	
交感 神経節 (n=8)	8/8 (100%)	7/8 (87.5%)	3/8 (37.5%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)
	強 (6 例) 中 (2 例)	中 (6 例) 強 (1 例)	弱 (2 例) 中 (1 例)	中 (4 例) 弱 (4 例)	
	瀰漫性～約 60%	約 70～10%	約 80～30%	瀰漫性～ 約 50%	

表 14 使用抗体および条件

一次抗体	製造元	動物種	Clone / Code	抗原賦活 処理	希釈 率	二次抗体 (製造元)
Somatostatin	Dako	Rabbit	Poly / A566	- / - / -	× 500	Histofine (Nichirei)
Synaptophysin	Dako	Mouse	Poly / A0010	CB / AC / 10min	× 100	Histofine (Nichirei)
Thyrosine hydroxylase	Millipore	Rabbit	Poly / #AB152	CB / boil / 20min	× 500	Histofine (Nichirei)
CD44 (H-CAM)	Leica Biosystems	Mouse	DF1485 / NCL-CD44-2	CB / boil / 20min	× 300	Histofine (Nichirei)
PHOX2B (H-20)	Santa Cruz Biotechnology	Goat	Poly / sc-13224	CB / boil* / 40min	× 40	Histofine* (Nichirei)
SOX10 (N-20)	Santa Cruz Biotechnology	Goat	Poly / sc-17342	CB / boil* / 40min	× 100	Histofine* (Nichirei)

CB: citrate buffer pH6.0, boil: boil using water bath at 95°C or *98°C, AC: Autoclave at 105°C, Histofine: Simple Stain MAX PO (MULTI), Histofine*: Simple Stain MAX-PO(G)

表 15 実験Ⅲで検索した蛋白や転写因子の免疫組織化学法による発現率

抗体名	腫瘍組織 (n=63)	正常カウンターパート組織			
		出生後例 (各 n=8)		胎児例 (n=6)	
		副腎髄質	交感神経節	副腎髄質	交感神経節
ソマトスタチン	11.1% (7/63) 全例，部分的細胞質陽性像。 分化した大型の細胞に陽性を示す傾向。	13% (1/8)	0% (0/8)	0% (0/6)	0% (0/6)
シナプトフィジン	95.2% (60/63) 神経節様に分化した細胞では細胞質に強弱様々。NB では神経細線維に陽性。	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (6/6)	100% (6/6)
TH	88.9% (56/63) 神経節様に分化した細胞では細胞質に強弱様々。NB では神経細線維に陽性。	100% (8/8)	100% (8/8)	100% (6/6)	100% (6/6)
CD44	50.8% (32/63) NB で神経細線維に陽性。	0% (0/8)	25% (2/8)	0% (0/6)	0% (0/6)
PHOX2B	98.4% (62/63) 瀰漫性に核陽性。NB の方が GNB/GN よりも瀰漫性に強陽性を示す傾向。	100% (8/8)	75% (6/8)	50% (3/6)	67% (4/6)
SOX10	0% (0/63) 但し、間質シュワン様細胞や隔壁内の紡錘形細胞に核陽性。	0% (0/8)	0% (0/8)	17% (1/6)	67% (4/6) 散在性核弱陽性。

表 16 COX 比例ハザードモデルによる単変量および多変量解析の結果

単変量解析	p 値	ハザード比	95%信頼区間
TH (陰性 / 陽性)	0.000	0.084	0.022-0.317
synaptophysin (陰性 / 陽性)	0.001	0.071	0.016-0.325
MKI (低 / 中 / 高)	0.006	2.824	1.353-5.895
NB subtype (differentiating / poorly / undiff)	0.010	16.532	1.974-138.434
CD44 (陰性 / 陽性)	0.013	0.074	0.009-0.583
INPC 予後分類 (favor / unfavor)	0.025	10.668	1.346-84.566
臨床病期 (1 / 2 / 3 / 4)	0.029	3.727	1.142-12.163
年齢 (1.5 才未満 / 以上)	0.048	4.788	1.015-22.594
SSTR-1 (陰性 / 陽性)	0.095	0.341	0.096-1.208
MYCN 増幅 (陰性 / 陽性)	0.168	2.438	0.687-8.647
somatostatin (陰性 / 陽性)	0.753	1.394	0.176-11.043
SSTR-2 (陰性 / 陽性)	0.861	0.870	0.184-4.106
SSTR-3 (陰性 / 陽性)	-	-	-
SSTR-4 (陰性 / 陽性)	-	-	-
PHOX2B (陰性 / 陽性)	-	-	-
多変量解析			
TH	0.016	0.177	0.043-0.728
NB subtype	0.065	13.765	0.853-222.079
臨床病期	0.068	5.255	0.883-31.260

(SSTR-3, 4, PHOX2B については、回帰式が成立しなかった)

poorly: poorly differentiated, undif: undifferentiated, favor: favorable histology group, unfavor: unfavorable histology group

10. 図

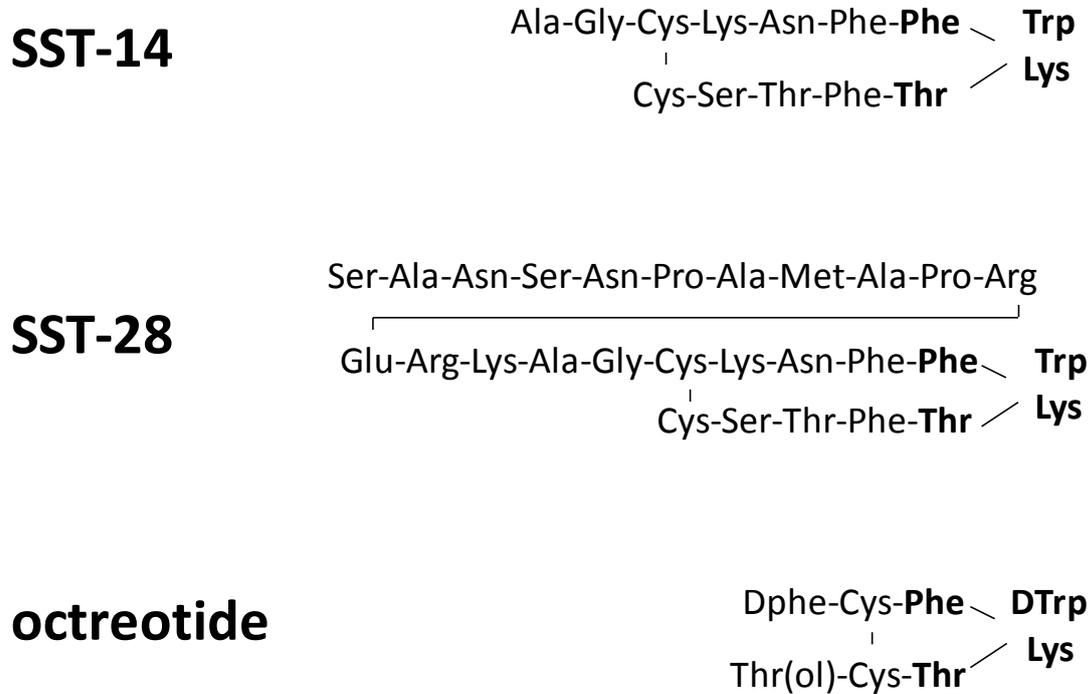
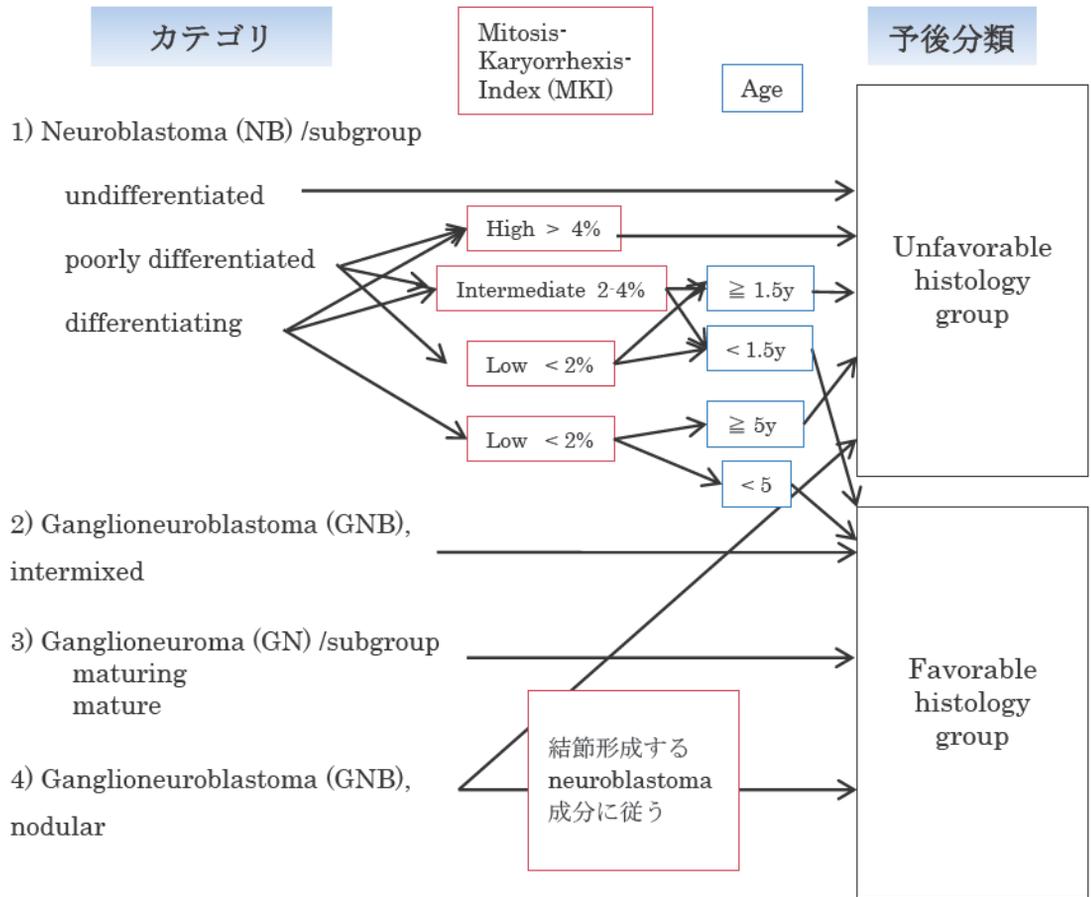
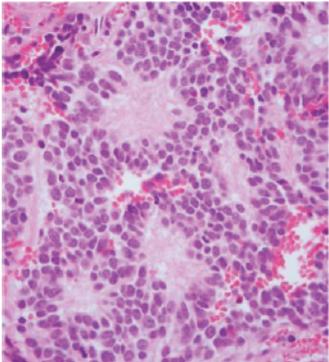
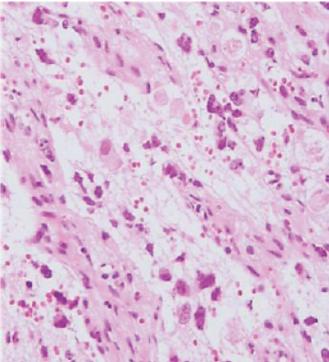
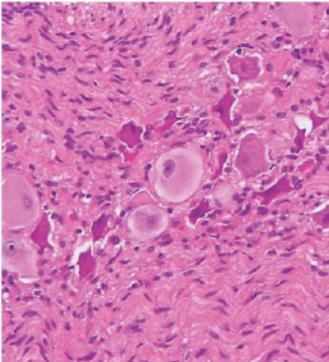


図1 ソマトスタチンおよびオクトレオチドの構造式¹⁾

ソマトスタチン(SST-14)に見られるβターンを含むアミノ酸残基 Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹, Thr¹⁰ の部位が生物学的活性に必要とされ、アナログ製剤の開発においても保持される。

図2 INPCについて



<p>1) NB: 神経芽細胞の増殖が主体。間質にシュワン様細胞は認められないか、わずか。</p>	<p>2) GNB, intermixed: 間質にシュワン様細胞が50%以上あり、神経芽細胞または神経節様細胞の増殖巣がある。</p>	<p>3) GN: シュワン様細胞からなる間質が腫瘍の大部分を占め、神経節様細胞が散在性に存在する。</p>
		

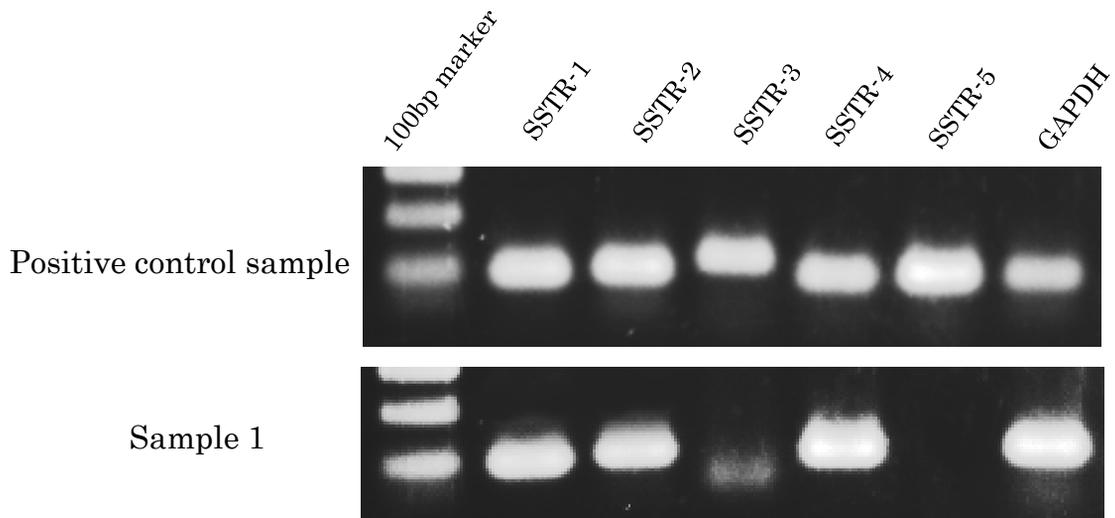


図 3 アガロースゲル電気泳導にて、定量的RT-PCR産物からターゲットを分離した（SSTR-1: 93bp, SSTR-2: 100bp, SSTR-3: 123bp, SSTR-4: 96bp, SSTR-5: 102bp, GAPDH: 101bp）。

陽性対照では、SSTR全サブタイプの発現が見られる。Sample 1は、No.26（表2）の症例であり、SSTR-1, 2, 4の発現が確認される。陽性対照は、NETのホルマリン固定パラフィンブロックから本実験と同じ手法にてmRNA抽出しRT-PCRを行ったものである（ゲル濃度2%, SYBR® Greenにて染色）。

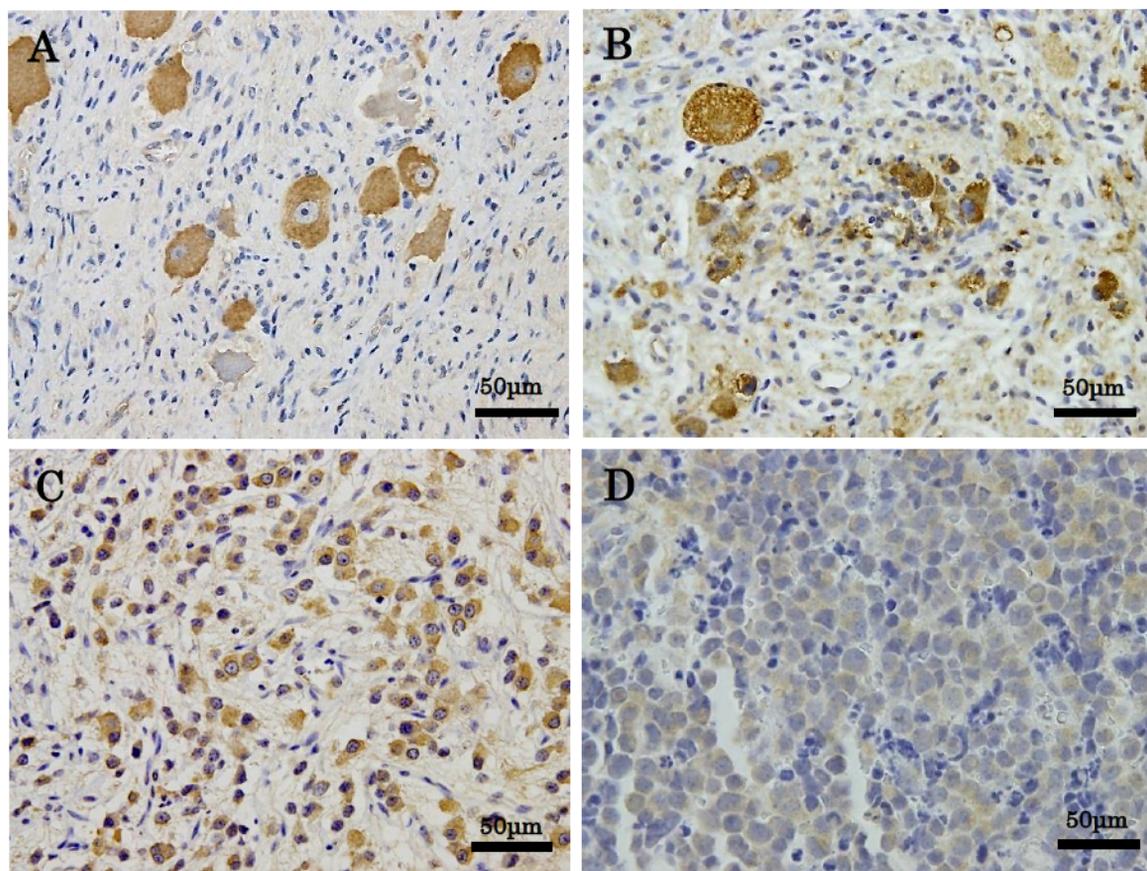


図4 SSTR 免疫組織化学染色陽性例

AはGN例、**B**はGNB例（intermixed例、SSTR-3のみnodular例）、**C**はNB, favorable histology group例、**D**はNB, unfavorable histology group例。

図4-1 SSTR-1 陽性例

A, B, C全て、大部分の腫瘍細胞の細胞質に強陽性を示した。IRS 12点。
Dは、大部分の腫瘍細胞の細胞質に弱陽性を示した。IRS 4点。

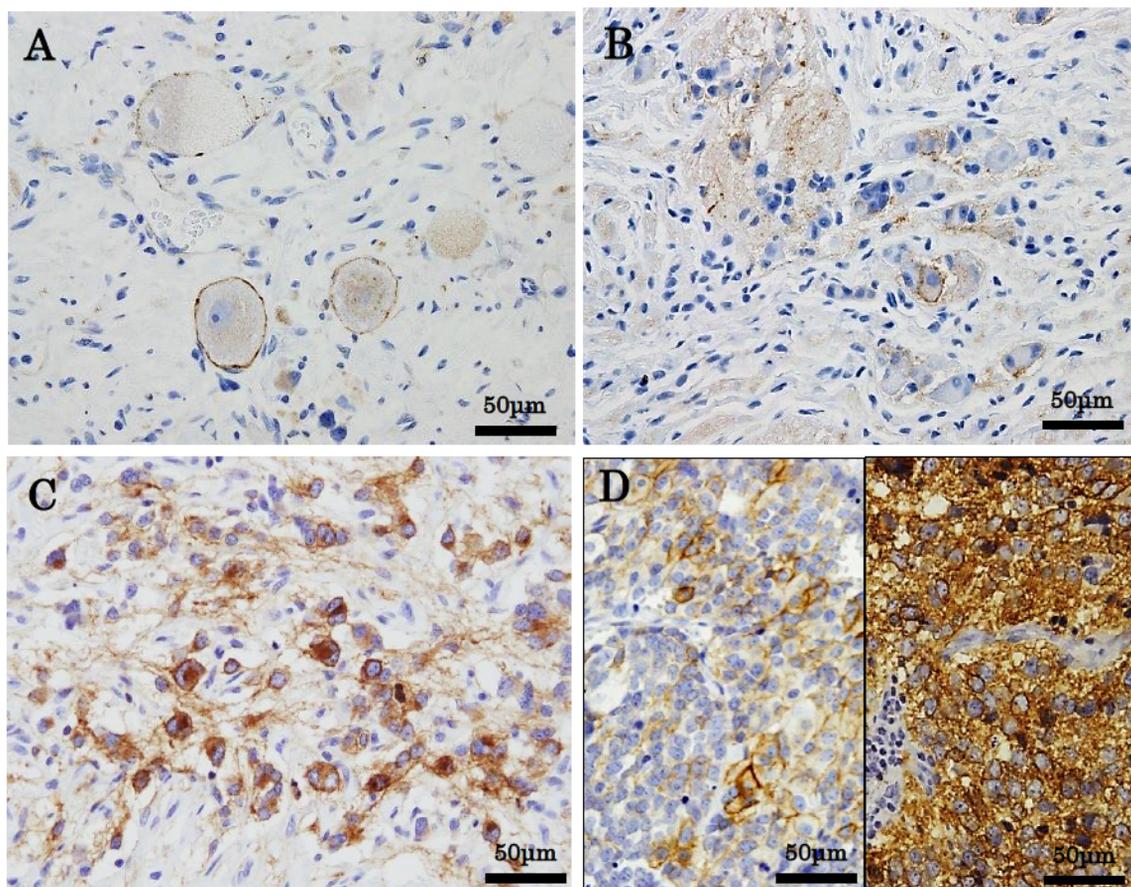


図4-2 SSTR-2 陽性例

Aは、半分をやや超える腫瘍細胞の細胞膜に中等度陽性を示した。IRS 6点。**B**は、20%程度の腫瘍細胞の細胞膜に中等度の陽性像を認めた。IRS 4点。

Cは、大部分の腫瘍細胞の細胞膜および細胞質に強陽性を示し、IRS 12点。**D**

(左)は、一部の腫瘍細胞の細胞膜に様々な程度の陽性を示し、IRS 3点。**D** (右)は、(左)とは異なる症例で、大部分の腫瘍細胞の細胞膜および細胞質に強陽性を示した。IRS 12点。**D** (左)、(右)ともに死亡例。

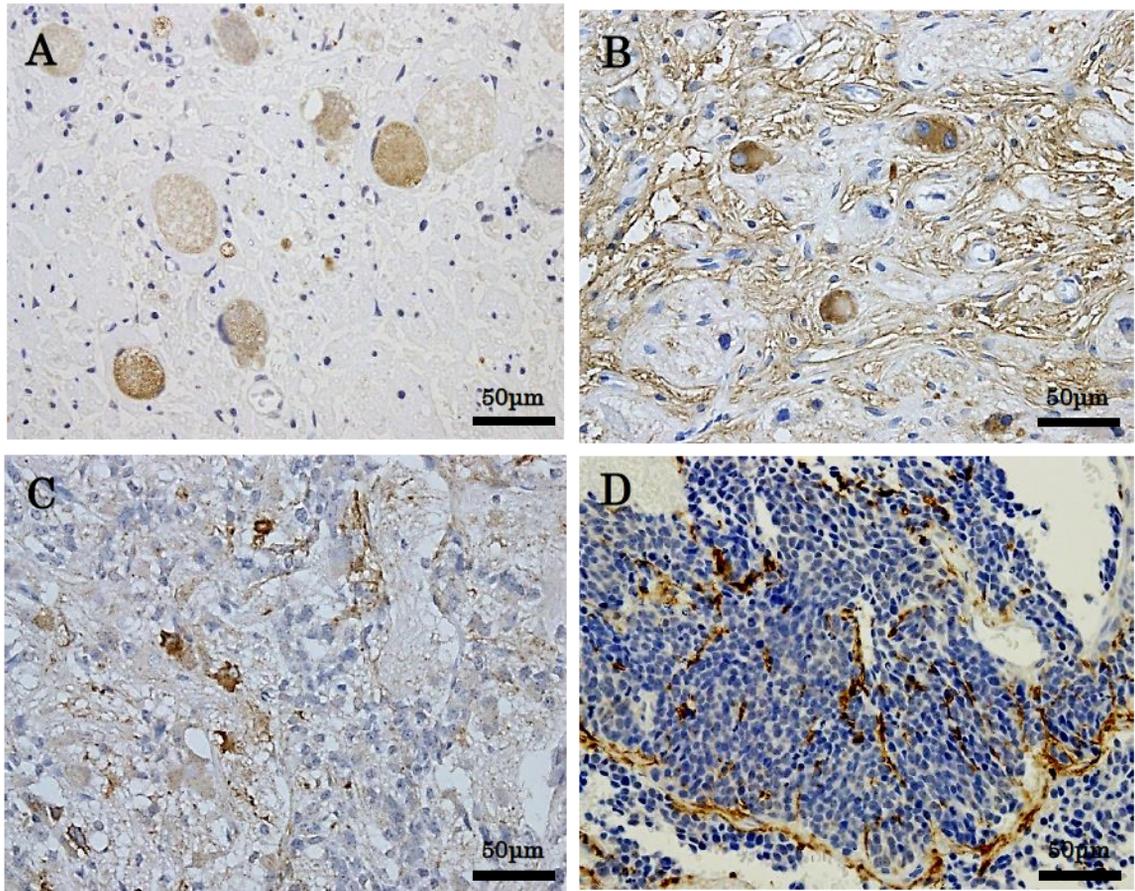


図4-3 SSTR-3 陽性例

Aは、半分以上の腫瘍細胞に中等度の細胞質陽性像を示した。IRS 6点。

Bは、明瞭な細胞質陽性像を示す腫瘍細胞が見られたが、全体の10%未満であった。IRS 3点。

Cは、全体の数%程度の大型の分化の良い腫瘍細胞のみに明瞭な細胞質陽性像を認めた。IRS 2点。

Dは、間質に非特異的陽性を認めるのみで腫瘍細胞自体は陰性であった。IRS 0点

(NB, unfavorable histology groupは、全例、SSTR-3 陰性であった)。

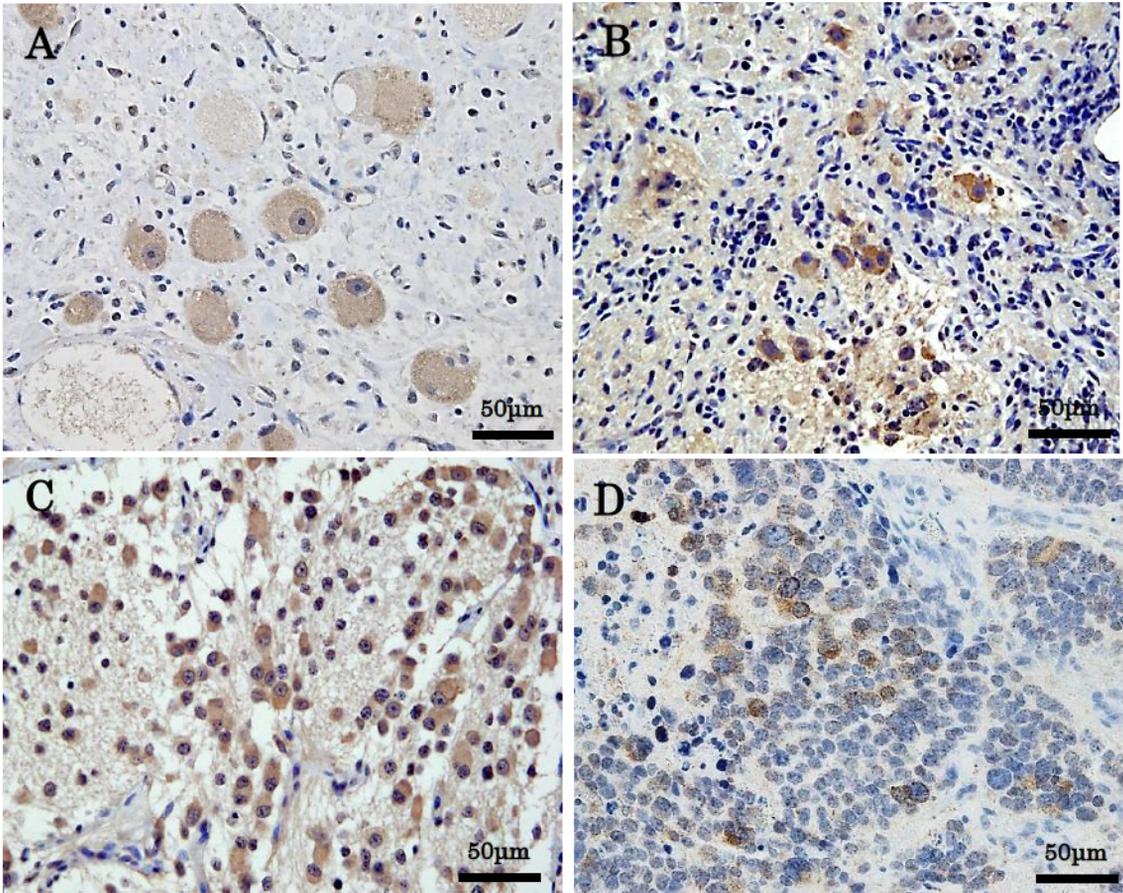


図4-4 SSTR-4 陽性例

Aは大部分の腫瘍細胞の細胞質に中等度陽性を示した。IRS 8点。**B**は細線維の非特異的染色を背景に、半分以上の腫瘍細胞に細胞質陽性像を認めた。IRS 6点。**C**は、細線維の非特異的染色を背景に、大部分の腫瘍細胞の細胞質が陽性であった。IRS 8点。**D**は、明瞭な細胞質陽性像を一部の腫瘍細胞に認めた。腫瘍細胞全体の10%未満であった。IRS 3点。

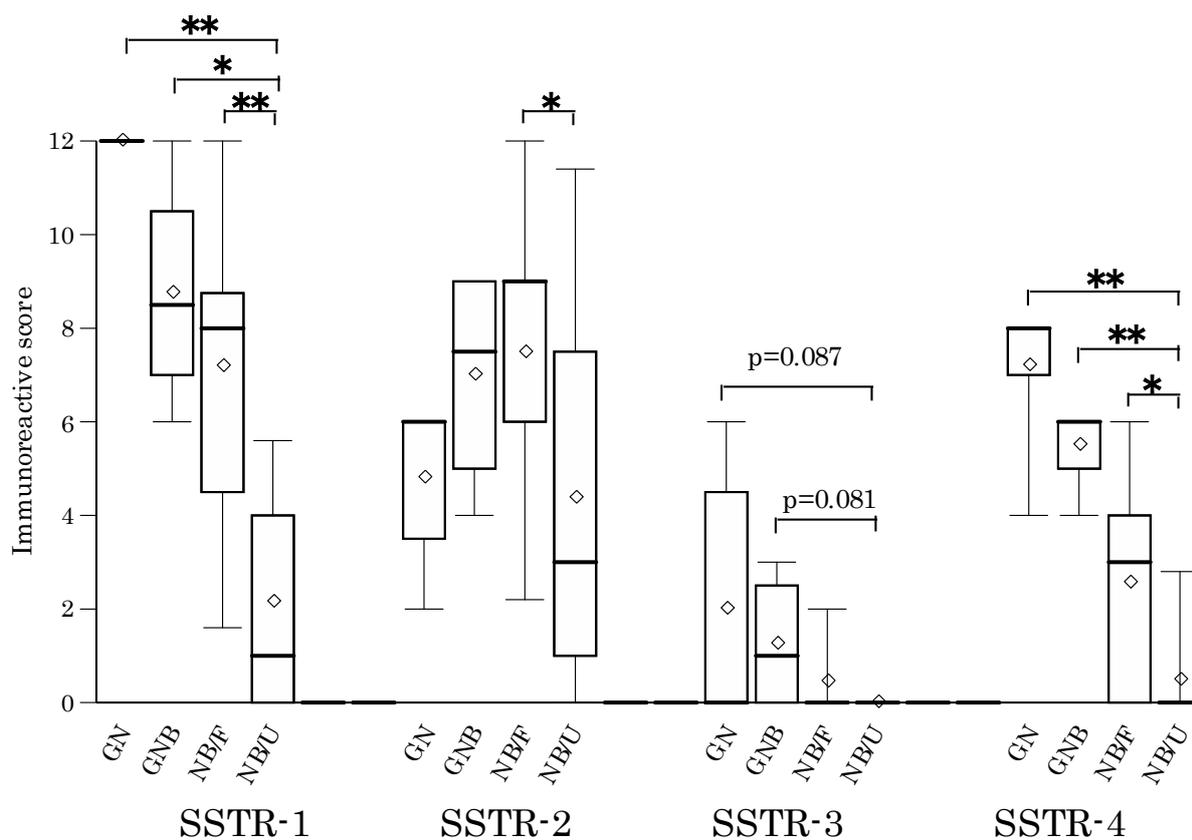


図 5 免疫組織化学法による SSTR-1, 2, 3, 4 の発現を IRS にて半定量化し、INPC 別に比較した。SSTR-5 は全例陰性であった。SSTR-1, 3, 4 において、GN (n=5) と GNB (n=4) は、NB よりも高スコアの傾向を示した。NB/F (favorable histology group with NB, n=28) は、NB/U (unfavorable histology group with NB, n=28) よりも、SSTR-1, 2, 3, 4 全てにおいて高スコアの傾向を示し、SSTR-1, 2, 4 では有意差を認めた。

**p<0.01, *p<0.05 by Kruskal-Wallis test and the Steel multiple comparison procedure. The bottom of each box is the 25th percentile, the top is the 75th percentile and the line in the middle is the 50th percentile. Upper and lower horizontal lines are the 90th and 10th percentiles, respectively. Diamond shapes represent mean values.

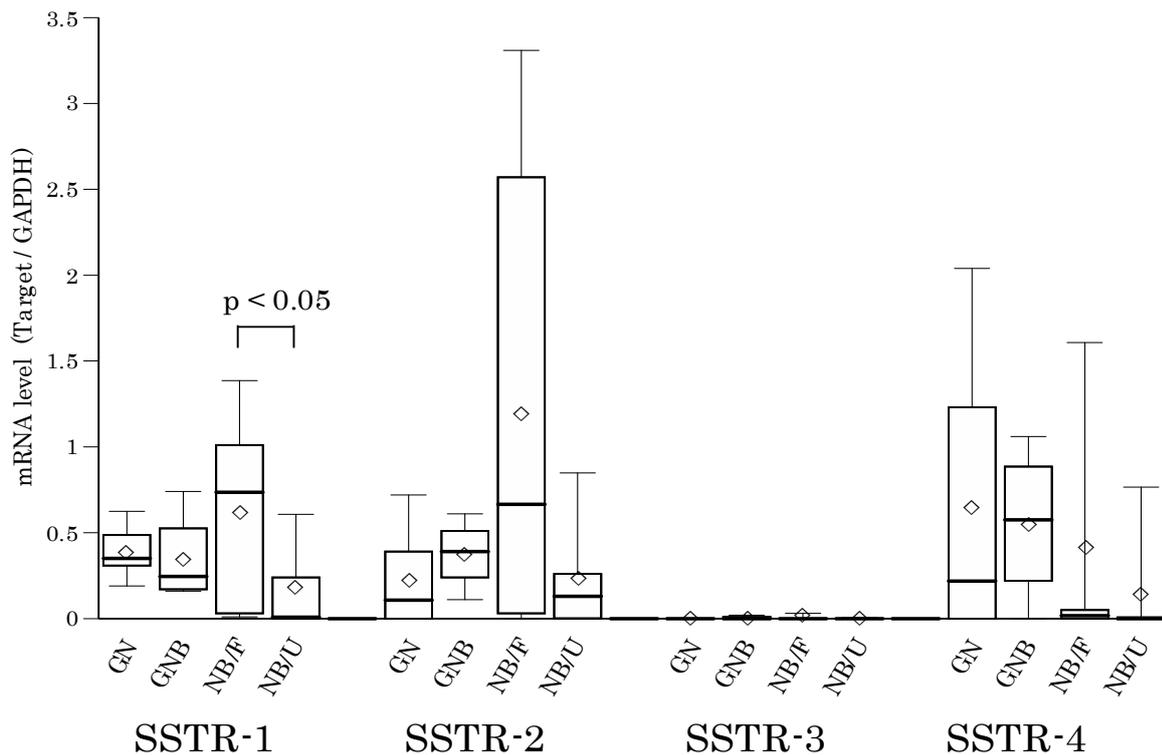


図 6 リアルタイム RT-PCR による SSTR-1, 2, 3, 4 の発現量を INPC 別に比較した。SSTR-5 は全例陰性であった。SSTR-4 で、GN (n=4), GNB (n=5) の発現量は、NB に比べ高い傾向を認めたが、それ以外のサブタイプでは、GN, GNB の発現量が全体に低く、INPC カテゴリの違いによる一定の傾向は見られなかった。NB においては、ばらつきが大きいものの、SSTR-1, 2, 4 において、NB/F (favorable histology group with NB, n=14) の方が、NB/U (unfavorable histology group with NB, n=14) に比べて発現量が高い傾向を認め、SSTR-1 では有意差を認めた。

Kruskal-Wallis test with the Steel multiple comparison procedure was done. The bottom of each box is the 25th percentile, the top is the 75th percentile and the line in the middle is the 50th percentile. Upper and lower horizontal lines are the 90th and 10th percentiles, respectively. Diamond shapes represent mean values.

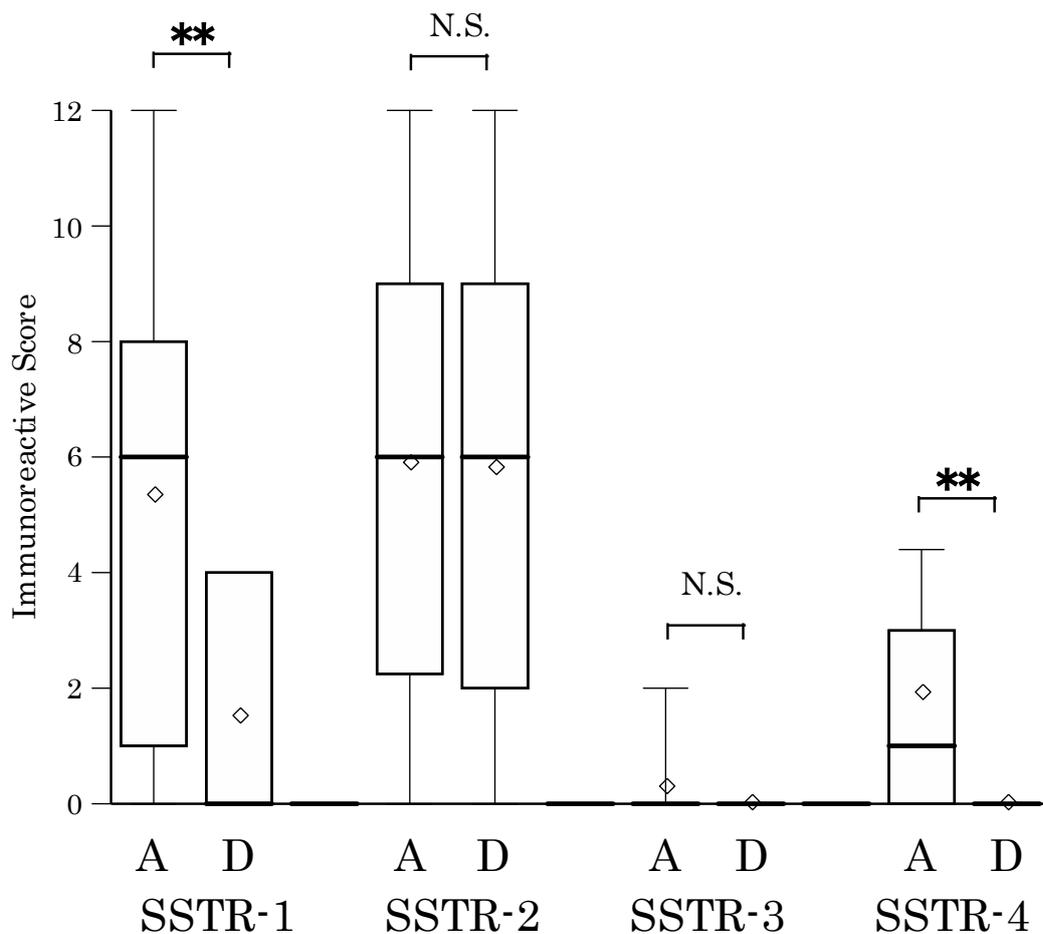


図 7 SSTR 各サブタイプの IRS の点数を転帰別に比較した。転帰を追跡できた NB 53 例を用いた。生存群 (A; n=43) では SSTR-1, 2, 4 の発現が、比較的によく保たれており、SSTR-1, 4 で、死亡群 (D; n=10) に比べて有意に高かった。SSTR-2 に関しては、死亡群でも点数が高く、ほとんど差を認めなかった。

Mann-Whitney U test was done. The bottom of each box is the 25th percentile, the top is the 75th percentile and the line in the middle is the 50th percentile. Upper and lower horizontal lines are the 90th and 10th percentiles, respectively. Diamond shapes represent mean values.

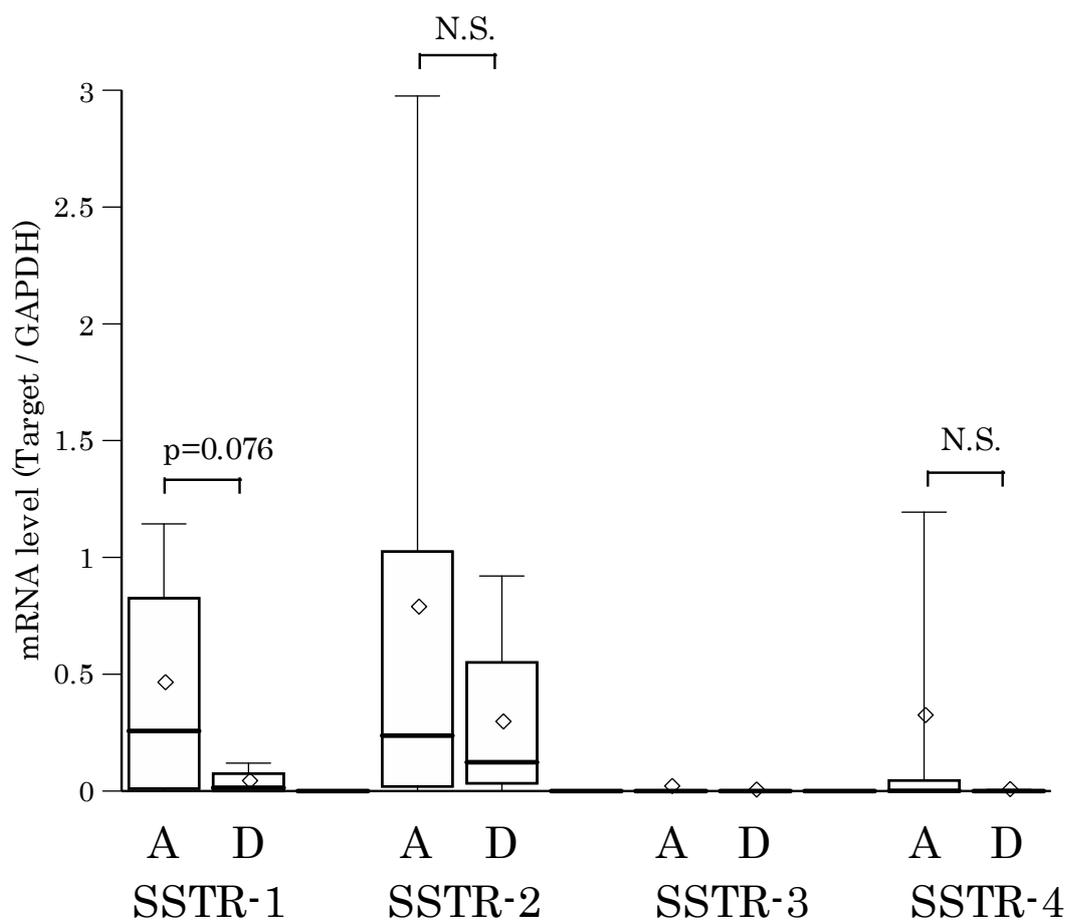


図 8 SSTR 各サブタイプの mRNA 量を転帰別に比較した。NB 28 例を用いた。生存群 (A; n=24) では SSTR1, 2, 4 の発現が、死亡群 (D; n=4) に比べて高い傾向を認めたが、有意差は認めなかった。

Statistical analysis was done with the Mann-Whitney U test. The bottom of each box is the 25th percentile, the top is the 75th percentile and the line in the middle is the 50th percentile. Upper and lower horizontal lines are the 90th and 10th percentiles, respectively. Diamond shapes represents mean values.

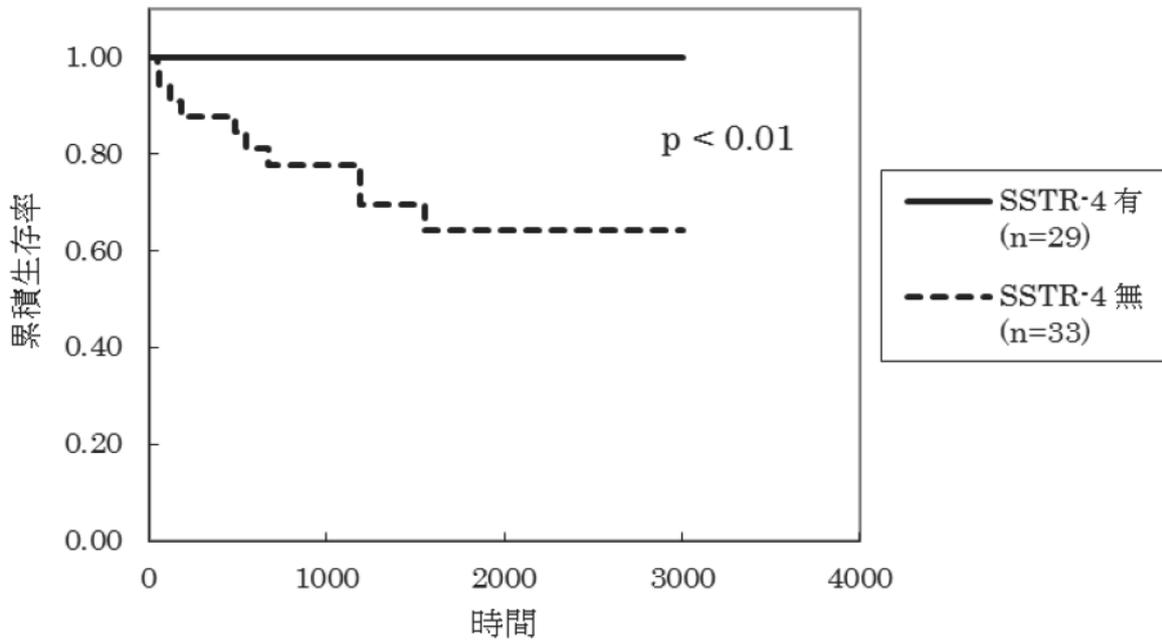
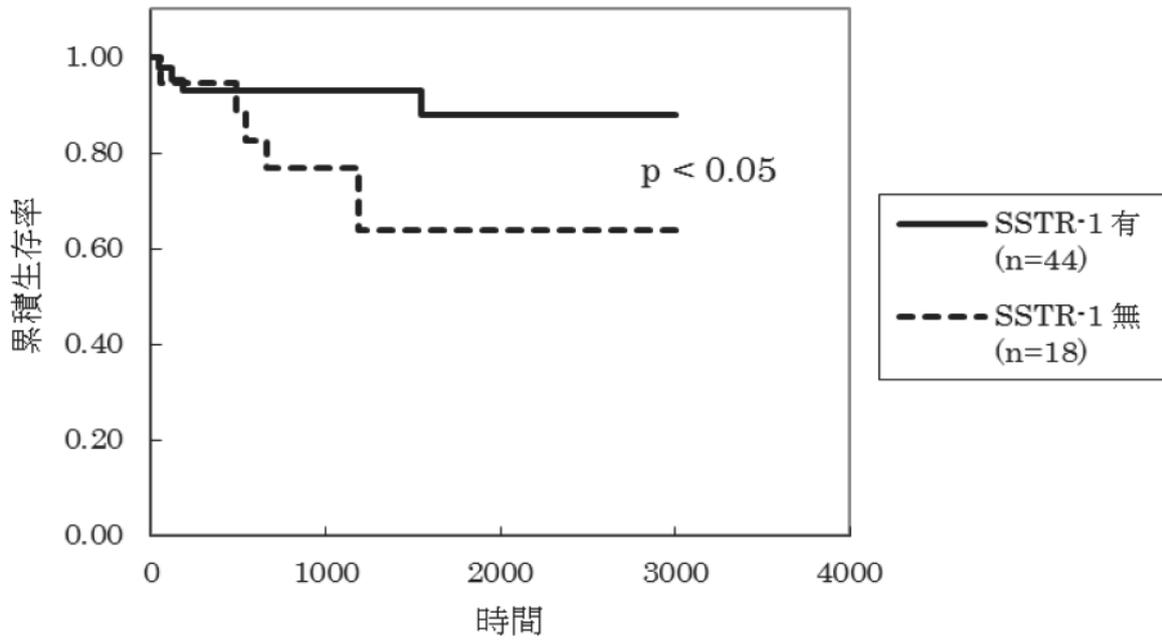


図 9 Kaplan-Meier 生存曲線

上図は SSTR-1、下図は SSTR-4 の免疫組織化学染色発現別での生存曲線。

転帰追跡できた NTs 62 例での解析。比較検定は、Log-rank test を使用。

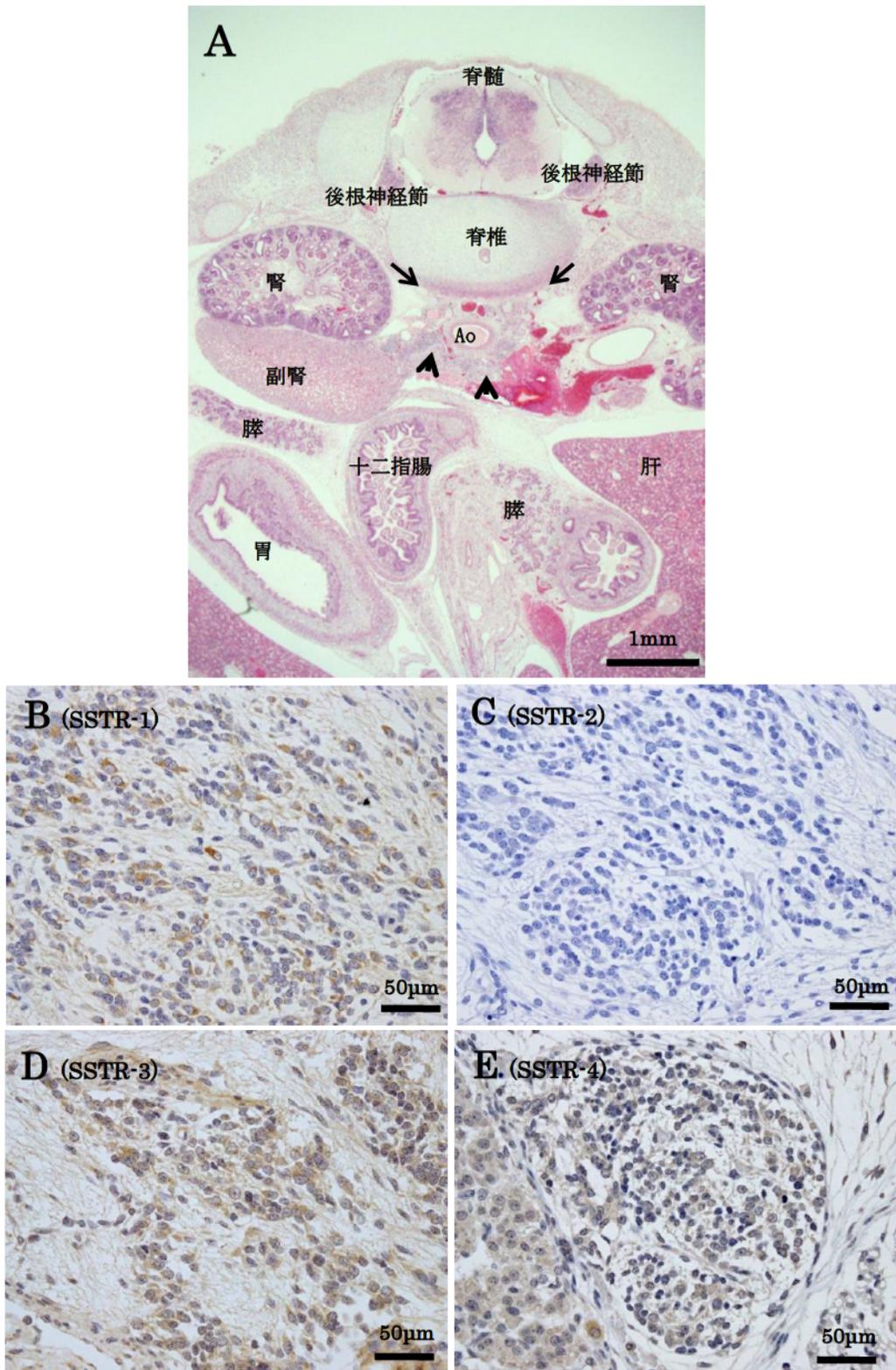


図10 胎児例におけるSSTR各サブタイプの免疫組織化学染色例
AはHE染色（矢印は交感神経幹交感神経節、矢頭は大動脈前交感神経節）、
BはSSTR-1、**C**はSSTR-2（陰性）、**D**はSSTR-3、**E**はSSTR-4の大動脈前交感神経節（全て、胎-5；胎齢10-11週相当の症例）。

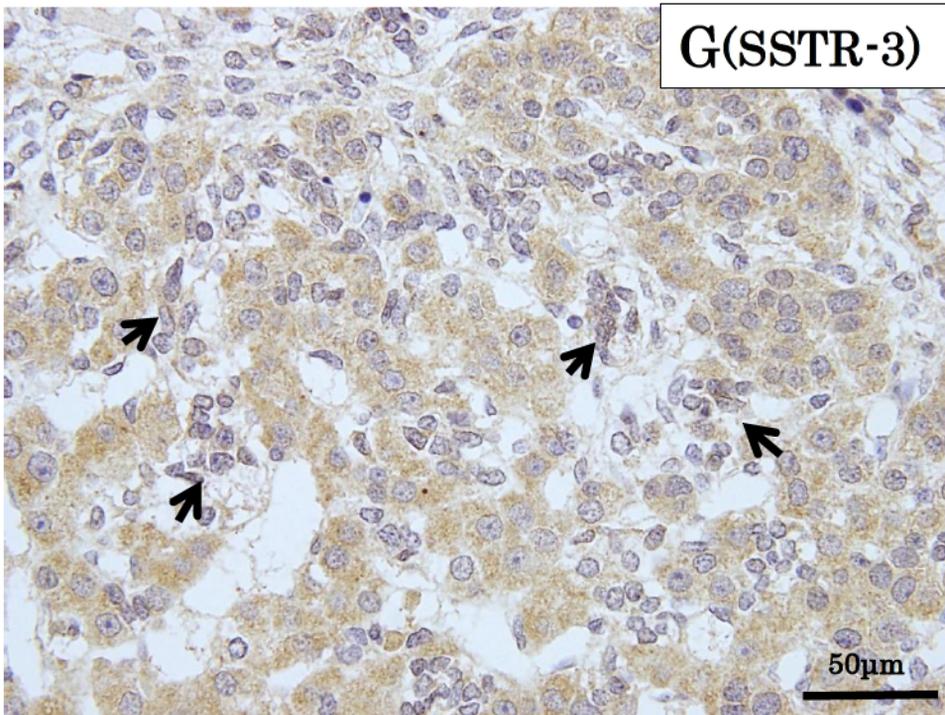
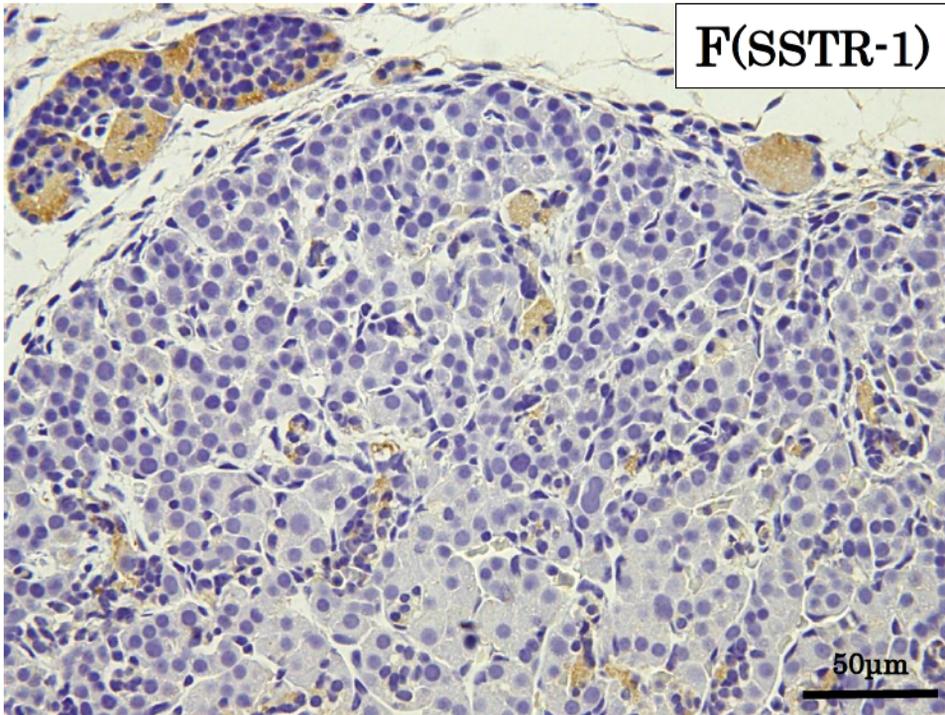


図10 続き

FはSSTR-1、**G**はSSTR-3の副腎髄質細胞陽性例。

Fは胎-4（胎齢9-10週相当）。周囲の交感神経節から、副腎内へ入りこむように髄質細胞が散見される。細胞質が不明瞭であるが陽性。

Gは胎-5（胎齢10-11週相当）。矢印が髄質細胞。皮質細胞も陽性を示し識別し難いものの、髄質細胞陽性と判定された一例。

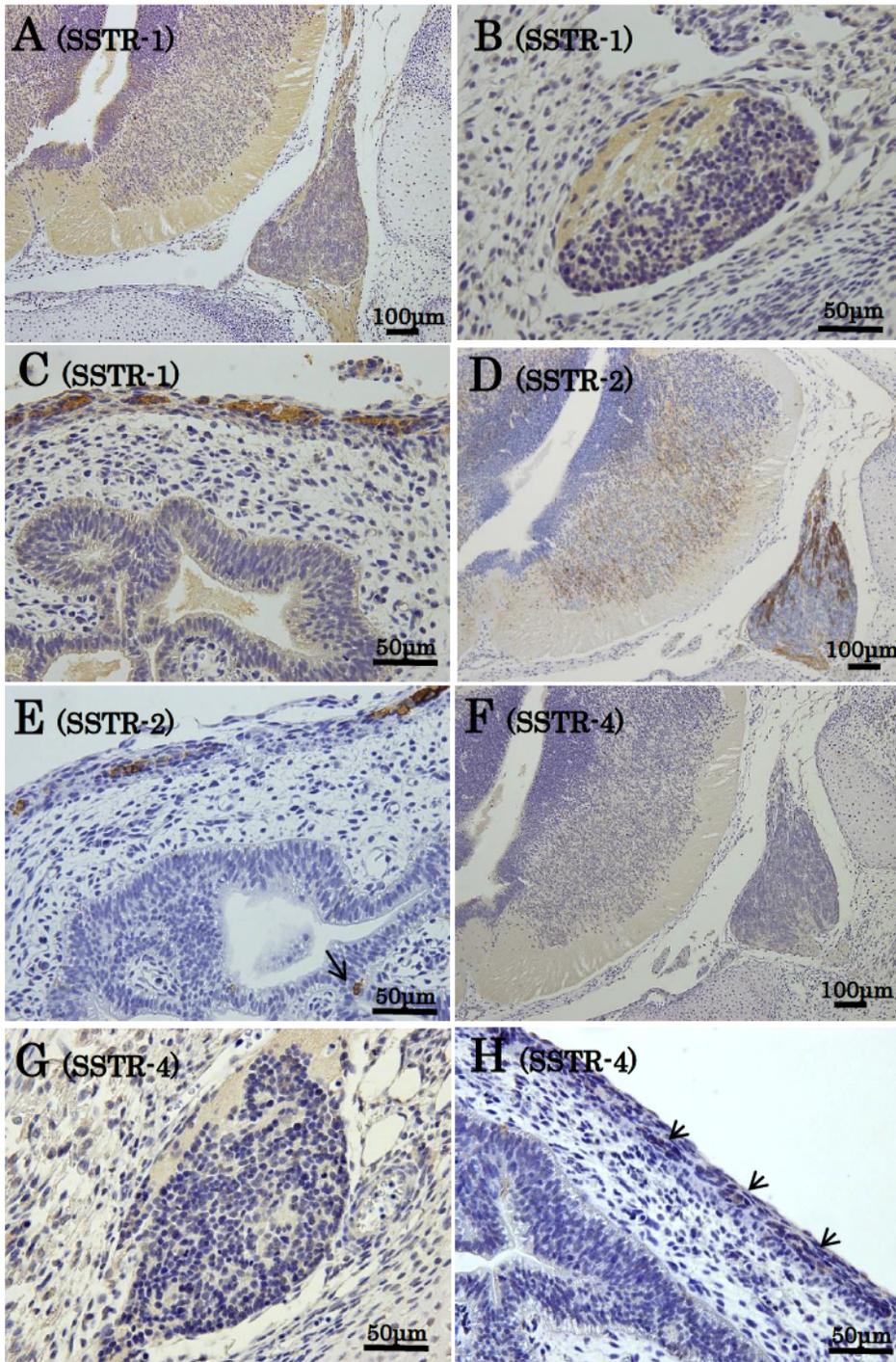


図10 続き その他、代表的な陽性部位 (全て胎-1 ; 胎齢6-7週相当)
 SSTR-1は、脊髓～末梢神経にかけて広く陽性。脊髓～後根神経節 (A)、交感神経節 (B : 神経節細胞がまだ小型で細胞質不明瞭)、小腸筋間神経叢 (C)。
 SSTR-2は、脊髓～後根にかけての神経線維 (D)と、小腸筋間神経節 (E)に陽性。稀に、粘膜上皮にも陽性細胞が見られた (矢印)。
 SSTR-4は、脊髓～末梢神経にかけて広く、かろうじて判定できる程度の弱陽性を示した。脊髓～後根神経節 (F)、交感神経節 (G : 神経節細胞は小型で細胞質不明瞭)、小腸筋間神経叢 (H)。

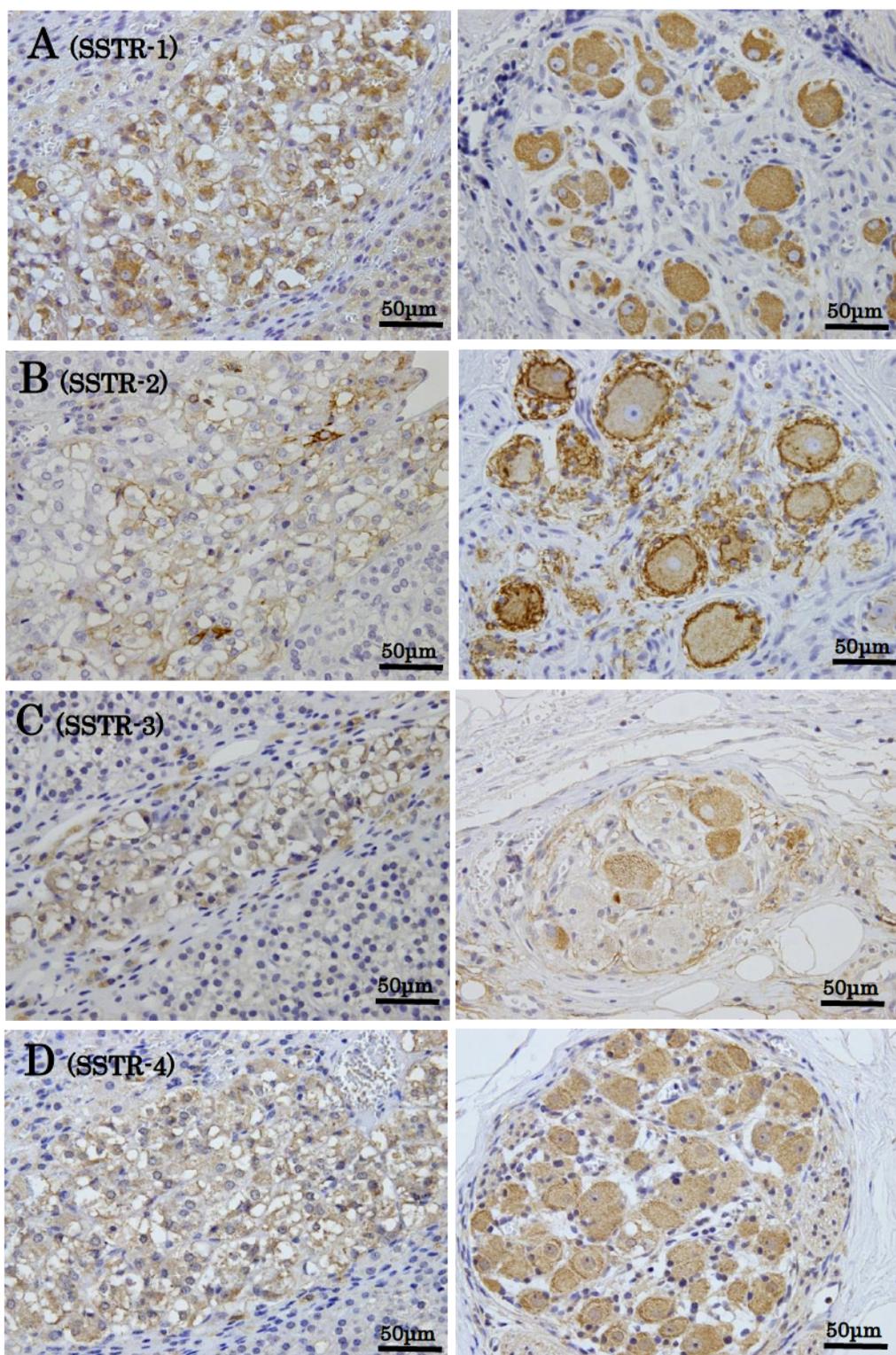


図11 出生後例のSSTR各サブタイプの免疫組織化学染色陽性例

AはSSTR-1、BはSSTR-2、CはSSTR-3、DはSSTR-4

左側が正常副腎髄質、右側が正常交感神経節。

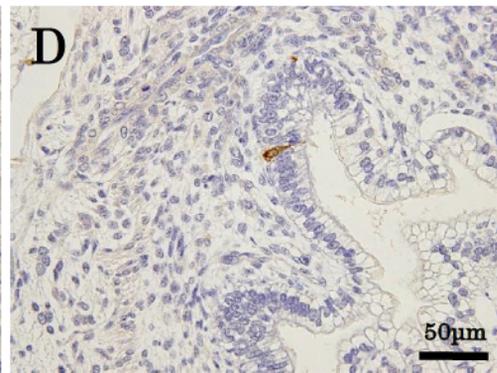
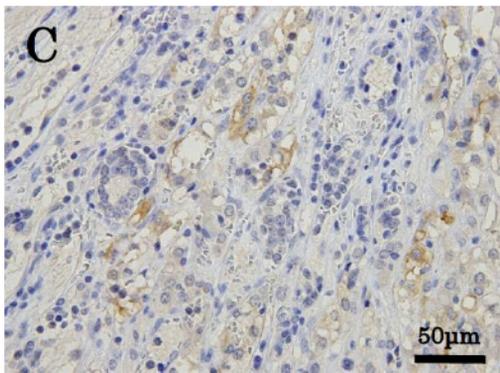
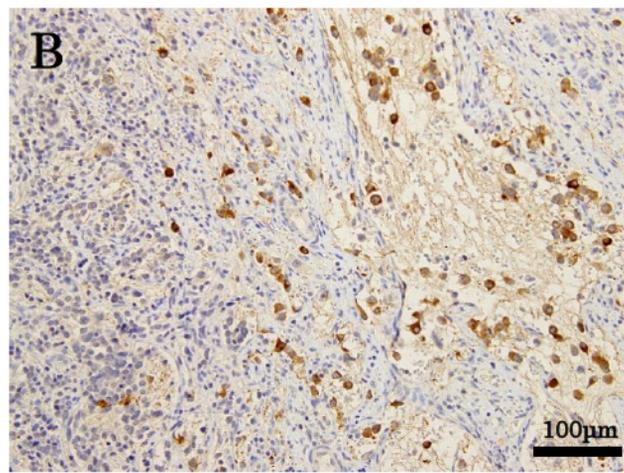
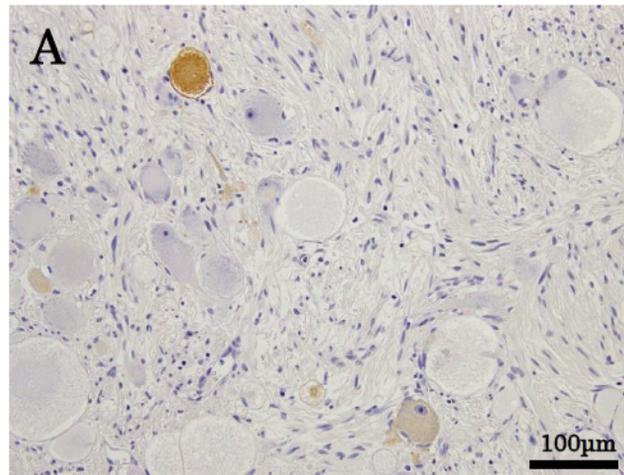


図12 SSTR以外の蛋白や転写因子の陽性例

図12-1 ソマトスタチン

A: GN症例。数%の腫瘍細胞の細胞質に陽性。

B: NB, favorable histology group症例。より分化して見える腫瘍細胞（右半分）の方のみに、陽性を示す。

C: 腫瘍内に見られた正常副腎髄質、10%程度の細胞に陽性。

D: 胎児例（胎-5；胎齢10-11週）では、小腸上皮内の基底顆粒細胞と考えられる細胞のみ陽性。

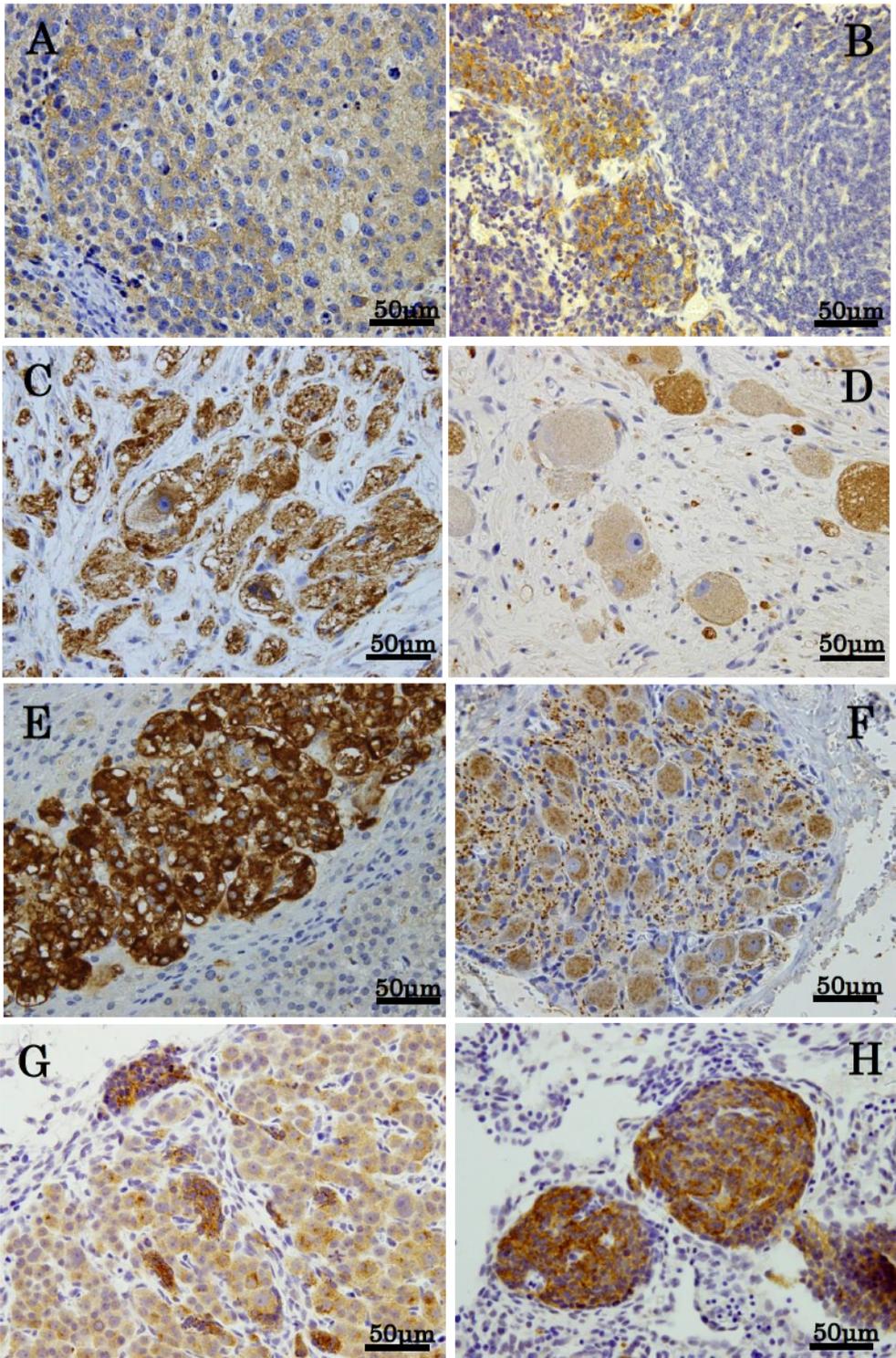


図12-2 シナプトフィジン

腫瘍、正常カウンターパート組織とも、ほぼ全症例で陽性。

AはNB, favorable histology group、**B**はNB, unfavorable histology group、

CはGNB、**D**はGN、**E**は副腎髄質、**F**は交感神経節、

Gは胎芽副腎髄質、**H**は胎芽交感神経節（**G, H**は共に胎-1；胎齢6-7週）。

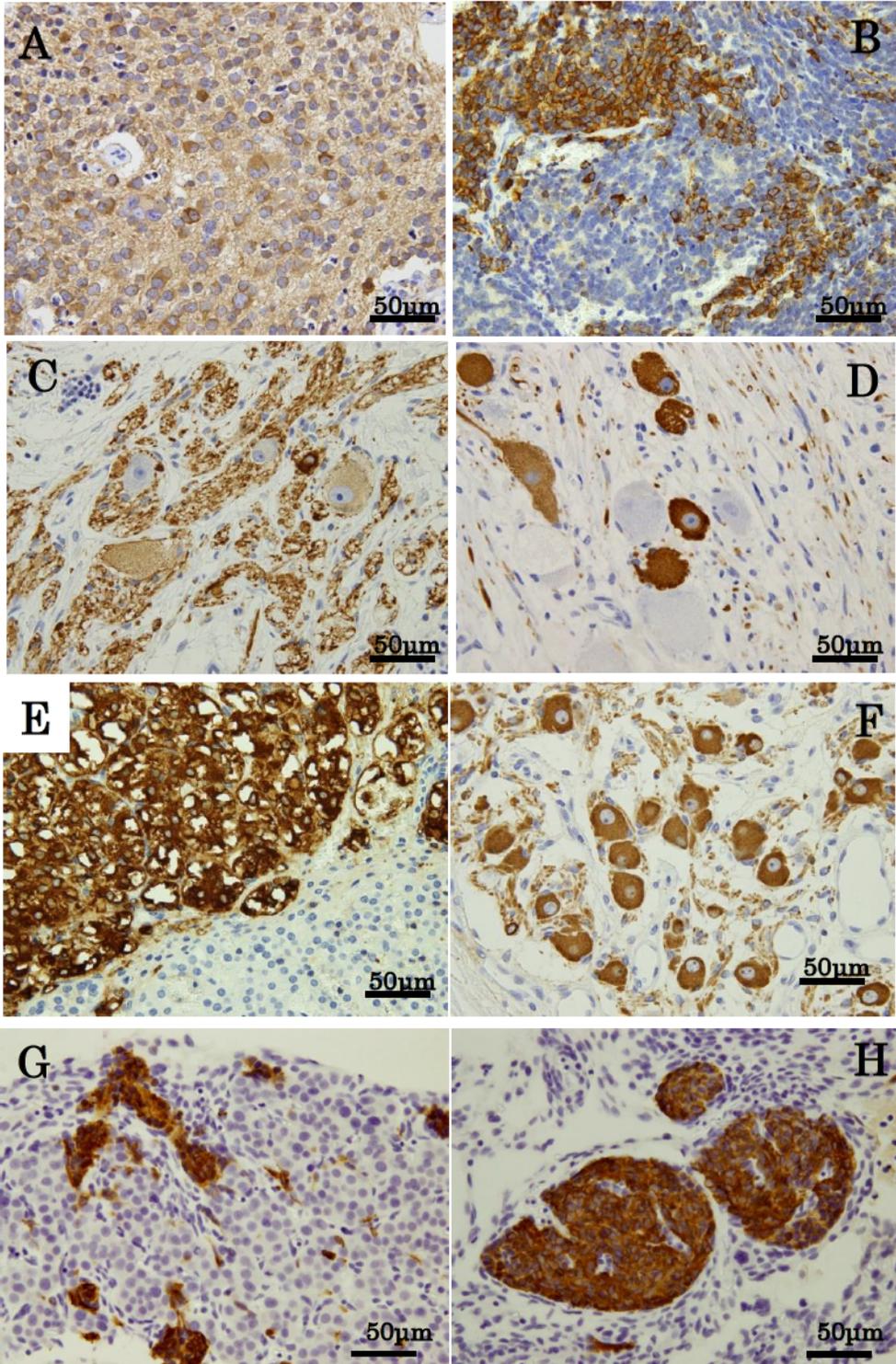


図12-3 TH

腫瘍、正常カウンターパート組織とも、ほぼ全症例が陽性。

AはNB, favorable histology group、BはNB, Unfavorable histology group、

CはGNB、DはGN、Eは副腎髓質、Fは交感神経節、

Gは胎芽副腎髓質、Hは胎芽交感神経節 (G, Hは共に胎-1 ; 胎齢6-7週)。

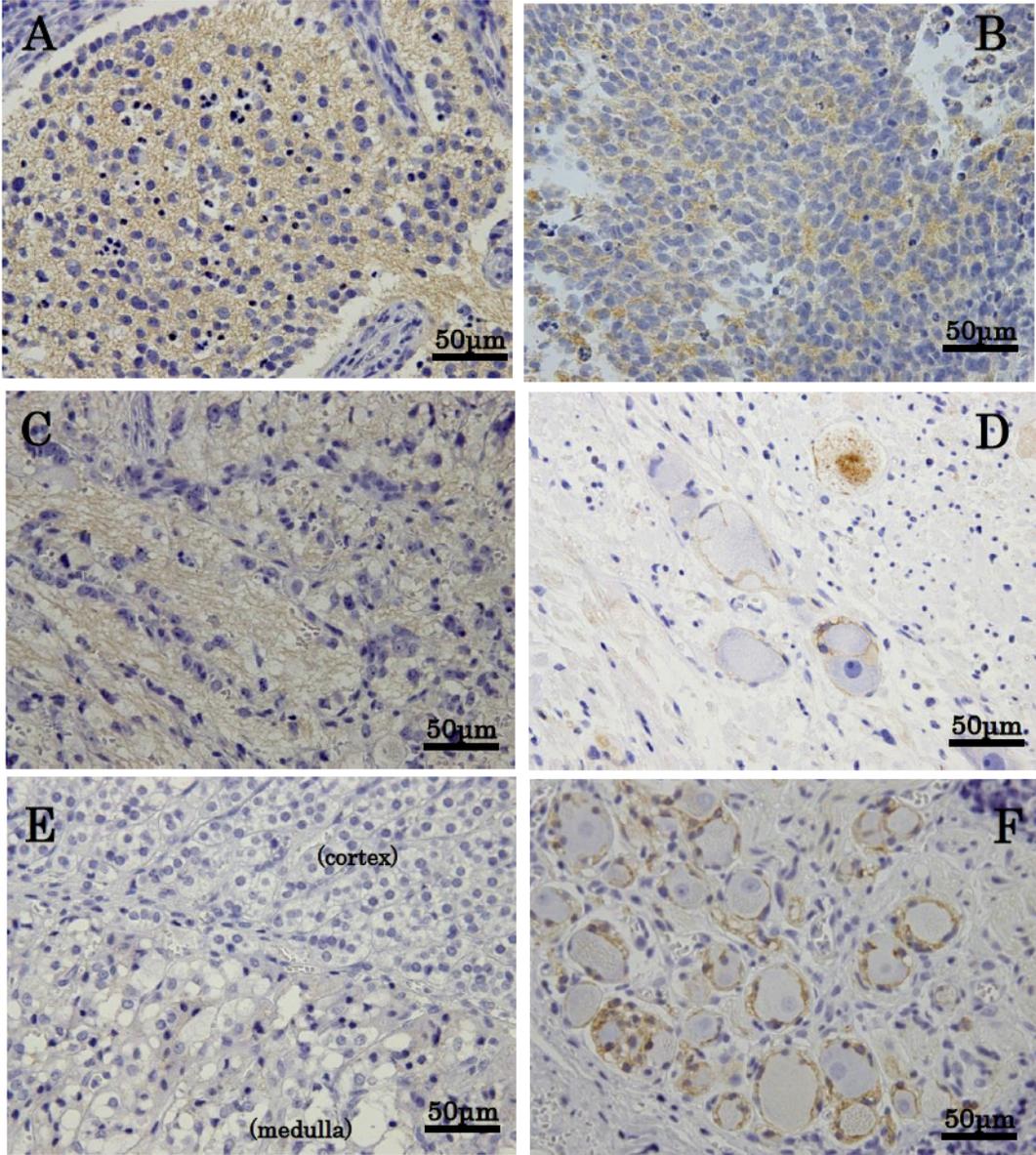


図12-4 CD44

腫瘍では主に細線維に陽性。GN症例や正常交感神経節例の一部では膜に陽性。胎芽・胎児例では全て陰性であった。

AはNB, favorable histology group、**B**はNB, unfavorable histology group、**C**はGNB、**D**はGN、**E**は副腎髄質（陰性）、**F**は交感神経節。

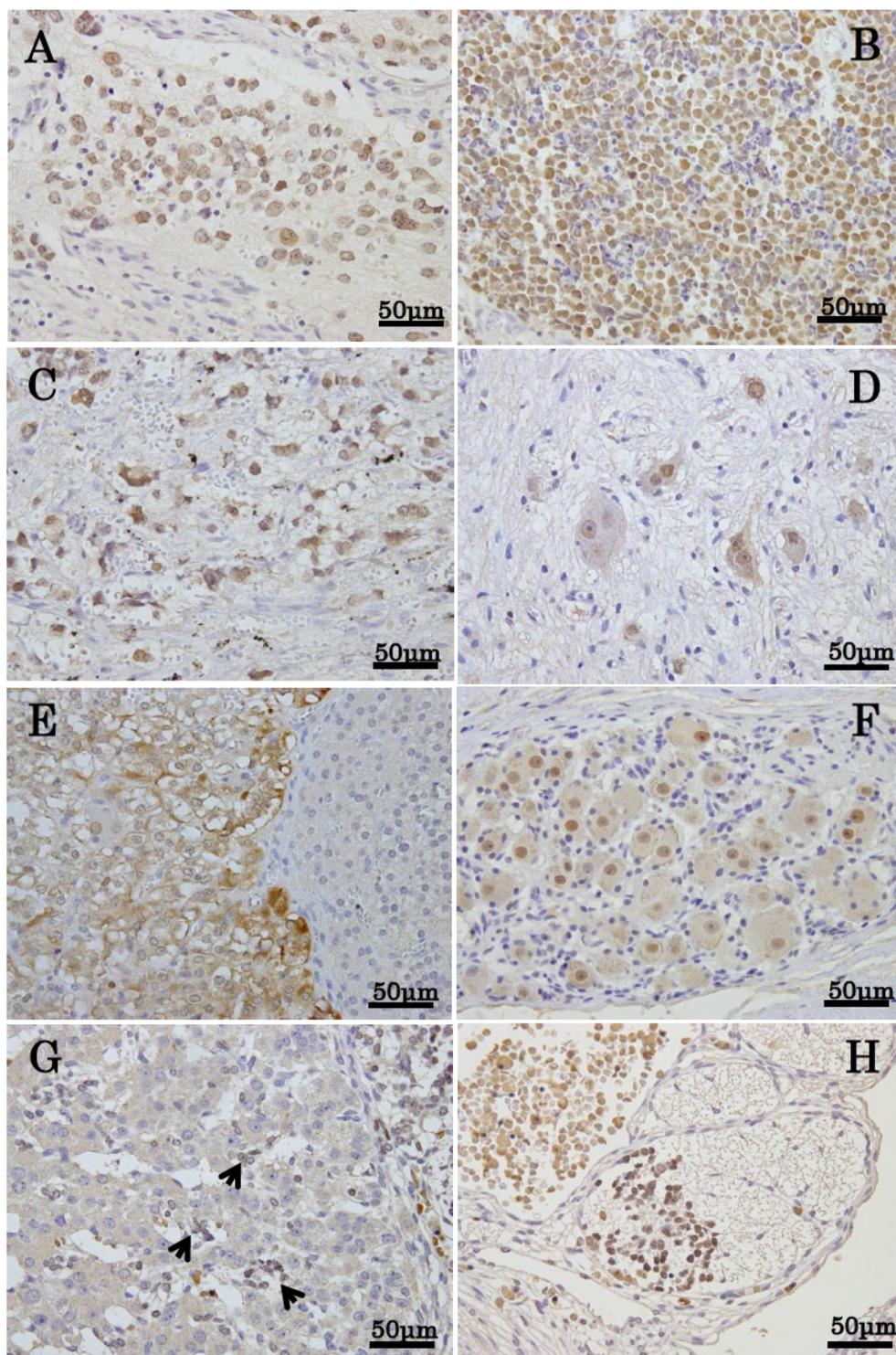


図12-5 PHOX2B

腫瘍、正常カウンターパート組織とも、ほぼ全ての症例で核に陽性。

形態学的分化度の低い細胞の方が、よく染まる傾向に見えた。

AはNB, favorable histology group、**B**はNB, unfavorable histology group、

CはGNB、**D**はGN、**E**は副腎髄質、**F**は交感神経節、

Gは胎児副腎髄質、**H**は胎児交感神経節 (**G, H**は共に胎-5 ; 胎齢10-11週)。

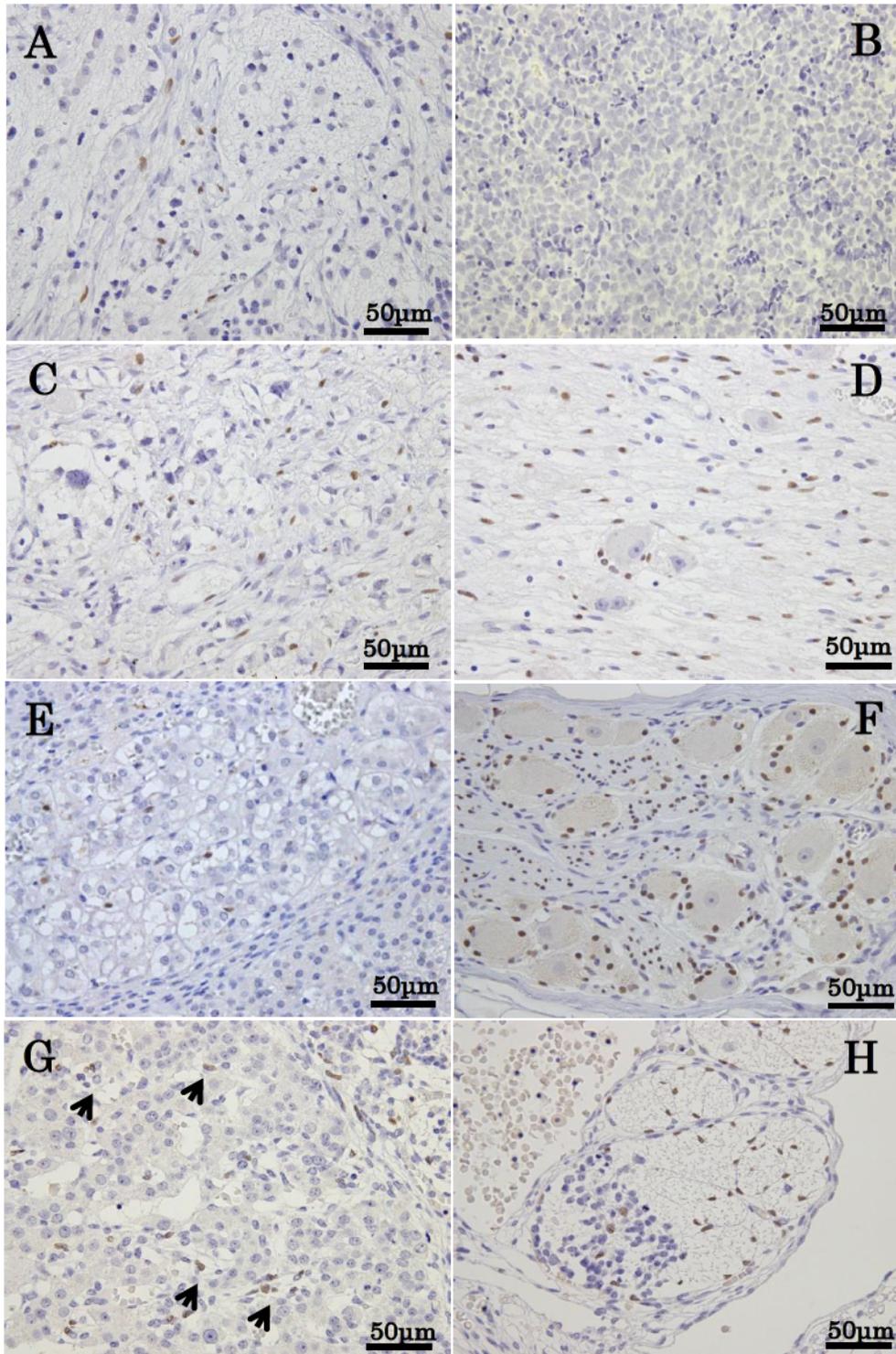
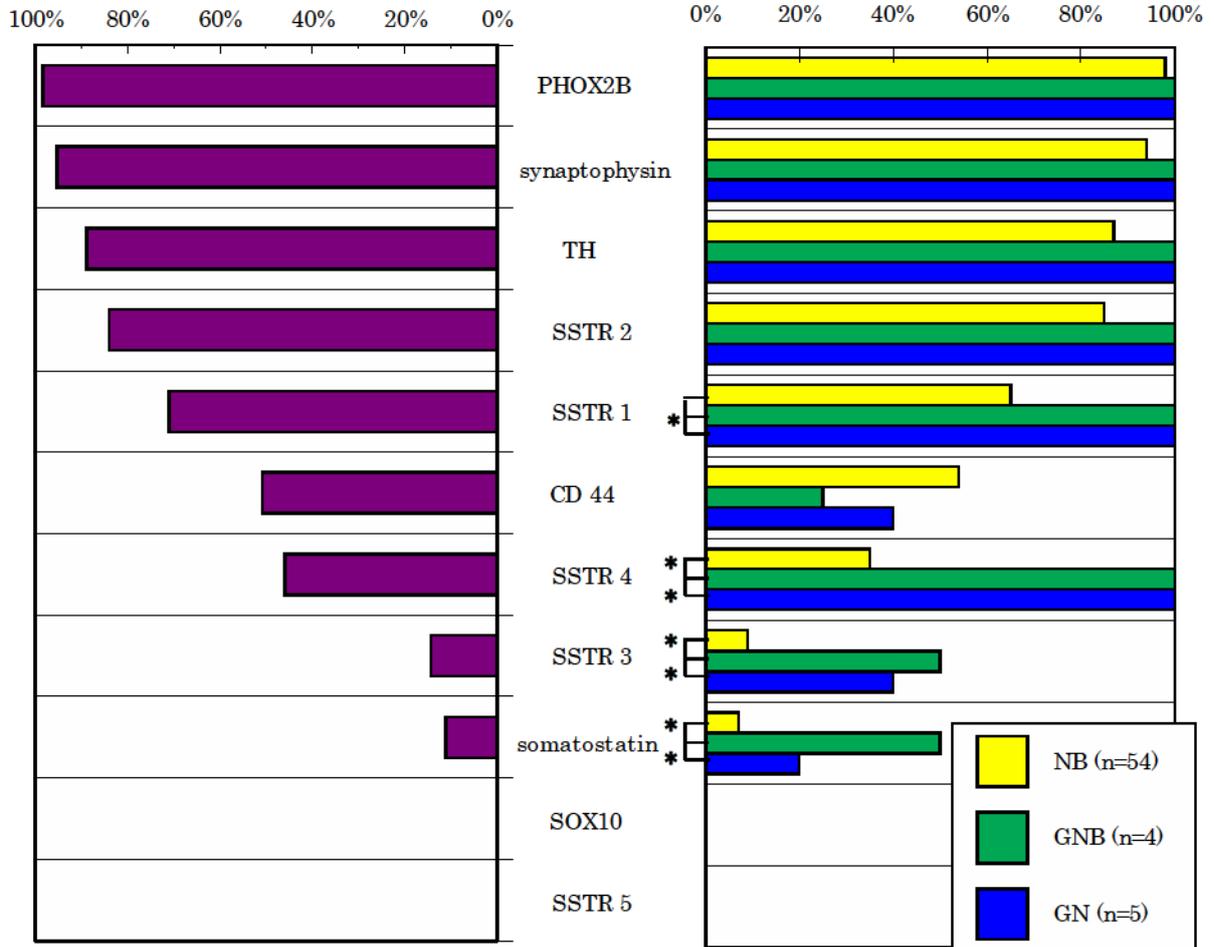


図12-6 SOX10

腫瘍は全例陰性で、間質の小型紡錘形細胞の核に散在性に陽性を示した。
 胎児例では、シュワン系の支持細胞に分化してゆくと思われる細胞に陽性。
AはNB, favorable histology group (隔壁の紡錘形細胞に陽性)、**B**はNB,
 unfavorable histology group (陰性)、**C**はGNB、**D**はGN (間質のシュワン様細胞に
 陽性)、**E**は副腎髄質 (間質に疎らに陽性)、**F**は交感神経節 (シュワン核とサテライト
 核に陽性)、**G**は胎児副腎髄質、**H**は胎児交感神経節 (**G, H**は共に胎5 ; 胎齢10-11週)。

腫瘍全例における陽性率 (n=63)

INPC カテゴリ別の陽性率 (n=63)



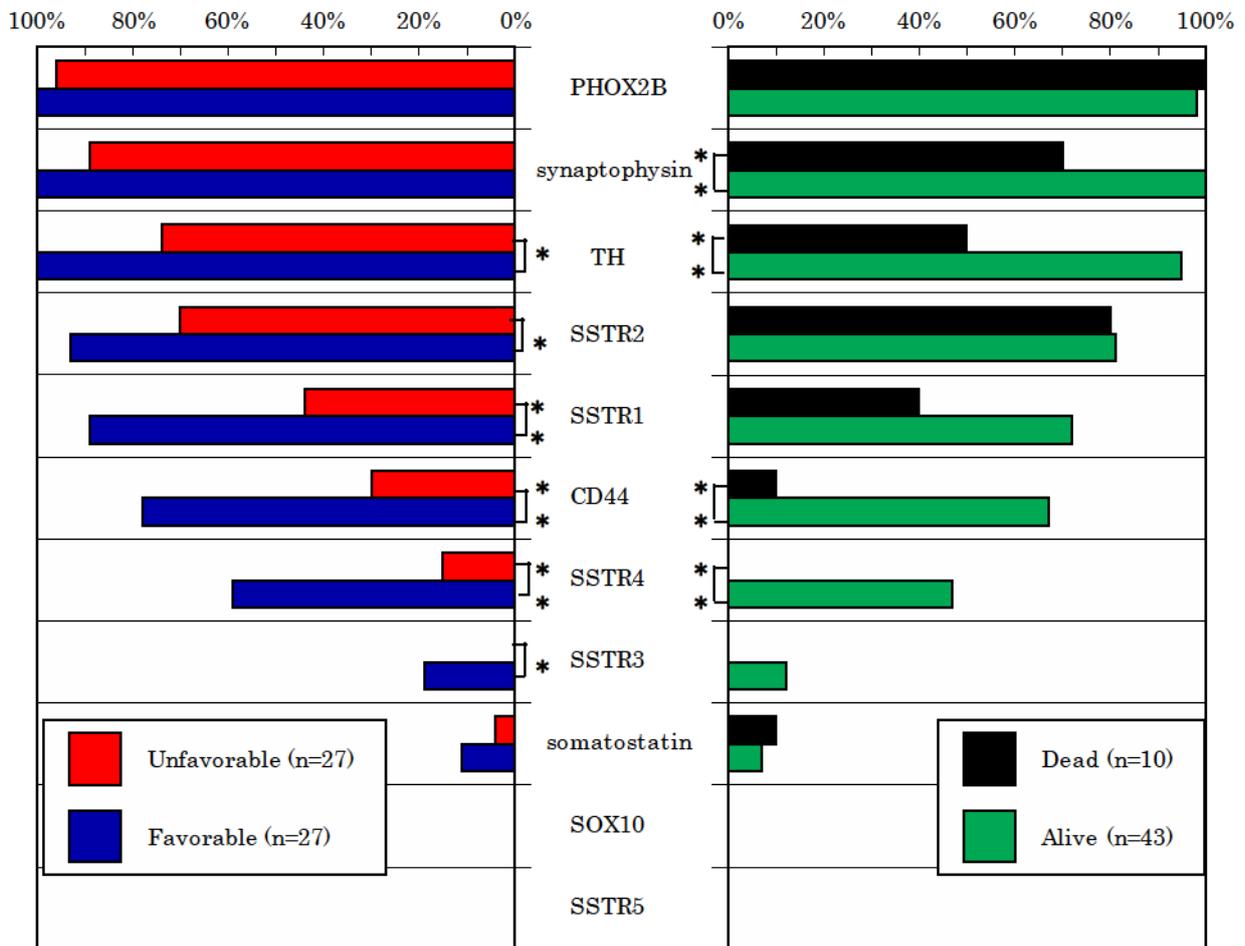
*: $P < 0.05$, †: $P < 0.01$ with Cochran-Armitage trend test

図 13 NTs (n=63) における実験 I の SSTR サブタイプの陽性率と実験 III の各種蛋白や転写因子の陽性率を合わせて比較した。

左は陽性率で高い順から並べた。右は INPC カテゴリ別の陽性率。INPC カテゴリ別では、全体的に GN/GNB の方が NB よりも発現率が高い。SSTR-1, 3, 4, ソマトスタチンでは有意差を認めた。

INPC 予後分類別の陽性率 (n=54)

転帰別の陽性率 (n=53)



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ with Chi-square test

図 14 NB における実験 I の SSTR サブタイプの陽性率と実験 III の各種蛋白や転写因子の陽性率を合わせて比較した。

左は、INPC 予後分類別の陽性率 (n=54)。右は、転帰別の陽性率 (n=53)。

全体に、予後良好群 (favorable histology group、生存群) で発現率が高い。TH, CD44, SSTR-4 は、INPC 予後分類別でも転帰別でも有意差を認めた。SSTR-1, 2, 3 は、INPC 予後分類別のみで、シナプトフィジンは転帰別のみで有意差を認めた。

1 1 . 引 用 文 献

- 1) Patel Y. C.: Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrinol*, 20: 157-198, 1999.
- 2) Reubi, J.C., Schaer, J.C., Markwalder R., Waster, B., Horisberger, U. and Laissue, J.: Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevance. *Yale J. Biol. Med.* 70: 471-479, 1997.
- 3) Sharma, K., Patel, Y.C. and Srikant, C.B.: C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. *Mol. Endocrinol.* 13: 82-90, 1999.
- 4) Sharma, K., Patel, Y.C. and Srikant, C.B.: Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol. Endocrinol.* 10: 1688-1696, 1996.
- 5) Shimon, I., Taylor, J.E., Dong, J.Z., Bitonte, R.A., Kim, S., Morgan, B., Coy, D.H., Culler, M.D. and Melmed, S.: Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J. Clin. Invest.* 99: 789-798, 1997.
- 6) Rohrer, S.P., Birzin, E.T., Mosley, R.T., Berk, S.C., Hutchins, S.M., Shen, D.M., Xiong, Y., Hayes, E.C., Parmar, R.M., Foor, F., Mitra, S.W., Degrado, S.J., Shu, M., Klopp, J.M., Cai, S.J., Blake, A., Chan, W.W., Pasternak, A., Yang, L., Patchett, A.A., Smith, R.G., Chapman, K.T. and Schaeffer, J.M.: Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science* 282(5389): 737-740, 1998.
- 7) Strowski, M.Z., Parmar, R.M., Blake, A.D. and Schaeffer, J.M.: Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* 141: 111-117, 2000.
- 8) Kreienkamp, H.J., Akgün, E., Baumeister, H., Meyerhof, W. and Richter, D.: Somatostatin receptor subtype 1 modulates basal inhibition of growth hormone release in somatotrophs. *FEBS Lett.* 462:464-6, 1999.
- 9) Wang, X.P., Norman, M., Yang, J., Magnusson, J., Kreienkamp, H.J., Richter, D., DeMayo, F.J. and Brunnicardi, F.C.: Alterations in glucose homeostasis in SSTR1 gene-ablated mice. *Mol. Cell Endocrinol.* 247: 82-90, 2006.
- 10) Pinzani, P., Orlando, C., Raggi, C.C., Distante, V., Valanzano, R., Tricarico, C., Maggi, M., Serio, M. and Pazzagli, M.: Type-2 somatostatin receptor mRNA levels in breast and colon cancer determined by a quantitative RT-PCR assay based on dual label fluorogenic probe and the TaqMan technology. *Regul. Pept.* 99: 79-86, 2001.
- 11) Shulz, S., Schulz, S., Schmitt, J., Wiborny, D., Schmidt, H., Olbricht, S., Weise, W., Roessner, A., Gramsch, C. and Höllt, V.: Immunocytochemical detection of somatostatin receptors sst1, sst2A, sst2B, and sst3 in paraffin-embedded breast cancer tissue using subtype-specific

- antibodies. *Clin. Cancer Res.* 4: 2047-2052, 1998.
- 12) Kulaksiz, H., Eissele, R., Rössler, D., Schulz, S., Höllt, V., Cetin, Y. and Arnold, R.: Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut* 50: 52-60, 2002.
 - 13) Taniyama, Y., Suzuki, T., Mikami, Y., Moriya, T., Satomi, S. and Sasano, H.: Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr. J.* 52: 605-611, 2005.
 - 14) Schmid, H.A., Lambertini, C., van Vugt, H.H., Barzaghi-Rinaudo, P., Schäfer, J., Hillenbrand, R., Sailer, A.W., Kaufmann, M. and Nuciforo, P.: Monoclonal antibodies against the human somatostatin receptor subtypes 1-5: development and immunohistochemical application in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 95: 232-247, 2012.
 - 15) Arnold Rudolf: Prospects of medical therapy on neuroendocrine tumors: focus on octreotide. NET Work Japan 第5回 講演集 (2010年1月神戸)
 - 16) Susini, C. and Buscail, L.: Rational for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann. Oncol.* 17: 1733-1742, 2006.
 - 17) Krenning, E.P., Kwekkeboom, D.J., Bakker, W.H., Breeman, W.A.P., Kooij, P.P.M., Oei, H.Y., van Hagen, M., Postema, P.T.E., de Jong, M., Reubi, J.C., Visser, T.J., Reijs, A.E.M., Hofland L.J., Koper J.W. and Lamberts, S.W.J.: Somatostatin receptor scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]- and [123I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur. J. Nucl. Med.* 20: 716-731, 1993.
 - 18) Bruns, C., Lewis, I., Briner, U., Meno-Tetang, G. and Weckbecker, G.: SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antiseecretory profile. *Eur. J. Endocrinol.* 146: 707-716, 2002.
 - 19) Wolin, E.M., Hu, K., Hughes, G., Bouillaud, E., Giannone, V. and Resendiz, K.H.: Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a long-acting release (LAR) formulation of pasireotide (SOM230) in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: results from a randomized, multicenter, open-label, phase I study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 72: 387-395, 2013.
 - 20) Hoehner, J.C., Gestblom, C., Hedborg, F., Sandstedt, B., Olsen, L. and Pählman S.: A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage. *Lab Invest.* 75: 659-675, 1996.
 - 21) Hoehner, J.C., Hedborg, F., Eriksson, L., Sandstedt, B., Grimelius, L., Olsen, L. and Pählman, S.: Developmental gene expression of sympathetic nervous system tumors reflects their histogenesis. *Lab Invest.* 78: 29-45, 1998.
 - 22) 田尻達郎 : 小児固形悪性腫瘍におけるトランスレーショナルリサーチ. 福岡医誌 100 : 75-80, 2009.

- 23) 七野浩之, 陳基明, 麦島秀雄: 第 24 回日本小児がん学会教育セッション: 神経芽腫に対する集学的治療法: 化学療法を中心に. *小児がん* 47: 46-52, 2010.
- 24) <http://www.jnbsg.jp/index.html>
- 25) Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V. and Roald, B.: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 86: 349-363, 1999.
- 26) Shimada, H., Umehara, S., Monobe, Y., Hachitanda, Y., Nakagawa, A., Goto, S., Gerbing, R.B., Stram, D.O., Lukens, J.N. and Matthay, K.K.: International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 92: 2451-2461, 2001.
- 27) 秦順一: 第 19 回日本小児がん学会 教育講座 神経芽腫新国際分類 INPC について - 従来の分類との関連を含めて -. *小児がん* 41: 11-14, 2004.
- 28) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会 編: 神経芽腫群腫瘍-国際分類 INPC による- 小児腫瘍組織カラーアトラス第 2 巻 金原出版, 2004.
- 29) Maggi, M., Baldi, E., Finetti, G., Franceschelli, F., Brocchi, A., Lanzillotti, R., Serio, M., Camboni, M.G. and Thiele, C.J.: Identification, characterization, and biological activity of somatostatin receptors in human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* 54: 124-133, 1994.
- 30) O'Dorisio, M.S., Chen, F., O'Dorisio, T.M., Wray, D. and Qualman, S.J.: Characterization of somatostatin receptors on human neuroblastoma tumors. *Cell Growth Differ.* 5: 1-8, 1994.
- 31) Moertel, C.L., Reubi, J.C., Scheithauer, B.S., Schaid, D.J, Kvol, L.K. and Scheithauer, B.S.: Expression of somatostatin receptors in childhood neuroblastoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 102: 752-756, 1994.
- 32) Albers, A.R., O'Dorisio, M.S., Balster, D.A., Caprara, M., Gosh, P., Chen, F., Hoeger, C., Rivier, J., Wenger, G.D., O'Dorisio, T.M. and Qualman, S.J.: Somatostatin receptor gene expression in neuroblastoma. *Regul. Pept.* 88: 61-73, 2000.
- 33) Georgantzi, K., Tsolakis, A.V., Stridsberg, M., Jakobson, Å., Christofferson, R. and Janson, E.T.: Differentiated expression of somatostatin receptor subtypes in experimental models and clinical neuroblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* 56: 584-589, 2011.
- 34) Dörr, U., Sautter-Bihl, M.L., Schilling, F.H., Koscielniak, E., Treuner, J. and Bihl, H.: Somatostatin receptor scintigraphy (SRS): a new diagnostic tool in neuroblastoma (NB)? *Prog. Clin. Biol. Res.* 385: 355-361, 1994.
- 35) Kropp, J., Hofmann, M. and Bihl, H.: Comparison of MIBG and pentetreotide scintigraphy in children with neuroblastoma. Is the expression of somatostatin receptors a prognostic factor? *Anticancer Res.* 17: 1583-1588, 1997.
- 36) Sestini, R., Orlando, C., Peri, A., Tricarico, C., Pazzagli, M., Serio, M., Pagani, A., Bussolati, G., Granchi, S. and Maggi, M.: Quantitation of somatostatin receptor type 2 gene expression

- in neuroblastoma cell lines and primary tumors using competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Clin. Cancer Res.* 2: 1757-1765, 1996.
- 37) Briganti, V., Sestini, R., Orlando, C., Bernini, G., La Cava, G., Tamburini, A., Raggi, C.C., Serio, M. and Maggi, M.: Imaging of somatostatin receptors by indium-111-pentetreotide correlates with quantitative determination of somatostatin receptor type 2 gene expression in neuroblastoma tumors. *Clin. Cancer Res.* 3: 2385-2391, 1997.
- 38) Raggi, C.C., Maggi, M., Renzi, D., Calabrò, A., Bagnoni, M.L., Scaruffi, P., Tonini, G.P., Pazzagli, M., De Bernardi, B., Bernini, G., Serio, M. and Orlando, C.: Quantitative determination of sst2 gene expression in neuroblastoma tumor predicts patient outcome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 3866-3873, 2000.
- 39) Orlando, C., Raggi, C.C., Bagnoni, L., Sestini, R., Briganti, V., La Cava, G., Bernini, G., Tonini, G.P., Pazzagli, M., Serio, M. and Maggi, M.: Somatostatin receptor type 2 gene expression in neuroblastoma, measured by competitive RT-PCR, is related to patient survival and to somatostatin receptor imaging by indium -111-pentetreotide. *Med. Pediatr. Oncol.* 36: 224-226, 2001.
- 40) Khanna, G., Bushnell, D. and O'Dorisio, M.S.: Utility of radiolabeled somatostatin receptor analogues for staging/restaging and treatment of somatostatin receptor-positive pediatric tumors. *Oncologist* 13: 382-389, 2008.
- 41) Menda, Y., O'Dorisio, M.S., Kao, S., Khanna, G., Michael, S., Connolly, M., Babich, J., O'Dorisio, T., Bushnell, D. and Madsen, M.: Phase I trial of 90Y-DOTATOC therapy in children and young adults with refractory solid tumors that express somatostatin receptors. *J. Nucl. Med.* 51: 1524-1531, 2010.
- 42) Gains, J.E., Bomanji, J.B., Fersht, N.L., Sullivan, T., D'Souza, D., Sullivan, K.P., Aldridge, M., Waddington, W. and Gaze, M.N.: 177Lu-DOTATATE molecular radiotherapy for childhood neuroblastoma. *J. Nucl. Med.* 52: 1041-1047, 2011.
- 43) Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.L., Castel, V., Castelberry, R.P., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., Hedborg, F., Kaneko, M., Kemshead, J., Lampert, F., Lee, R.E., Look, A.T., Pearson, A.D., Philip, T., Roald, B., Sawada, T., Seeger, R.C., Tsuchida, Y. and Voute, P.A.: Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J. Clin. Oncol.* 11: 1466-1477, 1993.
- 44) Kaemmerer, D., Peter, L., Lupp, A., Schulz, S., Sängler, J., Baum, R.P., Prasad, V. and Hommann, M.: Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 5: 187-194, 2012.
- 45) Kaemmerer, D., Lupp, A., Peter, L., Fischer, E., Schulz, S., Klöppel, G. and Hommann, M.: Correlation of monoclonal and polyclonal somatostatin receptor 5 antibodies in pancreatic neuroendocrine tumors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6: 49-54, 2013.

- 46) Mizutani, G., Nakanishi, Y., Watanabe, N., Honma, T., Obana, Y., Seki, T., Ohni, S. and Nemoto, N.: Expression of Somatostatin Receptor (SSTR) Subtypes (SSTR-1, 2A, 3, 4 and 5) in Neuroendocrine Tumors Using Real-time RT-PCR Method and Immunohistochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.* 45: 167-176, 2012.
- 47) Macabeo-Ong, M., Ginzinger, D.G., Dekker, N., McMillan, A., Regezi, J.A., Wong, D.T.W. and Jordan, R.C.K.: Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. *Mod. Pathol.* 15: 979-987, 2002.
- 48) T.W.サドラー 著, 安田峯生 訳: ラングマン人体発生学第9版 メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2006.
- 49) Mills, S.E. editor: *Histology for Pathologists*, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012.
- 50) Gross, N., Beretta, C., Peruisseau, G., Jackson, D., Simmons, D. and Beck, D.: CD44H expression by human neuroblastoma cells: relation to MYCN amplification and lineage differentiation. *Cancer Res.* 54: 4238-4242, 1994.
- 51) Combaret, V., Gross, N., Lasset, C., Frappaz, D., Beretta-Brognara, C., Philip, T., Beck, D. and Favrot, M.C.: Clinical relevance of CD44 cell surface expression and MYCN gene amplification in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* 33: 2101-2105, 1997.
- 52) Kramer, K., Cheung, N.K., Gerald, W.L., LaQuaglia, M., Kushner, B.H., LeClerc, J.M., LeSauter, L. and Saragovi, H.U.: Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* 33: 2098-2100, 1997.
- 53) Munchar, M.J., Sharifah, N.A., Jamal, R. and Looi, L.M.: CD44s expression correlated with the International Neuroblastoma Pathology Classification (Shimada system) for neuroblastic tumours. *Pathology* 35: 125-129, 2003.
- 54) Tabyaoui, I., Tahiri-Jouti, N., Serhier, Z., Bennani-Othmani, M., Sibai, H., Itri, M., Benchekroun, S. and Zamiati S.: Immunohistochemical expression of CD44s in human neuroblastic tumors: Moroccan experience and highlights on current data. *Diagn. Pathol.* 8: 39, 2013.
- 55) Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. and Brunet, J.F.: The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 27: 399 (6734), 366-370, 1999.
- 56) Nagashimada, M., Ohta, H., Li, C., Nakao, K., Uesaka, T., Brunet, J.F., Amiel, J., Trochet, D., Wakayama, T. and Enomoto, H.: Autonomic neurocristopathy-associated mutations in *PHOX2B* dysregulate *Sox10* expression. *J. Clin. Invest.* 122: 3145-3158, 2012.
- 57) Bielle, F., Fréneaux, P., Jeanne-Pasquier, C., Maran-Gonzalez, A., Rousseau, A., Lamant, L., Paris, R., Pierron, G., Nicolas, A.V., Sastre-Garau, X., Delattre, O., Bourdeaut, F. and

- Peuchmaur, M.: PHOX2B immunolabeling: a novel tool for the diagnosis of undifferentiated neuroblastomas among childhood small round blue-cell tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 36: 1141-1149, 2012.
- 58) Mollaaghababa, R. and Pavan, W.J.: The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* 22: 3024-3034, 2003.
- 59) Gershon, T.R., Oppenheimer, O., Chin, S.S. and Gerald, W.L.: Temporally regulated neural crest transcription factors distinguish neuroectodermal tumors of varying malignancy and differentiation. *Neoplasia* 7: 575-584, 2005.
- 60) Volante, M., Brizzi, M.P., Faggiano, A., La Rosa, S., Rapa, I., Ferrero, A., Mansueto, G., Righi, L., Garancini, S., Capella, C., De Rosa, G., Dogliotti, L., Colao, A, and Papotti, M.: Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod. Pathol.* 20: 1172-1182, 2007.
- 61) Pisarek, H., Krupiński, R., Kubiak, R., Borkowska, E., Pawlikowski, M. and Winczyk, K.: Differential expression of somatostatin receptor subtype-related genes and proteins in non-functioning and functioning adrenal cortex adenomas. *Mol. Med. Rep.* 4: 963-969, 2011.
- 62) Goodyer, C.G., Grigorakis, S.I., Patel, Y.C. and Kumar, U.: Developmental changes in the expression of somatostatin receptors (1-5) in the brain, hypothalamus, pituitary and spinal cord of the human fetus. *Neuroscience* 125: 441-448, 2004.
- 63) Busse, E., Bartsch, O. and Kornhuber, B.: Research on the differentiation of human and murine neuroblastoma cells. *Oncology* 48: 196-201, 1991.
- 64) Kogner, P., Borgström, P., Bjellerup, P., Schilling, F.H., Refai, E., Jonsson, C., Dominici, C., Wassberg, E., Bihl, H., Jacobsson, H., Theodorsson, E. and Hassan, M.: Somatostatin in neuroblastoma and ganglioneuroma. *Eur. J. Cancer* 33: 2084-2089, 1997.
- 65) Qualman, S.J., O'Dorisio, M.S., Fleshman, D.J., Shimada, H. and O'Dorisio, T.M.: Neuroblastoma. Correlation of neuropeptide expression in tumor tissue with other prognostic factors. *Cancer* 70: 2005-2012, 1992.
- 66) Carvalho, A. C., Parra, E.R., Zerbini, M.C., Alves, V.A., Capelozzi, V.L. and Antonangelo, L.: Morphometric evaluation of NB84, synaptophysin and AgNOR is useful for the histological diagnosis and prognosis in peripheral neuroblastic tumors (pNTs). *Clinics* 62: 731-740, 2007.
- 67) Ito, R., Asami, S., Kagawa, S., Motohashi, S., Shichino, H., Chin, M., Yoshida, Y., Nemoto, N., Mugishima, H. and Suzuki, T.: Usefulness of tyrosine hydroxylase mRNA for diagnosis and detection of minimal residual disease in neuroblastoma. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 315-318, 2004.
- 68) Ootsuka, S., Asami, S., Sasaki, T., Yoshida, Y., Nemoto, N., Shichino, H., Chin, M.,

- Mugishima, H. and Suzuki, T.: Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 1071-1074, 2008.
- 69) Ootsuka, S., Asami, S., Sasaki, T., Yoshida, Y., Nemoto, N., Shichino, H., Chin, M., Mugishima, H. and Suzuki, T.: Analyses of novel prognostic factors in neuroblastoma patients. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 2294-2299, 2007.
- 70) Barshack, I., Goldberg, I., Nass, D., Olchovsky, D. and Kopolovic, J.: CD44 expression in normal adrenal tissue and adrenal tumours. *J. Clin. Pathol.* 51: 52-54, 1998.
- 71) Kaya, G., Laurini, R., Chaubert, P. and Gross, N.: Expression of CD44 and its isoforms in the fetal neuroblasts. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 9: 180-184, 2001.
- 72) Stutterheim, J., Gerritsen, A., Zappeij-Kannegieter, L., Kleijn, I., Dee, R., Hooft, L., van Noesel, M.M., Bierings, M., Berthold, F., Versteeg, R., Caron, H.N., van der Schoot, C.E. and Tytgat, G.A.: PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* 26: 5443-5449, 2008.
- 73) Cattaneo, M.G., Taylor, J.E., Culler, M.D., Nisoli, E. and Vicentini, L.M.: Selective stimulation of somatostatin receptor subtypes: differential effects on Ras/MAP kinase pathway and cell proliferation in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 481: 271-276, 2000.
- 74) Casini, G., Dal Monte, M., Petrucci, C., Gambellini, G., Grouselle, D., Allen, J.P., Kreienkamp, H.J., Richter, D., Epelbaum, J. and Bagnoli, P.: Altered morphology of rod bipolar cell axonal terminals in the retinas of mice carrying genetic deletion of somatostatin subtype receptor 1 or 2. *Eur. J. Neurosci.* 19: 43-54, 2004.
- 75) Helyes, Z., Pintér, E., Sándor, K., Elekes, K., Bánvölgyi, A., Keszthelyi, D., Szoke, E., Tóth, D.M., Sándor, Z., Kereskai, L., Pozsgai, G., Allen, J.P., Emson, P.C., Markovics, A. and Szolcsányi, J.: Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106: 13088-13093, 2009.
- 76) Hoyer, D., Bell, G.I., Berelowitz, M., Epelbaum, J., Feniuk, W., Humphrey, P.P., O'Carroll, A.M., Patel, Y.C., Schonbrunn, A. and Taylor, J.E.: Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 86-88, 1995.
- 77) Simi, L., Pinzani, P., Raggi, C.C., Pazzagli, M. and Orlando, C.: Influence of 17q gain and promoter polymorphisms on mRNA expression of somatostatin receptor type 2 in neuroblastoma. *Clin. Chim. Acta.* 384: 149-154, 2007.
- 78) Sun, L.C., Mackey, L.V., Luo, J., Fuselier J.A. and Coy, D.H.: Targeted chemotherapy using a cytotoxic somatostatin conjugate to inhibit tumor growth and metastasis in nude mice. *Clin. Med. Oncol.* 2: 491-499, 2008.
- 79) Leja, J., Yu, D., Nilsson, B., Gedda, L., Zieba, A., Hakkarainen, T., Åkerström, G., Öberg, K., Giandomenico, V. and Essand, M.: Oncolytic adenovirus modified with somatostatin motifs

for selective infection of neuroendocrine tumor cells. *Gene Ther.* 18: 1052-1062, 2011.

80) Watanabe, N., Nakanishi, Y., Kinukawa, N., Ohni, S., Obana, Y., Nakazawa, A. and Nemoto, N.: Expressions of Somatostatin Receptor Subtypes (SSTR-1, 2, 3, 4 and 5) in Neuroblastic Tumors; Special Reference to Clinicopathological Correlations with International Neuroblastoma Pathology Classification and Outcomes. *Acta Histochem. Cytochem.* 47: 219-229, 2014.

81) 中村好一 編集：医療系のためのやさしい統計学入門 診断と治療社，2009.

82) 柳井久江 著：4 steps エクセル統計第3版 オーエムエス出版，2011.

83) 神田善信 著：EZR でやさしく学ぶ統計学~EBM の実践から臨床研究まで~ 中外医学社，2012.

84) 森貫敏夫 著：入門医療統計学—Evidence を見出すために 東京図書，2004.

12. 研究業績

1	発表	①一般発表	49 (単	20	／共	29)
		②特別発表	0			
2	論文	①原著論文	5 (単	3	／共	2)
		②症例報告	23 (単	14	／共	9)
		③総説	1 (共	1)		
3	著書		2 (分担	2)		

以上

1 発表

① 一般発表

1. 渡辺紀子, 北宅弘太郎, 門 紀子, 本庄英雄: 出生後 Juvenile xanthogranuloma と診断された, 羊水過多をともなった胎児腫瘍の1例. 第107回近畿産婦人科学会学術集会, 大阪, 2002年11月
2. 渡辺紀子, 卜部優子, 卜部諭: TJ療法が奏効した進行期卵管癌の1例. 第13回滋賀癌化学療法研究会, 滋賀, 2003年2月
3. 山下裕子, 久保隆彦, 渡辺紀子, 櫻井美樹, 山本阿紀子, 鈴木泉, 塚原優己, 林聡, 左合 治彦, 北川道弘, 名取道也: 国立成育医療センター開設1年の成績. 第106回日本産科婦人科学会関東連合地方部会, 静岡, 2003年10月
4. 藤井園子, 黒澤寛史, 寺澤篤, 渡辺紀子, 阿部世紀, 田中基, 林玲子, 田村高子, 近藤陽一, 朝原章二, 宮坂勝之, 左合治彦, 久保隆彦, 北川道弘, 名取道也: 硬膜外無痛分娩におけるロピバカイン濃度による比較. 第106回分娩と麻酔研究会, 神奈川, 2003年12月
5. 田中基, 渡辺紀子, 藤井園子, 寺澤篤, 阿部世紀, 林玲子, 田村高子, 近藤陽一, 朝原章二, 宮坂勝之, 左合治彦, 久保隆彦, 北川道弘, 名取道也: 低出生体重児の帝王切開におけるニトログリセリンの有用性. 第106回分娩と麻酔研究会, 神奈川, 2003年12月
6. 伊藤めぐむ, 和知敏樹, 林聡, 左合治彦, 木村香織, 望月昭彦, 櫻井美樹, 山本阿紀子, 鈴木泉, 渡辺紀子, 和田誠司, 渡邊典芳, 尾見裕子, 牧野郁美, 塚原優己, 久保隆彦, 北川道弘, 名取道也: 胎児治療を施行した胎児卵巣嚢腫の1例. 第329回日本産科婦人科学会東京地方部会, 東京, 2004年2月
7. 神部友香理, 和知敏樹, 小出直哉, 望月昭彦, 渡辺紀子, 新家秀, 塚原優己, 久保隆彦, 北川道弘: 抗Jra抗体陽性妊娠の1例. 第333回日本産科婦人科学会東京地方部会, 東京, 2005年2月
8. 渡辺紀子, 種元智洋, 新家秀, 村島温子, 久保隆彦, 北川道弘, 名取道也: 当院における分娩に至った先天性胆道閉鎖症の9例. 第104回日本産婦人科学会関東連合地方部会, 長野, 2005年10月
9. 中村宏紀, 柿島裕樹, 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 小野田登, 中川温子: 神経芽腫における免疫細胞化学的診断 骨髄液を中心として. 第47回日本臨床細胞学会総会, 横浜, 2006年6月
10. 渡辺紀子, 松岡健太郎, 中川温子: 14歳で発症した Wegener 肉芽腫症の1例. 第104回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2006年6月
11. 松岡健太郎, 渡辺紀子, 中川温子: 胎盤血管腫の1例. 第104回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2006年6月
12. 林聡, 左合治彦, 渡辺紀子, 湯元康夫, 坂田麻理子, 中村知夫, 伊藤裕司, 千葉敏雄, 北川道弘, 名取道也: 第42回日本周産期・新生児医学会, 宮崎, 2006年7月.
13. 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中川温子: 胎児期より認められた胎児頭部巨大腫瘍の1例. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会, 札幌, 2006年9月

14. 大喜多肇, 松岡健太郎, 渡辺紀子, 秦順一, 中川温子 : 脳腫瘍の1例. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会, 札幌, 2006年9月
15. 渡辺紀子, 松岡健太郎, 中川温子 : Monochorionic dizygotic twin の1例. 第105回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2006年10月
16. 中川温子, 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎 : 骨髄移植後慢性肝 GVHD に対して生体肝移植を施行した1例. 第106回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2007年6月
17. 松岡健太郎, 渡辺紀子, 大喜多肇, 中川温子 : ductal plate malformation(DPM)の2例. 第106回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2007年6月
18. 花井彩江, 高橋重裕, 伊藤裕司, 中村知夫, 左合治彦, 渡辺紀子 : Meningeal melanocytoma による頭部巨大腫瘍の1例. 第43回日本周産期・新生児医学会学術集会, 東京, 2007年7月
19. 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中川温子 : 頬部皮下腫瘍の1例. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会, 東京, 2007年9月
20. 大喜多肇, 渡辺紀子, 松岡健太郎, 中川温子 : Renal carcinomas associated with Xp11.2 translocations/TFE3 fusions の1例. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会, 東京, 2007年9月
21. 渡辺紀子, 松岡健太郎, 中川温子 : 臍に生じた胚細胞腫瘍の1例. 第107回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2007年10月
22. 松岡健太郎, 渡辺紀子, 大喜多肇, 中川温子 : サラセミアの1例. 第107回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2007年10月
23. 内田清乃, 柿島裕樹, 中村宏紀, 山田稔, 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中川温子, 三井真理, 藤井絵里子 : 性成熟期における HPV 型別診断の重要性. 第46回日本臨床細胞学会秋季大会, 仙台, 2007年11月
24. 渡辺紀子, 松岡健太郎, 中川温子 : 胎児期に下部尿路閉塞を呈し死産となった4剖検例の検討. 第108回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2008年2月
25. 松岡健太郎, 渡辺紀子, 大喜多肇, 中川温子 : 腎移植直後に再発したネフローゼ症候群の1例. 第108回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2008年2月
26. 松岡健太郎, 渡辺紀子, 中川温子 : 一絨毛膜性二羊膜性胎盤における深部血管吻合の検索. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 2008年5月
27. 渡辺紀子, 大荷澄江, 杉谷雅彦, 根本則道 : Isolated enteric duplication cyst と考えられた1例. 第112回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2009年2月
28. 砂川恵伸, 渡辺紀子, 石毛俊幸, 瀧之上史, 菊池建太郎, 本間琢, 大荷澄江, 生沼利倫, 楠美嘉晃, 山田勉, 杉谷雅彦, 三俣昌子, 根本則道 : ニューモシスチス肺炎の生存例と死亡例における臨床的・病理学的比較検討. 第98回日本病理学会総会, 京都, 2009年5月
29. 瀧之上史, 中西陽子, 尾花ゆかり, 村上絵里子, 前田哲代, 渡辺紀子, 石毛俊幸, 菊池建太郎, 砂川恵伸, 生沼利倫, 杉谷雅彦, 根本則道 : 子宮内膜癌における ALCAM(activated leukocyte cell adhesion molecule)発現の臨床病理学的検討. 第98回日本病理学会総会, 京都, 2009年5月

30. 渡辺紀子, 楠美嘉晃, 杉谷雅彦: 生下時より全身性発疹を呈した myeloid sarcoma の一例. 第 114 回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2009 年 10 月
31. 根本則道, 中西陽子, 渡辺紀子, 渕之上史, 本間琢, 大荷澄江, 生沼利倫: 神経内分泌腫瘍 (NET) におけるソマトスタチン受容体サブタイプの発現. 第 5 回 NET Work Japan, 神戸, 2010 年 1 月
32. 渡辺紀子, 杉谷雅彦, 根本則道: 臨床的に診断が困難であった新生児腸管ムコール症の一例. 第 115 回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2010 年 2 月
33. 黒澤毅文, 横山勝章, 久保地泰仁, 小森谷将一, 榎本光信, 高世秀仁, 松平かがり, 今井忍, 高橋直之, 杉野敬一, 長尾建, 平山篤志, 渡辺紀子, 山田勉: 致死的不整脈をきたし ICD 植込みを施行した全身性アミロイドーシスの剖検例 左室 substrate マッピングと病理所見の比較. 第 25 回日本不整脈学会学術大会, 名古屋, 2010 年 6 月
34. 梶田賢司, 高田眞一, 林忠佑, 友部淳子, 渡辺紀子, 楠美嘉晃, 山本樹生: 広靱帯原発と考えられる類内膜腺癌の 1 例. 第 48 回日本癌治療学会学術大会, 京都, 2010 年 10 月
35. 渡辺紀子, 杉谷雅彦: 若年性黄色肉芽腫の一例. 第 117 回関東・東海地区小児病理研究会, 東京, 2010 年 10 月
36. 中野夏子, 岡松千都子, 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中澤温子: 肝不全で発症した全身型黄色肉芽腫の一例. 第 100 回日本病理学会総会, 東京, 2011 年 4 月
37. 渡辺紀子, 杉谷 雅彦: 13 歳の男児に発生した腎腫瘍. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会, 神奈川, 2011 年 9 月
38. 渡辺紀子, 尾花ゆかり, 中西陽子, 根本則道: 神経芽腫群腫瘍におけるソマトスタチン受容体サブタイプの発現. 第 7 回 NET Work Japan, 東京, 2012 年 2 月
39. 水谷剛, 中西陽子, 渡辺紀子, 尾花ゆかり, 大荷澄江, 楠美嘉晃, 根本則道: 神経内分泌腫瘍におけるソマトスタチン受容体の発現. 第 510 回日大医学会例会, 東京, 2012 年 3 月
40. 渡辺紀子, 尾花ゆかり, 中西陽子, 根本則道: 神経芽腫群腫瘍におけるソマトスタチン受容体各サブタイプの発現. 第 101 回日本病理学会総会, 東京, 2012 年 4 月
41. 渡辺紀子, 石毛俊幸, 絹川典子, 根本則道, 石毛美夏: 尿路感染症を契機にアシドーシス、原因不明の腹腔内出血を来し死亡したメチルマロン酸血症の剖検例. 第 32 回日本小児病理研究会, 大阪, 2012 年 9 月
42. 桂義久, 絹川典子, 渡辺紀子, 天野雄介, 辻村隆介, 楠美嘉晃, 根本則道: Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃癌の 2 例. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013 年 4 月
43. 龍芯依, 小林駿, 白木聡子, 杉田馨里奈, 横田崇, 久野木直人, 中川太一, 太田壮一郎, 西山竜, 赤井祐一, 山本敏樹, 大谷豪, 小川眞広, 中島典子, 森山光彦, 渡辺紀子, 絹川典子: 内視鏡的採石術に伴い胆管内発育型肝細胞癌を診断した 1 例. 第 85 回日本消化器内視鏡学会, 京都, 2013 年 5 月
44. 大橋研介, 越永従道, 細田利史, 井上幹也, 杉藤公信, 池田太郎, 渡辺紀子, 星野真由美, 後藤博志, 増永健: 超低出生体重児腸管病変の病理組織学的検討. 第 50 回日本小児外科学会学術集会, 東京, 2013 年 5 月

45. 渡辺紀子, 尾花ゆかり, 中西陽子, 根本則道: 神経芽腫群腫瘍におけるソマトスタチン受容体各サブタイプの発現. 第54回日本組織細胞化学会, 東京, 2013年9月
46. 飯塚美沙都, 谷眞弓, 杉山順子, 佐藤一雄, 渡辺紀子, 絹川典子, 榎本克久, 櫻井健一, 天野定雄, 増田しのぶ: OSNA法による術中センチネルリンパ節生検の検討. 日本乳癌学会総会, 浜松, 2014年7月
47. 渡辺紀子, 道上佳洋, 絹川典子, 杉谷雅彦, 吉田行弘: 脛骨腫瘍の一例. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会, 岡山, 2014年9月
48. 渡辺紀子, 道上佳洋, 絹川典子, 桂義久, 奥野美佐子, 鈴木潤一, 浦上達彦: 大動脈解離にて死亡したターナー症候群の一例. 第34回小児病理研究会学術集会, 岡山, 2014年9月
49. MK Wu, H Druker, P Thorner, J Traubici, R Grant, S Albrecht, E Weber, A Charles, JR Priest, MR Fabian, N Watanabe, G Vujanic, WD Foulkes: *DICER1* mutations occurring in Childhood anaplastic sarcoma of kidney. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA, 2014年10月

2 論文

① 原著論文

1. 卜部論, 喜田直江, 渡辺紀子, 卜部優子: 子宮筋腫治療における腹腔鏡下手術と子宮動脈塞栓術の比較と評価. 日本産科婦人科学会滋賀地方部会誌 2: 33-36, 2003.
2. 渡辺紀子, 種元智洋, 新家秀, 村島温子, 久保隆彦, 北川道弘, 名取道也: 先天性胆道閉鎖症術後妊娠10例13回の検討. 日本産科婦人科学会関東連合地方部会会報 43(4): 353-357, 2006.
3. 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中川温子: 胎児期に下部尿路閉塞を呈し死産となった4剖検例の検討. こども医療センター医学誌 37(3): 134-135, 2008.
4. Gou Mizutani, Yoko Nakanishi, Noriko Watanabe, Taku Honma, Yukari Obana, Tomomi Seki, Sumie Ohni, Norimichi Nemoto: Expression of Somatostatin Receptor (SSTR) Subtypes (SSTR-1, 2A, 3, 4 and 5) in Neuroendocrine Tumors Using Real-time RT-PCR Method and Immunohistochemistry. *Acta Histochemica et Cytochemica* 45(3): 167-176, 2012.
5. Noriko Watanabe, Yoko Nakanishi, Noriko Kinukawa, Sumie Ohni, Yukari Obana, Atsuko Nakazawa and Norimichi Nemoto: Expressions of Somatostatin Receptor Subtypes (SSTR-1, 2, 3, 4 and 5) in Neuroblastic Tumors; Special Reference to Clinicopathological Correlations with International Neuroblastoma Pathology Classification and Outcomes. *Acta Histochemica et Cytochemica* 47(5): 219-229, 2014.

② 症例報告

1. 渡辺紀子, 山本浩之, 木村順治, 片山久史: 片側無機能子宮内膜, 同側腔閉鎖, 同側腎無形成を合併した重複子宮の一例. 産婦人科治療 86(5): 1011-1013, 2003.
2. 伊藤めぐむ, 和知敏樹, 林聡, 左合治彦, 木村香織, 望月 昭彦, 櫻井 美樹, 山本阿紀子, 鈴木

- 泉, 渡辺紀子, 和田誠司, 渡邊典芳, 尾見裕子, 牧野郁美, 塚原優己, 久保隆彦, 北川道弘, 名取道也: 胎児治療を施行した胎児卵巣嚢腫の1例. 日本産科婦人科学会東京地方部会誌 53(2): 234-237, 2004.
3. 神部友香理, 和知敏樹, 小出直哉, 望月昭彦, 渡辺紀子, 新家秀, 塚原優己, 久保隆彦, 北川道弘: 抗Jra抗体陽性妊娠の1例. 日本産科婦人科学会東京地方部会誌 54(2): 193-195, 2005.
 4. 松岡健太郎, 渡辺紀子, 中川温子: 胎盤血管腫の1例. こども医療センター医学誌 35(4): 195-196, 2006.
 5. 渡辺紀子, 松岡健太郎, 中川温子: Wegener 肉芽腫症の1例. こども医療センター医学誌 35(4): 196-197, 2006.
 6. 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中川温子: 胎児期より認められた頭部巨大腫瘍の1例. 小児がん 43(4): 825, 2007.
 7. 大喜多肇, 松岡健太郎, 渡辺紀子, 秦順一, 中川温子: 脳腫瘍の1例. 小児がん 43(4): 828, 2007.
 8. 渡辺紀子, 松岡健太郎, 中川温子: Monochorionic dizygotic twin の1例. こども医療センター医学誌 36(1): 45, 2007.
 9. 中川温子, 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎: 骨髄移植後慢性肝 GVHD に対して生体肝移植を施行した1例. こども医療センター医学誌 36(4): 205-206, 2007.
 10. 松岡健太郎, 渡辺紀子, 大喜多肇, 中川温子: ductal plate malformation(DPM)の2例. こども医療センター医学誌 36(4): 211-212, 2007.
 11. 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中川温子: 頬部皮下に発生した Sclerosing rhabdomyosarcoma の1例. 小児がん 45(2): 185, 2008.
 12. 大喜多肇, 渡辺紀子, 松岡健太郎, 中川温子: Renal carcinomas associated with Xp11.2 translocations/TFE3 fusions の1例. 小児がん 45(2): 175, 2008.
 13. 渡辺紀子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中川温子: 小児臍に発生した胚細胞腫瘍の1例. こども医療センター医学誌 37(1): 49, 2008.
 14. 松岡健太郎, 渡辺紀子, 大喜多肇, 中川温子: サラセミアの1例. こども医療センター医学誌 37(1): 51, 2008.
 15. 松岡健太郎, 渡辺紀子, 大喜多肇, 中川温子: 腎移植直後に再発したネフローゼ症候群の1例. こども医療センター医学誌 37(3): 132-133, 2008.
 16. 渡辺紀子, 大荷澄江, 杉谷雅彦, 根本則道: Isolated enteric duplication cyst と考えられた1例, こども医療センター医学誌 38(3): 119-120, 2009.
 17. 渡辺紀子, 青木正哉, 廣瀬茂道, 新井宏治: 子宮体部神経内分泌腫瘍の1例, 日本臨床細胞学会雑誌 48(3): 140-141, 2009.
 18. Noriko Watanabe, Hajime Okita, Kentaro Matsuoka, Chikako Kiyotani, Eriko Fujii, Masaaki Kumagai and Atsuko Nakagawa: Vaginal yolk sac (endodermal sinus) tumors in infancy presenting persistent vaginal bleeding. The journal of obstetrics and gynaecology research 36(1): 213-216, 2010.

19. 渡辺紀子, 楠美嘉晃, 杉谷雅彦 : 生下時より全身性発疹を呈した myeloid sarcoma の一例, こども医療センター医学誌 39(1) : 52-53, 2010.
20. 渡辺紀子, 杉谷雅彦, 根本則道 : 臨床的に診断が困難であった新生児腸管ムコール症の1例, こども医療センター医学誌 39(3) : 128, 2010.
21. 渡辺紀子, 杉谷雅彦 : 骨髄生検にて疑われ診断にいたった全身型若年性黄色肉芽腫の一例, こども医療センター医学誌 40(1) : 88-89, 2011.
22. 渡辺紀子, 杉谷雅彦 : 13歳の男児に発生した anaplastic sarcoma of kidney の1例, 日本小児血液・がん学会雑誌 49(1-2) : 189, 2012.
23. Noriko Watanabe, Daisuke Omagari, Tsutomu Yamada, Norimichi Nemoto, Takeshi Furuya, Kiminobu Sugito, Tsugumichi Koshinaga, Hiroshi Yagasaki and Masahiko Sugitani : Anaplastic sarcoma of the kidney: a case report and review of the literature. Pediatrics International 55(5): e129-132, 2013.

③ 総説

坂田麻理子, 川上香織, 小出直哉, 望月昭彦, 渡辺紀子, 北川道弘 : 分娩の難易度の予測. 周産期医学 36(1) : 9-12, 2006.

④ 著書

1. 渡辺紀子, 左合治彦 : 第2部 中期 双胎妊娠の管理 pp.38-42
国立成育医療センター産科実践ガイド EBM に基づく成育診断サマリー (左合治彦, 久保隆彦, 渡辺典芳 編著, 北川道弘 監修) 診断と治療社, 東京, 2009.
2. 渡辺紀子, 松岡健太郎 : 第11章 剖検・病理技術 1. 剖検 p.97
小児・周産期病理アトラス (国立成育医療センター病理診断部 編) 診断と治療社, 東京, 2012.