

신경아세포종의 세포유전적인 변화

—Genetic Alteration in Neuroblastoma—

연세대학교 의과대학 외과학교실

최승훈

서론

신경아세포종은 신경색에서 유래하는 종양으로 소아에서는 뇌종양다음으로 호발하며 15세 이하에서 1년에 100만명중 10명의 비율로 진단되는 흔한 질환이다¹⁾. 성인암에서는 환경적인 요소가 큰 역할을 하는데 비하여 소아암에서는 유전적인 요소가 큰 원인이 되는데 가족에 많이 생기는 질환이나 종양의 세대유전이 보고되고 있다. 소아종양에서는 암의 제유전자의 두 allele의 계속적인 불활성화가 중요한 역할을 함이 보고되고 있다. 1970년대와 1980년대에 세포유전학연구가 활발히 이루어 졌는데 신경아세포종에서 가장 흔한 비정상은 HSR(homogeneously staining regions)과 DMs(extrachromosomal double minutes) 그리고 1번염색체의 단축의 partial monosomy 임이 알려졌다²⁾. 뒤이은 세포분석에서는 HSR은 N-myc 증폭과 밀접한 관계가 있으며^{3,4)}, 임상적으로는 N-myc 증폭이 진행된 병과 예후와 밀접한 관계가 있음이 알려졌다^{5,6)}. N-myc의 증폭이 암의 빠른 진행과 관련되는 것은 N-myc이 신경아세포종의 악성도에 직접작용함을 의미한다.

신경아세포종에서는 hyperploidy가 예후에 좋은 영향을 미치는 것이 밝혀 졌으며, diploidy를 보이는 환자에서는 종양이 빨리 자라고 예후도 좋지 않

다^{7~10)}. Ha-ras와 TRK 체유전자가 있으면 좋은 예후를 보임도 최근에 밝혀졌다^{11,12)}. 본 논문에서는 이러한 신경아세포종에서의 세포유전학적측면과 분자생물학적측면을 고찰하고 향후 임상적으로 사용 가능한 유전학적인 marker를 살펴본다.

신경아세포종의 염색체변화

진행된 신경아세포종에서 1번 염색체의 부분소실이 처음 발견되었으며¹³⁾, 배양중인 세포에서는 70~80%, 진행성 신경아세포종에서는 40~70%의 빈도로 보고되고 있다^{2,14~17)}. 소실된 부분은 1p32와 1pter 사이에 위치하고 주소는 1p36.1-2이다¹⁸⁾. 따라서 이부분이 신경아세포종의 암억제유전자인 것으로 생각된다¹⁹⁾. 신경아세포종에서 1번 염색체의 부분소실과 같은 빈도로 HSR과 DMs가 발견되는 데²⁰⁾, 1p36의 변이와 같은 부위의 소실은 신경아세포종이 악성으로 변화하는데 중요한 기전으로 보인다¹⁹⁾. 한쪽의 암억제유전자는 변이에 의하여 불활성화하고 다른쪽의 암억제유전자는 LOH에 의하여 불활성화 한다는 것이 일반적인 개념이다²¹⁾. DMs는 1965년에 발견되었고²²⁾, 이것은 신경아세포종에서 보다는 배양중인 세포나 이종이식된 종양에서 흔히 발견된다. DMs는 HSR로 변화하기도 하고 한세포에서 같이 존재하기도 한다²³⁾. 대체적으로 DMs와 HSR은 배양중인 신경아세포종에서 비슷한 정도

로 발견되며, 90% 정도에서 한가지 혹은 두가지 모두를 가지고 있다¹⁹⁾.

N-myc 유전자는 C-myc과 상동유전자이며 2번 염색체에 위치한다. 진행성신경아세포종에서는 50 배에서 120배정도로 증폭되어 있으며 in situ hybridization 검사에서는 HSR과 상관관계를 보인다^{25,26)}. N-myc은 2번 염색체에서 유래하지만 이것의 증폭된 것인 HSR은 염색체 1, 12, 13, X 등에 붙는 경우가 있다. 어떤 배양세포에서는 두개의 HSR을 보이며, 두개가 모두 DNA 서열이 N-myc과 같은 것을 보인다²⁶⁾. N-myc 유전자는 증폭될 경우에는 염색체 2번의 p23-24에 위치한다²⁷⁾.

1번 염색체에서 이상이 발견되는 것은 N-myc 유전자의 증폭과 비슷한 빈도를 보이며, 최근까지도 1번염색체와 N-myc 유전자와의 상관관계는 밝혀져 있지 않다. 일부 보고에 의하면 1p35-36.1에 위치한 유전자가 N-myc 증폭에 억제유전자로 관련된다고 하며, 몇가지 기전에 의하여 이 억제유전자의 기능이 없어진다고 한다^{28~30)}. 처음에는 한쪽 유전자는 변이를 일으킨후 이부분을 포함하는 유전자가 소실되거나, 다른쪽이 loh에 의하여 기능이 없어지는 것으로 보여진다. 대부분의 경우에 이 소실된 유전자는 비정상적인 유전자의 복제에 의하여 대치된다.

사람의 신경아세포종에서 1번염색체중 1P의 소실은 17번 염색체 17q에 의하여 대치되어 1;17 translocation을 일으킨다^{31,32)}. 이러한 17번유전자의 이상은 53명중 20예(38%)에서 관찰되며 불량한 생존을 보이는 환자에서 발견되지만, 1번염색체의 LOH 보다는 중요치 않은 것으로 알려졌다. 최근에 개발된 방법인 fluorescence in situ hybridization이나 Southern blot으로도 이러한 현상이 증명되어 이것이 종양의 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 17번염색체이상의 위치는 17q11.2와 17q12 사이이며, 1번염색체이상의 위치는 12A-2와 pHE2. 6이다³³⁾. 17번 염색체이상부위의 위치에 존재하는 HER-2, INT-4, NGF 등이 여기에 관여하는 것으로 보인다³¹⁾. 11번 염색체를 종양세포에 이식하여 보면

실험적으로 분화를 유도할수 있으나 종양의 성질을 모두 없앨수는 없었다. 17번 염색체를 종양세포에 이식하면 세포의 성장은 변하지 않으나 종양의 성질이 없어짐을 보였다. 이러한 실험결과를 보면 11번과 17번 염색체가 신경아세포종의 악성화와 진행에 관여함을 알수있다³⁴⁾.

유전에 따른 신경아세포종의 변화는 완전히 알려지지는 않았으나, Cheng등은 22명의 신경아세포종 환자에서 N-myc의 증폭은 부친계의 유전자에서 생기나 1번염색체의 소실은 무작위로 일어나는 것으로 보고하였으나³⁵⁾, Caron등은 1번염색체의 소실과 N-myc 유전자의 증폭이 모두 모친계의 유전자에서 생긴다고 하였다³⁶⁾.

14번 염색체에서의 소실은 40%에서 일어나며, 14q32와 14qter 사이에서 일어나는 것으로 보인다³⁷⁾. 1번 염색체의 LOH가 진행성암, N-myc 증폭, 불량한 예후와 관련이 있는 반면 14번 염색체의 LOH는 진행된 암에서 보이나 N-myc 유전자의 증폭과는 관련이 없다. 따라서 이곳에 암억제유전자가 있을 가능성이 높다³⁴⁾.

N-myc 유전자의 증폭, N-myc 단백질과 기타 유전자

신경아세포종에서 30% 정도에서 N-myc 유전자의 증폭을 보이며, 이것은 세포의 암유전자가 활성화되어 높아지고 이것이 직접 종양의 생성에 관여하는 것으로 보인다. Seeger등은 N-myc 유전자의 증폭이 있는 Stage IV 환자 11명중 모두가 진단후 8개월내에 진행된 암이 되는반면, N-myc 유전자의 증폭이 없었던 환자는 21명중 6명만이 8개월 이내에 진행되는 것을 관찰하였다⁶⁾. 초기에는 N-myc 유전자가 Stage III과 Stage IV에서만 관찰되어 이것이 사망에 직접관련되는 것으로 보았으나, 최근의 연구에 의하여 N-myc 유전자의 증폭이 있는 환자에서도 항암치료에 의하여 생존기간이 다른 것으로 알려졌다³⁸⁾. 이에 의하면 N-myc 유전자의 증폭이

있는 환자에서도 5년생존율이 43.9%로 높아질수 있다³⁵⁾. 국한된 종양을 가지고 있는 장기생존환자에서도 N-myc 유전자의 증폭이 있는 경우도 보고되었다^{39,40)}.

N-myc 유전자의 증폭이 없는 환자에서는 N-myc 유전자의 증폭이 있는 환자에 비하여 예후가 좋다^{6,41)}. 그러나 Stage IV 환자에서는 N-myc 유전자의 증폭이 없어도 예후가 좋지 않다^{5,36,39)}. N-myc 유전자의 증폭이 종양의 진행에 미치는 생물학적인 기전은 밝혀져 있지않으나 처음부터 결정되는 것으로 보인다. N-myc 유전자의 증폭이 있는 것은 진단 당시에 보이며, 아직 처음에는 N-myc 유전자의 증폭이 없다가 후에 증폭이 일어난다는 보고는 없다¹⁹⁾. N-myc 유전자가 신경아세포종을 일으키는 유전자가 아니며, 바로 이웃한 부위에 있는 다른 유전자의 marker 일것이라는 주장도 있으며 이것은 진행된 암에서 N-myc 유전자의 증폭이 없는 것을 설명하는 근거가 되기도 한다. 그러나 N-myc 유전자 자체가 암유전자이며^{36~38)} 이것 이외의 다른 유전자가 증폭된다는 증거는 아직 없다¹⁵⁾.

N-myc 유전자는 2번염색체의 p23-24에 위치한다. N-myc 유전자의 증폭이 있는 경우에도 2번염색체의 자리에는 항상 1쌍의 N-myc 유전자가 있기 때문에 이자리에서 N-myc 유전자의 증폭이 일어나는 것은 아니다. 따라서 N-myc 유전자는 HSR등에 의하여 다른 곳으로 이동이 일어난후 증폭이 되는 것으로 보여진다²⁷⁾. 최근의 *in situ hybridization*에 의하면 N-myc 유전자의 증폭이 12번 염색체에서 유래되며 MDM2 유전자의 자리인 q13-14에서 일어난다⁴²⁾.

N-myc 유전자의 증폭이 없는 신경아세포종 환자에서 N-myc mRNA와 N-myc 단백질이 검출되는 경우가 있다^{3,31,43~47)}. Cohn등은 드물지만 신경아세포종에서 100분 이상의 긴 반감기를 가진 N-myc 단백질을 발견하였고, 이러한 환자에서 N-myc 유전자의 증폭은 없으나 N-myc mRNA와 N-myc 단백질이 발견된다고 하였다⁴⁸⁾. LA-N-5나 IMR-5, Kelly

세포등 N-myc 유전자가 증폭되어 있는 세포주에서 N-myc 단백질의 평균반감기는 30분에서 50분 정도이다^{49~51)}.

N-myc 유전자의 증폭이 없는 신경아세포종에서는 일반적으로 HSR이나 1번 염색체의 부분소실등은 적고 증식속도도 느린것이 특징이다^{38,48,52)}. 1번 염색체의 부분소실이 있더라도 N-myc 유전자의 증폭이 있는 세포주에 비하여 길이가 짧다²⁹⁾. N-myc 단백질의 반감기가 길어지는 것은 ubiquitin 계의 작용에 의한다고 보고되었다⁴⁸⁾.

N-myc 단백질의 기능은 아직 잘 알려져 있지 않다. 이것은 N-myc 유전자에 의하여 생성되며 DNA 간 혹은 단백질간의 상호작용에 관여한다고 생각된다. N-myc 유전자의 위치나 DNA의 결합으로 미루어보아 N-myc 단백질이 신경아세포종의 증식에 관여할 것으로 보인다^{50~53)}. N-myc 단백질의 기능중 두가지가 밝혀졌는데 하나는 C-terminal의 MAX라 불리우는 것이고 다른 하나는 N-terminal의 myc-box라는 것이다⁵⁴⁾. N-myc 유전자의 발현과 상관없이 MAX는 모든 신경아세포종에서 같은 양만큼 측정되며⁵⁵⁾, N-myc 유전자에 의하여 생성되는 단백질은 62 kDa에서 64 kDa의 크기를 갖는데 N-myc-MAX complex로 불리우기도 한다³⁰⁾. N-myc 유전자의 증폭이 없는 환자에서도 MAX-MAX의 homodimer가 발견된다^{56,57)}.

Wada의 보고에 의하면 실험동물에 이종이식한 신경아세포종에서 N-myc 유전자의 증폭이 없는 세포주가 있는 것에 비하여 성장속도가 늦다^{47,52)}. N-myc 유전자의 증폭정도가 성장속도와 반드시 비례하는 것은 아니지만 TNB1, IMR-32과 같이 성장이 빠른 세포주에서는 N-myc 유전자의 증폭이 50배 이상으로 되어 있어 N-myc 유전자와 성장간에는 복잡한 관계가 있는 것으로 보인다^{26,52)}. 따라서 신경아세포종 환자에서 N-myc 단백질의 측정이 악성도를 결정하는데 도움이 될것으로 보인다. 이를 위하여 임상적으로 N-myc 단백질의 immunohistochemical 검사가 필요하다^{46,58~60)}. N-myc 단백질의

정량검사는 아직 확립되어 있지 않으나 Moore등은 alkaline phosphatase 를 이용한 ELISA 검사법을 개발하였으며 C-myc 단백질의 항체도 개발하였다⁶¹⁾. 아직 N-myc 단백질에 대한 항체는 개발되어 있지 않아 N-myc에 대한 직접적인 검사는 어려운 실정이다. 사람의 N-myc 단백질은 지용성으로 물에 녹지 않아 항체를 개발하기 어렵다.

N-myc 유전자의 증폭은 신경아세포종뿐 아니라 횡문근육종, 망막아종, 일부의 폐암, 뇌암등에서도 발견된다^{62~65)}. 신경아세포종이 N-myc 유전자에만 관여하는지 다른 myc 유전자와도 관련이 있는지도 잘 알려져 있지 않다. Moore등은 신경아세포종의 세포주가 N-myc 단백질을 생산하며 C-myc 단백질은 생산하지 않음을 증명하였다⁶¹⁾. 그러나 이보고는 단 두가지 세포주를 가지고 실험한 것으로 신뢰도에 문제가 있다. Brodeur와 Fong은 100개 이상의 신경아세포종에서 C-myc이나 L-myc 유전자의 증폭이 없다고 하였으나⁶⁶⁾, Hemmi등은 적어도 TGW, GOTO, IMR-32, NBL-S 등 네가지 세포주에서 mRNA와 단백질에서 C-myc, L-myc, N-myc을 검출하였다고 보고하였다⁶⁷⁾. C-myc에 대한 검사는 신경아세포종에서 충분히 시행되지 않았는데 이것이 N-myc 유전자의 증폭이 없는 환자에서 악성도를 결정하는데 단서를 제공할 수도 있을 것으로 사료된다.

신경아세포종에서 N-ras, Ha-ras, K-ras, src, fos, trk 등의 암유전자는 많은 연구자들에 의하여 조사되었다. Ha-ras 유전자의 발현이 높은 환자에서는 좋은 예후가 예상되며^{68,69)}, N-myc 유전자와 같이 조사할 경우에는 좀 더 정확한 예측이 가능하다. Ha-ras, trk 유전자는 신경계세포의 분화를 일으키며 따라서 이것이 있으면 예후가 좋을 것으로 예상된다. src 암유전자는 세포막에서 태아의 뇌와 망막의 tyrosine kinase를 조절하며, 이것도 역시 발현되어 있을 경우에는 예후가 좋다. 신경아세포종에서 c-srcN2 mRNA가 높을 때에는 예후가 좋으며 N-myc 유전자의 발현과는 역비례한다⁷⁰⁾. 근래에 신경

아세포종 환자에서 trk-A mRNA가 높을 때 예후가 좋다는 것이 알려졌다¹²⁾. trk-A는 신경성장인자의 수용체(NGF-R)에 결합하며 이는 신경아세포종의 생물학적인 특성을 규명하는데 도움이 되었다. 불완전한 trk-B는 분화가 잘된 ganglioneuroma나 ganglioneuroblastoma에서 발현되며, 완전한 trk-B는 분화가 나쁜 N-myc 유전자의 증폭이 있는 진행된 신경아세포종에서 발현된다. 신경성장인자는 교감신경은 분화에 필요하기 때문에 이것의 수용체에 이상이 있을 때 신경세포의 미분화가 일어난다. 신경성장인자의 수용체는 모든 신경아세포주와 일부의 신경아세포종에서 비정상으로 존재한다⁷¹⁾. trk mRNA와 NGF-R mRNA는 나이가 어릴수록, 임상적으로 양호한 환자에서, N-myc 유전자의 증폭이 없는 환자에서 많이 검출된다¹²⁾.

bcl-2 유전자는 암유전자로 세포의 사망(apoptosis)를 방해하여 세포의 성장을 촉진한다. Castle등은 bcl-2가 불량한 예후와 상관관계를 가지며 N-myc 유전자의 증폭과도 관계가 있다고 하였다. bcl-2 유전자는 항암제에도 내성을 갖게하여 신경아세포종의 악성도를 높이는 것으로 알려졌다⁷²⁾. MDR 유전자는 MDR1 유전자에 의하여 P-glycoprotein이 증가하게 한다. MDR 단백질은 세포막의 단백질에 작용하며 이는 N-myc 유전자의 증폭과 관련이 있다. 따라서 MDR 단백질은 신경아세포종의 악성도, 항암제에 대한 내성과 관련을 가지고, MDR1 유전자 자체는 이와 직접적인 관련은 없다⁷³⁾. P53 암억제유전자는 사람의 종양에서 가장 흔히 변이가 일어나는 유전자이다. 그러나 신경아세포종에서는 이러한 현상을 발견할 수 없다^{74~76)}. N-myc 유전자의 증폭이 있는 신경아세포종에서 다양으로 검출되는 MDM2가 P53의 작용을 상쇄하는 것으로 보고되고 있다⁴²⁾. HER-2/neu(c-erbB-2) 유전자는 상피성장인자의 수용체에 작용하는 것으로 많은 사람의 종양에서 발견되며, 이는 신경아세포종에서는 불량한 예후와 밀접한 관련을 가진다. Layfield등의 보고에 의하면 HER-2neu의 발현이 있는 신경아세포종 환자의 평

균생존기간은 12개월인데 반하여 HER-2/neu의 발현이 없는 신경아세포종 환자의 평균생존기간은 138개월이었다($p=0.01$)⁷⁾.

DNA ploidy

신경아세포종에서는 hyperploidy에서는 예후가 좋으며, diploidy에서는 불량한 예후를 보인다^{7~10)}. DNA의 양에 따라서 diploid(DI=1), hyperdiploid(DI>1), hypodiploid(DI<1)로 나눌 수 있다. Hyperploidy에서 좋은 예후를 보이는 것으로는 신경아세포종, ALL 형의 백혈병, 횡문근육종증 태아형, medulloblastoma 등이 있고, 불량한 예후를 보이는 것으로는 횡문근육종증 폐포형, Wilms 종, 골수암 등이 있다⁷⁾. 신경아세포종에서 정상정인 diploid DNA를 보이는 환자는 진행된 병기와 항암제에 내성을 보인다. 항상 절대적인 것은 아니나 일반적으로 N-myc 유전자의 증폭과 diploid의 관계도 비례하는 것으로 보인다. 따라서 N-myc 유전자의 증폭과 DNA의 양을 측정함으로써 환자의 예후에 많은 정보를 얻을 수 있다. 유아에서 hyperploid인 종양을 갖는 환자는 N-myc 유전자의 증폭과 1번 염색체의 이상은 매우 적으며, 이 환자에서 임상적으로 진행된 종양을 보이더라도 좋은 예후를 예상할 수 있다. Kusafuka 등은 tetraploid(DI=1.81 이상 2.3 이하)인 환자에서는 임상적으로 diploid 환자와 같은 것을 관찰하여 이것도 diploid의 범주에 포함시킬 것을 주장하였다⁷⁾. diploid와 tetraploid를 보이는 환자는 진행된 병기, 높은 연령과 비례관계를 갖는다.

참 고 문 헌

- 1) Young JL Jr, Gloeckler-Ries L, Siverberg E, et al: *Cancer incidence, survival and mortality for children younger than age 15 years*. *Cancer* 58: 598-602, 1985
- 2) Brodeur GM, Fong CT, Morita M, et al: *Molecular analysis and clinical significance of N-myc amplification and chromosome 1p monosomy in human neuroblastomas*. *Prog Clin Biol Res* 271: 3-15, 1988
- 3) Kohl NE, Gee CE, Alt FW: *Activated expression of N-myc gene in human neuroblastoma and related tumors*. *Science* 266: 1335-1337, 1984
- 4) Schwab M, Varmus HE, Bishop JM et al: *Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of gene related to c-myc*. *Nature* 308: 288-291, 1984
- 5) Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al: *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced stage disease*. *Science* 244: 1121-1124, 1984
- 6) Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al: *Association of multiple copies of N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas*. *N Engl J Med* 313: 1111-1116, 1985
- 7) Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, et al: *Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas*. *Cancer Res* 47: 311-318, 1987
- 8) Hayashi Y, Inaba T, Hanada R, et al: *Chromosome findings and prognosis in 15 patients with neuroblastoma found by mass screening*. *J Pediatr* 112: 67-71, 1988
- 9) Cohn SL, Rademaker AW, Salwen HR, et al: *Analysis of DNA ploidy and proliferative activity in relation to histology and N-myc amplification in neuroblastoma*. *Am J Pathol* 136: 1043-1052, 1990
- 10) Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, et al: *Clinical relevance of tumor cell ploid and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study*. *J Clin Oncol* 9: 581-591, 1991
- 11) Tanaka T, Slamon DJ, Shimoda H, et al: *Expression of Ha-ras oncogene products in human neuroblastoma and the significant correlation with a patient's prognosis*. *Cancer Res* 48: 1030-1034, 1988

- 12) Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, et al: *Association between high levels of expression of TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma.* *N Engl J Med* 328: 847-854, 1993
- 13) Brodeur GM, Sekhon GS, Goldstein MN: *Chromosomal aberrations in neuroblastomas.* *Cancer* 40: 2256-2263, 1977
- 14) Gilbert F, Feder M, Balaban-Malenbaum G, et al: *Human neuroblastoma and abnormalities of chromosome 1 and 17.* *Cancer Res* 44: 5444-5449, 1984
- 15) Brodeur GM: *Neuroblastoma: Clinical application of molecular parameters.* *Brain Pathol* 1: 47-54, 1990
- 16) Fong CT, Dracopoli NC, White PS, et al: *Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: Correlation with N-myc amplification.* *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3753-3757, 1989
- 17) Hayashi Y, Kanda N, Inaba T, et al: *Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1.* *Cancer* 63:126-132, 1989
- 18) Weith A, Matinson T, Cziepluch C, et al: *Neuroblastoma consensus deletion maps to chromosome 1p36.1-2.* *Gene Chromosome Cancer* 1: 159-164, 1989
- 19) Brodeur GM, Azar C, Brother M, et al: *Effect of genetic factors on prognosis and treatment.* *Cancer* 70(6 suppl): 1685-1694, 1992
- 20) Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, et al: *Cytogenetic feature of human neuroblastoma and cell line.* *Cancer Res* 41: 4678-4686, 1981
- 21) Caron H: *Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma.* *Med Pediatr Oncol* 24: 215-221, 1995
- 22) Cox D, Yuncken C, Spriggs A: *Minute chromatin bodies in malignant tumors of childhood.* *Lancet* 2: 55-57, 1965
- 23) Kaneko Y, Tsuchida Y, Maseki N, et al: *Chromosome findings of human neuroblastomas xenografted in nude mice.* *Jpn J Cancer Res* 76: 359-364, 1985
- 24) Balaban-Malenbaum G, Gilbert F: *Double minute chromosomes and the homogeneously staining region in chromosomes of human neuroblastoma cell line.* *Science* 198: 739-741, 1977
- 25) Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al: *Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor.* *Nature* 305: 245-248, 1983
- 26) Kanda N, Tsuchida Y, Hata J, et al: *Amplification of IMR-32 clones 8, G21 and N-myc in human neuroblastoma xenografts.* *Cancer Res* 47: 3291-3295, 1987
- 27) Corvi R, Amler LC, Savelyeva L, et al: *MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-23 during amplification in human neuroblastoma cells.* *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5523-5527, 1994
- 28) Schleiermacher G, Peter M, Michon J, et al: *Two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma.* *Genes Chromosome Cancer* 10: 275-281, 1994
- 29) Cheng NC, Van Roy N, Chan A, et al: *Deletion mapping in neuroblastoma cell lines suggests two distinct tumor suppressor genes in the 1p35-36 region, only one of which is associated with N-myc amplification.* *Oncogene* 10: 291-297, 1995
- 30) Schwab M: *Human neuroblastoma; Amplification of the N-myc oncogene and loss of a putative cancer-preventing gene on chromosome 1p.* *Recent Result Cancer Res* 135: 7-16, 1994
- 31) Savelyeva L, Corvi R, Schwab M: *Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells.* *Am J Hum Genet* 55: 334-340, 1994
- 32) Caron H, van Sluis P, van Roy N, et al: *Recurrent 1: 17 translocations in human neuroblastoma reveal nonhomologous mitotic recombination during the S/G2 phase as a novel mechanism.* *Cancer Res* 54: 6145-6152, 1994

- nism for loss of heterozygosity. *Am J Hum Genet* 55: 341-347, 1994
- 33) Laureys G, Speleman F, Versteeg R, et al: Constitutional translocation t(1;17)(p36.31-p36.13; q11.2-q12.1) in a neuroblastoma patient. Establishment of somatic cell hybrids and identification of PND/A12M2 on chromosome 1 and NF1/SCY A7 on chromosome 17 as breakpoint flanking single copy markers. *Oncogene* 10: 1087-1093, 1995
- 34) Fong C, White PS, Peterson K, et al: Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 52: 1780-1785, 1992
- 35) Cheng JM, Hiemstra JL, Schneider SS, et al: Preferential amplification of the paternal allele of the N-myc gene in human neuroblastoma. *Nature Genet* 4: 191-194, 1993
- 36) Caron H, van Sluis P, van Hoeve M, et al: Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification. *Nature Genet* 4: 187-190, 1993
- 37) Suzuki T, Yokota J, Mugishima H, et al: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14 in neuroblastoma. *Cancer Res* 49: 1095-1098, 1989
- 38) Sawaguchi S, Kaneko M, Uchino J, et al: Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy: A report from the Study Group of Japan. *Cancer* 66: 1879-1887, 1990
- 39) Suita S, Zaizen Y, Kaneko M, et al: What is the benefit of aggressive chemotherapy for advanced neuroblastoma with N-myc amplification? A report from the Japanese Study Group for the Treatment of Advanced Neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 29: 746-750, 1994
- 40) Cohn SL, Look AT, Joshi VV, et al: Lack of correlation of N-myc gene amplification with prognosis in localized neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study. *Cancer Res* 55: 721-726, 1995
- 41) Seeger RC, Wada R, Brodeur GM, et al: Expression of N-myc by neuroblastoma with one or multiple copies of the oncogene. *Prog Clin Biol Res* 80: 1633-1637, 1988
- 42) Corvi R, Savelyeva L, Breit S, et al: Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene* 10: 1081-1086, 1995
- 43) Nisen PD, Waber PG, Rich MA, et al: N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 80: 1633-1637, 1988
- 44) Gardy-Leopardi EF, Schwab M, Albin AR, et al: Detection of N-myc oncogene expression in human neuroblastoma by in situ hybridization and blot analysis: Relationship to clinical outcome. *Cancer Res* 46: 3196-3119, 1986
- 45) Bartram C, Berthold F: Amplification and expression of N-myc gene in neuroblastoma. *Eur J Pediatr* 146: 162-165, 1987
- 46) Slavc I, Ellenbogen R, Jung WH, et al: Myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Res* 50: 1459-1463, 1990
- 47) Wada RK, Seeger RC, Brodeur GM, et al: Human neuroblastoma cell lines that express N-myc without gene amplification. *Cancer* 72: 3346-3354, 1993
- 48) Cohn SL, Salwen H, Quasney NW, et al: Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification. *Oncogene* 5: 1821-1827, 1990
- 49) Slamon DJ, Boone TC, Seeger RC, et al: Identification and characterization of the protein encoded by human neuroblastoma. *Science* 23: 768-772, 1986
- 50) Ramsay G, Stanton L, Schwab M, et al: Human proto-oncogene N-myc encodes nuclear proteins that bind DNA. *Mol Cell Biol* 6: 4450-4457, 1986
- 51) Ikegaki N, Bukovsky J, Kennett RH: Identification and characterization of the N-myc gene product in human neuroblastoma cells by monoclonal antibody with defined specificity.

- ficiencies. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5929-5933, 1986
- 2) Tsuchida Y, Kanda N, Shimatake H, et al: *Clinical significance of gene amplification studied in human neuroblastoma xenografts: Relationship with tumor growth rate, chemotherapeutic sensitivities and levels of neuron specific enolase.* *Expl Cell Biol* 56: 277-284, 1988
- 53) Shimatake H, Nakagawa C, Tsukahara T, et al: *A relationship between embryonal and tumor N-myc protein expression as revealed by anti N-myc protein antibody.* *Clin Chem Enzyme Comms* 2: 227-234, 1990
- 54) Wenzel A, Cziepluch C, Hamann V, et al: *The N-myc oncogene is associated with the phosphoprotein MAX (p20/22) in human neuroblastoma.* *EMBO Journal* 10: 3703-3712, 1991
- 55) Raschella G, Romeo A, Negroni A, et al: *Lack of correlation between N-myc and MAX expression in neuroblastoma tumors and in cell lines: Implication for N-myc-MAX complex formation.* *Cancer Res* 54: 2251-2255, 1994
- 56) Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN: Myc and Max protein possess distinct transcriptional activities. *Nature* 359: 426-429, 1992
- 57) Gomez-Lahoz E, Xu L, Schreiber-Agus N, et al: *Suppression of Myc, but not Ela, transformation activity by Max-associated proteins, Mad and Mxi1.* *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5503-5507, 1994
- 58) Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, et al: *Immunohistochemical analysis N-myc protein expression in neuroblastoma: Correlation with prognosis of patients.* *J Pediatr Surg* 26: 838-843, 1991
- 59) Hashimoto H, Daimaru Y, Enjoji M, et al: *N-myc gene product expression in neuroblastoma.* *J Clin Pathol* 42: 52-55, 1989
- 60) Nakada K, Fujikawa T, Kitagawa H, et al: *Expression of Nb-myc and ras oncogene products in neuroblastoma and their correlations with prognosis.* *Jpn J Clin Oncol* 23: 149-155, 1993
- 61) Moore JP, Hancock DC, Littlewood TD, et al: *A sensitive and quantitative enzyme-linked immunosorbence assay for the c-myc and N-myc oncoproteins.* *Oncogene Res* 2: 65-80, 1987
- 62) Lee WH, Murphree AL, Benedict WF: *Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma.* *Nature* 309: 458-460, 1984
- 63) Nau M, Brooks B, Carney D, et al: *Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene.* *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1092-1096, 1986
- 64) Yokoyama T, Tsukahara T, Nakagawa C, et al: *Detection of the N-myc gene product in primary retinoblastomas.* *Cancer* 63: 2134-2138, 1989
- 65) Tomlinson FH, Jenkins RB, Scheithauer BW, et al: *Aggressive medulloblastoma with high-level N-myc amplification.* *Mayo Clin Proc* 69: 359-365, 1994
- 66) Brodeur GM, Fong CT: *Molecular biology and genetics of human neuroblastoma.* *Cancer Genet Cytogenet* 41: 153-174, 1989
- 67) Hemmi H, Yamada K, Yoon U, et al: *Coexpression of the myc gene family members in human neuroblastoma cell lines.* (submitted for publication)
- 68) Tanaka T, Slamon DJ, Shimada H, et al: *A significant association of Ha-ras p21 in neuroblastoma cells with patient prognosis: A retrospective study of 103 cases.* *Cancer* 68: 1296-1302, 1991
- 69) Tanaka T, Seeger RC, Tanabe M, et al: *Prognostic prediction in neuroblastomas: Clinical significance of combined analysis for Ha-ras p21 expression and N-myc gene amplification.* *Cancer Detect Prevent* 18: 283-289, 1994
- 70) Matsunaga T, Shirasawa H, Tanabe M, et al: *Expression of neuronal src mRNA as a favorable marker and inverse correlation to N-myc gene amplification in human neuroblastomas.* *Int J Cancer* 58: 793-798, 1994
- 71) Kogner P, Barbany G, Dominici C, et al: *Coexpression of messenger RNA for TRK*

- protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* 53: 2044-2050, 1993
- 72) Dole M, Nunez G, Merchant AK, et al: *Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma*. *Cancer Res* 54: 3253-3259, 1994
- 73) Bordow SB, Harber M, Madafiglio J, et al: *Expression of the multidrug resistance-associated protein(MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma*. *Cancer Res* 54: 5036-5040, 1994
- 74) Hosoi G, Hara J, Okamura T, et al: *Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma*. *Cancer* 73: 3087-3093, 1994
- 75) Vogan K, Bernstein M, Leclerc JM, et al: *Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastoma*. *Cancer Res* 53: 5269-5273, 1993
- 76) Komuro H, Hayashi Y, Kawamura M, et al: *Mutation of the p53 gene are involved in Ewing's sarcomas but not in neuroblastoma*. *Cancer Res* 53: 5284-5288, 1993
- 77) Layfield LJ, Thompson JK, Dodge RK, et al: *Prognostic indicators for neuroblastoma: stage, grade, DNA ploidy, MIB-1-proliferation index, p53, HER-2/neu and EGFr-survival study*. *J Surg Oncol* 59: 21-27, 1995
- 78) Kreissman SG: *Molecular genetics: Toward an understanding of childhood cancer*. *Seminars Pediatr Surg* 2: 2-10, 1993
- 79) Kusafuka T, Fukuzawa M, Oue T, et al: *DNA flow cytometric analysis of neuroblastoma: distinction of tetraploid subset*. *J Pediatr Surg* 29: 543-547, 1994