

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

ゲノム情報に基づいた個体発生と
発がん・進展に関連する新規遺伝子の同定および
その機能的意義の解明と臨床応用に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中川原 章
千葉県がんセンター研究所
平成17(2005)年 4月 印刷

目 次

I. 総括研究報告

- ゲノム情報に基づいた個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子の同定
およびその機能的意義の解明と臨床応用に関する研究 ----- 1
中川原 章

II. 分担研究報告

1. 個体発生と発がんに関連する遺伝子の同定と解析 ----- 7
中川原 章
2. 発がんおよびがん幹細胞に特異的な遺伝子の機能解析 ----- 10
尾崎 俊文
3. 発がんとがんの進展を制御する遺伝子の解析 ----- 13
竹永 啓三
4. マウスモデルを用いた個体発生と発がんに関連する遺伝子の解析 ----- 16
古関 明彦

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 21

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 27

研 究 者 一 覽

ゲノム情報に基づいた個体発生と
発がん・進展に関連する新規遺伝子の同定および
その機能的意義の解明と臨床応用に関する研究

研 究 者 一 覧

主任研究者	中川原 章	千葉県がんセンター 研究所	所 長
分担研究者	尾崎 俊文	千葉県がんセンター 生化学研究部	上席研究員
	竹永 啓三	千葉県がんセンター 化学療法研究部	主席研究員
	古関 明彦	理化学研究所 免疫アレルギー科学 総合研究センター	チーム ディレクター

總 括 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

ゲノム情報に基づいた個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子の同定および
その機能的意義の解明と臨床応用に関する研究

主任研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所長

研究要旨 ゲノム情報に基づく個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子の同定および機能解析を試みた。243例の未治療神経芽腫を対象としたアレイ CGH (comparative genomic hybridization)、および136例の原発性神経芽腫を対象にした cDNA マイクロアレイ解析から、ゲノム異常と遺伝子発現様式の組み合わせにより、極めて精度の高い予後予測システムの構築が可能となった。また、ゲノム異常領域にマップされる神経芽腫候補遺伝子が固定された。また、個体発生に於いて重要な機能を有する p53 ファミリー遺伝子に関し、DNA 損傷時に p73 が核内 ATM および IKK α によりリン酸化修飾による活性化を受けることを明らかにした。一方、高転移性肺がん由来細胞株において HIF1 α が高発現していること、および、低酸素状態により我々が神経芽腫より同定した新規遺伝子 NEDL1 が発現誘導され、がん細胞の悪性度の規定に関与する可能性が示唆された。さらに、個体発生と発がんの制御に関連するポリコーム群遺伝子の解析から、Ring1B がヒストン H2A をモノユビキチン化する E3 リガーゼであることを明らかにした。

分担研究者

尾崎俊文：千葉県がんセンター・上席研究員
竹永哲三：千葉県がんセンター・主席研究員
古関明彦：理化学研究所免疫アレルギー科
学総合研究センター・チームディレクター

る遺伝子のなかで、既に発がんの制御に関わることが明らかになっている重要な遺伝子に関して機能の解析を行い、臨床応用のための新しい分子標的探索に貢献することを目標とした。

A. 研究目的

がんの個性は、それが由来する正常組織の発生生物学的特性に依存しており、そのことが、それぞれのがんの治療に対する反応性の違いに大きな影響を及ぼしている。そこで、ゲノム情報に基づいて、個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子を同定及び機能解析し、それを臨床応用することを目的とした。また、個体発生に関連す

B. 研究方法

個体発生と発がんに関連する新規遺伝子の同定は、同一組織から発生する小児がんと成人がん（神経芽腫と脳腫瘍、肝芽腫と肝細胞がん）のゲノム異常と発現遺伝子の対比から行うこととしたが、本年度は神経芽腫に関してアレイ CGH および cDNA マイクロアレイ解析を行った。アレイ CGH はカリフォルニア大学サンフランシスコ分

校がんセンターとの共同研究として行い、千葉県がんセンターにて収集された神経芽腫 243 例を対象とした。また、cDNA マイクロアレイは、我々が神経芽腫から採取した 5,300 個の cDNA を搭載した in-house DNA chip を用いた。また、分子生物学的解析には、ノザンプロット、ウエスタンプロット、免疫沈降法、CHIP アッセイ、などを用い、細胞内への遺伝子導入はトランスフェクション法を用いた。また、マウスモデルとして、コンディショナルノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

用いた神経芽腫組織は、各施設において I.C. が得られ匿名化されたものを用いた。また、がん組織に由来する DNA, RNA の取り扱いに関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. ゲノム情報に基づいて個体発生と発がん・進展に関連する新規遺伝子を同定するために、本年度は主に小児がんである神経芽腫に関して、243 例の未治療神経芽腫を対象としたアレイ CGH (comparative genomic hybridization)、および 136 例の原発性神経芽腫を対象にした cDNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、アレイ CGH 法によるゲノム異常パターンを予後との関連において層別化することができた。この層別化に最も寄与したゲノム異常は、MYCN 増幅、17 番染色体長腕の増加、1 番染色体短腕の欠失、11 番染色体長腕の欠失、および全染色体の増加であった。また、我々がこれまでに複数の神経芽腫組織から採取した 5,300 個の cDNA を搭載した in-house cDNA マイクロアレイを作製し解析を行ったところ、MYCN 増

幅例の中で治癒する例とそうでない症例とを層別化する遺伝子群が存在することを明らかにした。さらに、予後の予測が極めて困難な中間型神経芽腫は 1 歳を界にして予後が分かれ、それがゲノムの異常ではなく発現遺伝子の違いによるものであることを見出した。

2. 個体発生において重要な役割を担う p53 ファミリー遺伝子を解析したところ、シスプラチンに応答して IKK α が細胞核内に蓄積し、p73 の安定化を介してその活性を昂進させ、p53 非依存性のアポトーシスを誘導する新たな機構を見出した。さらに、抗アポトーシス活性を持つ核蛋白質として我々が 2000 年に初めて同定した NFBD1/MDC1 は、p53 のアミノ末端との直接結合を介してその Ser-15 のリン酸化を阻害し、p53 依存性のアポトーシスを抑制する機能を持つことを見出した。

3. 低酸素下で HIF-1 α mRNA を恒常的に高発現している肺癌由来高転移性細胞株の解析から、恒常的 PI3K の活性化と aPKC の関与、また HIF-1 α 遺伝子プロモーター部位への SP1 の結合量および SP1 結合配列領域における H4 ヒストンのアセチル化の亢進を見出した。

4. 個体発生と発がんの制御に関連するポリコーム群遺伝子の解析から、Ring1B がヒストン H2A をモノユビキチン化する E3 リガーゼであることを明らかにした。

D. 考察

神経芽腫のアレイ CGH 解析により、各サブセットにおけるゲノム異常領域の同定ができただけでなく、それらの組み合わせが予後と強い相関を有することが明らかとなった。現在、さらに詳細な解析を進めているが、ホモ欠失と思われる領域や、遺伝子増幅領域から新たながん関連遺伝子が同定される可能性が高い。また、MYCN 増

幅を有する症例の予後は極めて不良であるが、近年の集学的治療により、約30%の症例が治癒に至るようになった。今回の我々の cDNA マイクロアレイを用いた解析から、そのような治癒する例とそうでない症例とを層別化する遺伝子群が大量に存在することが明らかになったことは驚きであった。さらに、いわゆる予後予測困難な中間群の遺伝子発現様式が1歳を堺にして明確に分かれ、しかもそれらが予後に反映しているという事実は、これらのマイクロアレイを臨床に応用するうえで、極めて重要な知見であった。脳腫瘍、肝芽腫、肝細胞がんのマイクロアレイ解析も現在進行中であり、発生系統を同一にする小児がんとな成人がんの対比はさらに重要な情報を与えてくれるものと期待される。

p53 および p73 の核内機能に関する解析結果は、がん細胞に対する抗がん剤治療の効果を増強する新しい分子標的治療を開発するための道を開くものと期待される。また、低酸素状態とがん細胞の高転移性に関する分子生物学的知見は、転移の予防を視野に入れた分子標的研究へと展開が期待される。さらに、抗がん剤に耐性であることが予想されているがん幹細胞の同定および解析へと展開することも期待される。

ポリコーム群遺伝子は発がんとは個体発生を結ぶ重要な機能を担っていることが予想されており、細胞周期制御の観点からも興味深い。

E. 結論

近年の DNA チップを用いた網羅的な解析手法から、少なくとも神経芽腫に関しては、ゲノム異常の様式と遺伝子発現プロファイルを重ね合わせることにより、極めて精度の高い予後予測が可能であることが実証された。今後、これらの実用化ミニチップの開発が期待できる。また、これらの方

法により、個体発生と発がんに関連する新規遺伝子の同定が具体的になってきた。p53 ファミリー遺伝子の解析結果および低酸素状態における HIF1 α 発現誘導と転移との関係は、新たな治療法開発へ繋がるものと期待される。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. In *NGF and Related Molecules in Health and Disease*, Ed. By Luigi Aloe and Laura Calza, Progress in Brain Research Vol. 146, 2004, Elsevier Science Publisher, pp233-242.
2. Nakagawara A., Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue: Neural development and cancer. *Cancer Lett.* 204:23-224, 2004.
3. Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T., Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 11327-11335, 2004.
4. Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of *Nbla10449/hNLRR-1* and *Nbla10677/hNLRR-3* with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int. J. Oncol.* 24:1457-1466, 2004
5. Ohtori S, Isogai E, Hasue F, Ozaki T., Nakamura Y, Nakagawara A., Koseki H., Yuasa S, Hanaoka E, Shinbo J, Yamamoto

- T, Chiba H, Yamazaki M, Moriya H, Sakiyama S. Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene abrrative in neuroblastoma. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:504-514, 2004.
6. Wang YQ, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Takenaga K, Shishikura T, Nakagawara A, Sakiyama S, Tagawa M and O-Wang J. Elevated expression of DNA polymerase k in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.* 25:161-165, 2004.
 7. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:25549-25561. 2004.
 8. Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A, Ohnuma N, Yokoyama T. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 91:972-979, 2004.
 9. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the *Plk1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 23:5901-5911, 2004.
 10. Takahashi M, Ozaki T, Todo S, Nakagawara A. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene INGI1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncol Rep.* 12:811-816, 2004.
 11. Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int. J. Cancer* 112:365-375, 2004.
 12. Nakagawara A. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. S. Cohn & N-K. Cheung, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg. (in press)
 13. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
 14. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
 15. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* (in press)
 16. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A, Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* (in press)
 17. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* (in press)
 18. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H,

- Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* (in press)
19. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit b (PKA-Cb) as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* (in press)
 20. Kato C, Kojima T, Komaki M, Mimori K, Duarte WR, Takenaga K, Ishikawa I. S100A4 inhibition by RNAi up-regulates osteoblast related genes in periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 326:147-153, 2005.
 21. Kondo N, Ichimiya S, Tamura Y, Tonooka A, Koshiba S, Torigoe T, Kamiguchi K, Takenaga K, Sato N. A calcium binding protein, S100A4, mediates T cell dependent cytotoxicity as a transformation-associated antigen. *Microbiol Immunol.* 49:49-56, 2005.
 22. Kozlova N, Takenaga K. A procedure for culturing astrocytes from white matter, and the application of the siRNA technique for silencing the expression of their specific marker, S100A4. *Brain Res Brain Res Protoc.* (in press).
 23. Koike J, Wakao H, Ishizuka Y, Sato TA, Hamaoki M, Seino K, Koseki H, Nakayama T, Taniguchi M. Bone Marrow Allograft Rejection Mediated by a Novel Murine NK Receptor, NKG2I. *J Exp Med.* 199:137-144. (2004)
 24. Shimizu E, Koike J, Wakao H, Seino K, Koseki H, Kakiuchi T, Nakayama T, and Taniguchi M. Role of a NK receptor, KLRE-1, in bone marrow allograft rejection: analysis with KLRE-1-deficient mice. *Blood*104:781-783. (2004)
 25. Matsumoto M, Miki T, Shibasaki T, Kawaguchi M, Shinozaki H, Nio J, Saraya A, Koseki H, Miyazaki M, Iwanaga T, and Seino S. Noc2 is essential in normal regulation of exocytosis in endocrine and exocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8313-8318. (2004)
 26. Kato Y, Fukamachi H, Takano-Maruyama M, Aoe T, Murahashi Y, Horie S, Suzuki Y, Saito Y, Koseki H, and Ohno H. Reduction of SNAP25 in acid secretion defect of Fox11^{-/-} gastric parietal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 320:766-772. (2004)
 27. Hamada H, Suzuki M, Yuasa S, Mimura N, Shinozuka N, Takada Y, Suzuki M, Nishino T, Nakaya H, Koseki H, and Aoe T. Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 24:8007-8017. (2004)
 28. Okazaki N, F-Kikuno R, Ohara R, Inamoto S, Koseki H, Hiraoka S, Saga Y, Seino S, Nishimura M, Kaisho T, Hoshino K, Kitamura H, Nagase T, Ohara O, and Koga H. Prediction of the coding sequences of mouse homologues of KIAA gene: IV. The complete nucleotide sequences of 500 mouse KIAA-homologous cDNAs identified by screening of terminal sequences of cDNA clones randomly sampled from size-fractionated libraries. *DNA Res.* 11:205-218. (2004)
 29. Yamada R, Mizutani-Koseki Y, Koseki H, and Takahashi N. Requirement for Mab2112 during development of murine retina and ventral body wall. *Dev Biol.* 274:295-307. (2004)
 30. Okazaki N, Kikuno R, Ohara R, Inamoto S, Koseki H, Hiraoka S, Saga Y, Kitamura H, Nakagawa T, Nagase T, Ohara O, and Koga H. Prediction of the coding sequences of mouse homologues of FLJ genes: the complete nucleotide sequences of 110 mouse FLJ-homologous cDNAs identified by screening of terminal sequences of cDNA clones randomly sampled from size-

- fractionated libraries. *DNA Res.* 30:127-135. (2004)
31. Nakajima M, Moriizumi E, Koseki H, and Shirasawa T. Presenilin 1 is essential for cardiac morphogenesis. *Dev Dyn.* 230:795-799. (2004)
32. Sanchez-Beato M, Sanchez E, Garcia JF, Perez-Rosado A, Montoya MC, Fraga M, Jesus Artiga M, Navarrete M, Abaira V, Morente M, Esteller M, Koseki H, Vidal M, and Piris MA. Abnormal PcG protein expression in Hodgkin's lymphoma. Relation with E2F6 and NFkappaB transcription factors. *J Pathol.* 204(5) 528-37 (2004)
33. de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, and Brockdorff N. Polycomb Group Proteins Ring1A/B Link Ubiquitylation of Histone H2A to Heritable Gene Silencing and X Inactivation. *Dev Cell.* 7:663-676. (2004)
34. Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamijo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, van Lohuizen M, and Nakauchi H. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* 21:843-851. (2004)
35. Isono K, Mizutani-Koseki Y, Komori T, Schmidt-Zachmann MS, and Koseki H. Mammalian polycomb-mediated repression of Hox genes requires the essential spliceosomal protein Sf3b1. *Genes Dev.* 19:536-541. (2005)
36. Baba T, Shimizu T, Suzuki YI, Ogawara M, Isono KI, Koseki H, Kurosawa H, and Shirasawa T. Estrogen, insulin, and dietary signals cooperatively regulate longevity signals to enhance resistance to oxidative stress in mice. *J Biol Chem.* (2005 in press.)
37. Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, Urano T, Kimura Y, Kubota Y, Maekawa H, Miyamoto T, Miyata K, Matsumoto SI, Sakai J, Nakagata N, Takeya M, Koseki H, Ogawa Y, Kadowaki T, and Suda T. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat Med.* (2005 in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願中：2件

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

個体発生と発がんに関連する遺伝子の同定と解析

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所長

研究要旨 個体発生の分子機構と発がんのメカニズムを明らかにすることを目的とし、神経系および肝臓から発生する小児および成人がんを対象とした分子レベルでの系統的な比較解析を開始した。本年度は主に小児神経芽腫の解析が進み、243例の神経芽腫を対象としたアレイ CGH の解析から、従来の予後因子によるサブセット分類を改め、新たなゲノム異常による予後と相関した層別化に変えることができた。また、136例のin-house cDNA microarray による発現解析結果を組み合わせることで、17q gain などのゲノム異常領域における候補遺伝子の絞り込みと、epigenetic な制御によると思われる予後への影響などの事実を明らかにした。また、肝がんに関しては、小児肝芽腫と成人肝細胞がんのアレイ CGH 結果の比較から、後者に特有なゲノム異常領域が明らかになった。

A. 研究目的

ゲノム情報に基づいた発がんの分子機構解明のために、アレイ CGH (array comparative genomic hybridization) 法と in-house cDNA microarray 法を組み合わせ、神経および肝から発生する小児および成人のがんを対比させる研究戦略を計画した。環境因子の少ない小児がんを研究対象に加えることにより、正常組織発生の分子機構と発がんのメカニズムをより単純な系で解析でき、さらに、その結果から得られる比較類推から、組織幹細胞に由来すると思われる成人がんの発がん機構を明らかにすることがより容易になることを期待した。初年度は、主に小児神経芽腫の機能ゲノム解析を行い、興味ある成果が得られた。

B. 研究方法

アレイ CGH 用チップは、米国カリフォルニア大学サンフランシスコ分校がんセンターが開発した 2464 BAC クローンを搭載したチップを用いた。また、in-house cDNA microarray は、神経芽腫組織に由

来する複数の cDNA ライブラリーから抽出した 5300 個の cDNA を固定したのを用い、Cy3, Cy5 を蛍光マーカーとして使用した。そのほか、通常の分子生物学的、生化学的解析手法を用いた。

C. 研究結果

243例の未治療神経芽腫を対象としたアレイ CGH および 136例の原発性神経芽腫を対象にした cDNA マイクロアレイ解析の結果、アレイ CGH 法によるゲノム異常パターンを予後との関連において次の3つに層別化することができた。1) 広範なゲノム異常がほとんど見られない silent group、2) genomic instability が中心と思われる染色体の partial gains/losses group、3) mitotic dysfunction が原因と思われる whole chromosome gains/losses group。この層別化に最も寄与したゲノム異常は、MYCN 増幅、17番染色体長腕の増加、1番染色体短腕の欠失、11番染色体長腕の欠失、および全染色体の増加であった。また、我々がこれまでに複数の神経芽腫組織から採取した 5,300 個の cDNA を搭載した in-house

cDNA マイクロアレイを作製し解析を行ったところ、MYCN 増幅例の中で治癒する例とそうでない症例とを層別化する遺伝子群が存在することが明らかになった。一方、層別化に最も寄与した 17q gain の領域に、gain の見られる症例群において高く発現している遺伝子を microarray の結果から同定した。今後、機能解析を進める予定である。さらに、予後の予測が極めて困難な中間型神経芽腫に相当するゲノム異常グループは 1歳を界にして予後が分かれ、それがゲノムの異常ではなく発現遺伝子の違いによるものであることを見出した。

肝芽腫と肝細胞がんのアレイ CGH データの比較から、基本的には両者のゲノム異常のパターンが類似していることが判明したが、明らかに後者に特異的と思われる異常領域を 3カ所見出した。

D. 考察

従来、神経芽腫の層別化は、予後因子である病期、MYCN 増幅、年齢、DNA ploidy などにより行われてきた。しかしながら、そのような層別化は必ずしも予後を正確に反映せず、とくに、従来の中間型に属する神経芽腫に関しては、全く予後との関連を明確にすることができなかった。今回の我々が新しく確立したゲノム異常に基づく層別化は、これらの問題を非常に明確に解決し、神経芽腫における発がん機構の異常の違いを反映した新しい層別化と予後予測の系が確立されたと言える。本研究プロジェクトの目的は、このような新しい系の中から、具体的な神経芽腫候補遺伝子を同定し、それらが神経発生の過程でどのような機能的意義を有しているのかを知ることにある。すでに、17q gain の領域から候補遺伝子が絞り込まれたので、今後これらの機能解析を進めていく。

また、肝芽腫と肝細胞がんの比較アレイ CGH のデータから、明らかに後者に特異

的な領域が少なくとも 3カ所明らかになった。両者は、同じ肝細胞から発生してくるがんでありながら、肝芽腫は抗がん剤に感受性が高く治癒率が良好であるのに対し、肝細胞がんは抵抗性であり、今回見出した染色体異常領域が抗がん剤感受性の違いに関連している可能性が示唆された。

E. 結論

神経芽腫のアレイ CGH とマイクロアレイ解析から、発がん機序と予後を結びつける新たな層別化に成功した。臨床的応用とともに、異常領域からの原因遺伝子の同定が期待される。また、肝芽腫と肝細胞がんの同様な比較から、後者に特異的なゲノム異常領域を明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. In *NGF and Related Molecules in Health and Disease*, Ed. By Luigi Aloe and Laura Calza, Progress in Brain Research Vol. 146, 2004, Elsevier Science Publisher, pp233-242.
2. Nakagawara A., Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue: Neural development and cancer. *Cancer Lett.* 204:23-224, 2004.
3. Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 11327-11335, 2004.
4. Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of *Nbla10449/hNLRR-1* and *Nbla10677/hNLRR-3* with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int. J. Oncol.* 24:1457-1466, 2004
5. Ohtori S, Isogai E, Hasue F, Ozaki T, Nakamura Y, Nakagawara A., Koseki H, Yuasa S, Hanaoka E, Shinbo J, Yamamoto

- T, Chiba H, Yamazaki M, Moriya H, Sakiyama S. Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene abrrative in neuroblastoma. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:504-514, 2004.
6. Wang YQ, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Takenaga K, Shishikura T, Nakagawara A, Sakiyama S, Tagawa M and O-Wang J. Elevated expression of DNA polymerase k in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.* 25:161-165, 2004.
 7. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:25549-25561. 2004.
 8. Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A, Ohnuma N, Yokoyama T. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 91:972-979, 2004.
 9. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the *Plk1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 23:5901-5911, 2004.
 10. Takahashi M, Ozaki T, Todo S, Nakagawara A. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene ING1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncol Rep.* 12:811-816, 2004.
 11. Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int. J. Cancer* 112:365-375, 2004.
 12. Nakagawara A. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. S. Cohn & N-K. Cheung, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg.
 13. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
 14. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
 15. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* (in press)
 16. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A, Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* (in press)
 17. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* (in press)
 18. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* (in press)
 19. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit b (PKA-Cb) as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* (in press)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

発がんおよびがん幹細胞に特異的な遺伝子の機能解析

分担研究者 尾崎 俊文 千葉県がんセンター上席研究員

研究要旨 シスプラチンに応答した核内 IKK- α との相互作用を介した p73 の安定化が、特に p53 非依存性のアポトーシスを誘導する新たな分子機構の一つであることを明らかにした。また、DNA 修復複合体の構成メンバーの一つである NFB1 が、アドリアマイシンに対する細胞の初期応答過程において p53 のアポトーシス誘導能を抑制することによって、細胞の生と死を制御する重要な因子であることを見出した。

A. 研究目的

がん細胞の抗癌剤耐性獲得という現象は、癌治療の現場における大きな問題の一つであり、その耐性克服に向けた研究の展開は極めて重要である。我々はアポトーシス誘導活性を持つがん抑制蛋白質である p53 および p73 に着目し、抗癌剤処理に応答したがん細胞の初期修復過程、ならびにアポトーシス誘導過程における両者の活性制御機構を解明することによって、抗癌剤耐性獲得の分子機構を明らかにすると同時に、耐性克服を可能にする手法の開発を目指す。さらに、がん幹細胞の性質を規定すると考えられる遺伝子産物を同定し、発がん過程における p53 および p73 との機能的相互作用、あるいは p53 および p73 による発現制御の有無を検討することによって、これらの遺伝子を対象とした分子標的治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

培養細胞への遺伝子導入はリポフェクトアミン試薬を用いて行った。蛋白質間相互作用の解析は、免疫沈降法および GST pull-down 法に基づいて行った。p73 および p53 の転写活性化能については、ルシフェラーゼレポーター法および RT-PCR を用いて評価した。またアポトーシスの検出は、

トリパンブルー染色および MTT 法を用いて行った。内在性蛋白質のノックダウンについては、特異的 siRNA を用いて行った。

（倫理面への配慮）

当該項目に該当する実験はない。

C. 研究結果

シスプラチンによるアポトーシス誘導過程における核内 IKK- α との相互作用を介した p73 の安定化は、そのユビキチン化の阻害に起因し、siRNA による内在性 IKK- α のノックダウン細胞および IKK- α のノックアウトマウス由来の MEF では観察されなかった。また、IKK- α は p53 とは結合せず、その安定性および活性に対しては影響を及ぼさなかった。さらに、IKK- α による p73 の安定化はワートマニンに感受性であり、しかも ATM を欠く細胞では観察されなかった。一方、アドリアマイシンに対する細胞の初期応答過程において、NFB1 は p53 のアミノ末端と物理的に結合することによって ATM による p53 の Ser-15 のリン酸化を抑制し、p53 依存性のアポトーシス誘導を阻害することが判明した。しかしながら、アドリアマイシンによるアポトーシス誘導過程においては、NFB1 の転写および蛋白質レベルでの発現低下が検出された。その結果 NFB1 による p53 の抑制が解除さ

れ、Ser-15 のリン酸化の昂進を伴う p53 の活性化が認められた。

D. 考察

IKK- α のノックアウトマウス由来の MEF は、野生型の MEF に比べてシスプラチンに対する感受性が低いことから、IKK- α との相互作用を介した p73 の安定化は、DNA 損傷に応答したがん細胞のアポトーシスを制御する重要な因子の一つであると考えられる。また、シスプラチンに応答した IKK- α の核内蓄積を制御する上流因子の一つとして ATM の活性化の有無が示唆された。一方、DNA 損傷の初期応答過程においては NFBD1 による p53 のアポトーシス誘導活性の阻害が認められ、NFBD1 を含む修復複合体による損傷 DNA の修復が進行するものと考えられた。

E. 結論

シスプラチンに応答した IKK- α による p73 の安定化は p73 に特異的な活性化の新たなシステムであり、特に変異型 p53 を持ちしかも抗癌剤耐性を示すがん細胞にアポトーシスを誘導するための有効な手掛かりを提供するものと考えられる。また、NFBD1 との物理的な結合を介した p53 の抑制機構は、DNA 損傷に対する初期応答過程における細胞の生と死を制御する極めて重要なシステムの一つであると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ozaki,T., Hosoda,M., Miyazaki,K., Hayashi,Y., Watanabe,K., Nakagawa,T., Nakagawara,A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.*, in press.
- 2) Aoyama,M., Ozaki,T., Inuzuka,H., Tomotsune,D., Hirato,J., Okamoto,Y., Tokita,H., Ohira,M., Nakagawara,A.

LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.*, in press.

- 3) Hanamoto,T., Ozaki,T., Furuya,K., Hosoda,M., Hayashi,S., Nakanishi,M., Yamamoto,H., Kikuchi,H., Todo,S., Nakagawara,A. Identification of protein kinase A catalytic subunit β (PKA-C β) as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J.Biol.Chem.*, in press.
- 4) Lin,L., Ozaki,T., Takada,Y., Kageyama,H., Nakamura,Y., Hata,A., Zhang,J.-H., Simonds,W., Nakagawara,A., Koseki,H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene*, in press.
- 5) Kramer,S., Ozaki,T., Miyazaki,K., Kato,C., Hanamoto,T., Nakagawara,A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene*, 24:938-944, 2005.
- 6) Takahashi,M., Ozaki,T., Todo,S., Nakagawara,A. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene *ING1* is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncology Rep.*, 12:811-816, 2004.
- 7) Kato,C., Miyazaki,K., Nakagawa,A., Ohira,M., Nakamura,Y., Ozaki,T., Imai,T., Nakagawara,A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and enhanced tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with neuronal differentiation in neuroblastomas with favorable prognosis. *Int.J.Cancer*, 112: 365-375, 2004.
- 8) Ando,K., Ozaki,T., Yamamoto,H., Furuya,K., Hosoda,M., Hayashi,S., Fukuzawa,M., Nakagawara,A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by

- physical interaction and phosphorylation.
J.Biol.Chem., 279:25549-25561, 2004.
- 9) Ohtori,S., Isogai,E., Hasue,F., Ozaki,T.,
Nakamura,Y., Nakagawara,A., Koseki,H.,
Yuasa,S., Hanaoka,E., Shinbo,J.,
Yamamoto,T., Chiba,H., Yamazaki,M.,
Moriya,H., Sakiyama,S. Reduced
inflammatory pain in mice deficient in the
differential screening-selected gene
aberrative in neuroblastoma.
Mol.Cell.Neurosci., 25:504-514, 2004.
- 10) Miyazaki,K., Fujita,T., Ozaki,T., Kato,C.,
Kurose,Y., Sakamoto,M., Kato,S., Goto,T.,
Itoyama,Y., Aoki,M., Nakagawara,A.
NEDL1, a novel ubiquitin-protein
isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets
mutant superoxide dismutase-1.
J.Biol.Chem., 279:11327-11335, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況
出願中：2件

発がんとかんの進展を制御する遺伝子の解析

分担研究者 竹永啓三 千葉県がんセンター研究局化学療法研究部 主席研究員

研究要旨 肺癌由来の高転移性細胞株 (A11, D6) を低酸素下で培養すると、低転移性細胞株 (P29, P34) と比較して、血管新生因子 VEGF を多量に産生する。この原因を探る過程で、高転移性細胞株が恒常的に HIF-1 α mRNA を高発現していることを見出した。そこで、この HIF-1 α mRNA 高発現に至るシグナル伝達経路を検討した。その結果、高転移性細胞株では PI3K および Akt/PKB が恒常的に活性化されており、この下流に PKC が存在することが明らかになった。また、HIF-1 α 遺伝子の転写制御領域の解析より、転写活性化には Sp1 の結合、Sp1 結合領域におけるヒストンのアセチル化が重要であることが判明した。しかし、高転移性株と低転移性株間で Sp1 の結合量、ヒストンのアセチル化に差は見出せず、他の要因の関与が示唆された。一方、高転移性細胞株では活性酸素種が多く発生しており、抗酸化剤やミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤の処理により HIF-1 α mRNA の発現が抑制されることから、ミトコンドリア由来の活性酸素種が HIF-1 α mRNA の高発現に関与していることが明らかになった。

一方、腫瘍内低酸素はがん細胞の悪性度進展に関与することが知られている。これに関与する遺伝子を明らかにするために、神経芽腫由来細胞株を低酸素に曝露し、発現が変化する遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、今までに報告の無い数種類の遺伝子が低酸素に反応し発現が変化する事を見出した。

A. 研究目的

腫瘍内低酸素は、がん細胞に様々な生物学的作用を及ぼす。例えば、解糖系酵素や血管新生因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現亢進、生存・死に関する遺伝子の発現修飾、転移能の亢進、遺伝子不安定性の誘導、脱分化、抗癌剤や放射線耐性に関与する遺伝子の発現亢進などが知られている。これらの現象に関与する遺伝子やシグナル伝達経路の解明は、がんの悪性度進展の抑制、さらには発がんを抑制するための標的の解明につながる可能性を秘めている。

我々は、肺癌由来の高転移性細胞株が、低転移性細胞株と比較して、微小血管に富んだ腫瘍を形成することからその機序の解析を進め、低酸素下における VEGF の高発現と hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) mRNA の恒常的な高発現に起因することをこれまでに見出している。そこで本年度は、高転移性細胞株において HIF-1 α mRNA の高発現が起こ

る機序を解明することを目的とした。

一方、上記の理由から、新規低酸素応答遺伝子の探索を行なうことは重要な課題である。そこで、神経芽細胞腫をモデル系として用い、また千葉県がんセンター研究局で独自に開発された神経芽腫 DNA チップを用い、低酸素応答遺伝子の網羅的解析を行なうことを目的とした。

B. 研究方法

細胞は、ルイス肺癌由来の高転移性細胞株 (A11, D6)、低転移性細胞株 (P29, P34) および神経芽細胞 (SH-IN, BE(2)C, BE(2)N, SH-SY5Y) を用いた。HIF-1 α mRNA の発現はノーザンブロット法により調べた。HIF-1 α 遺伝子プロモーター領域の解析はルシフェラーゼレポーターアッセイで行った。ゲルシフトアッセイは、HIF-1 α 遺伝子の転写開始点近傍に存在する Sp1 結合部位様配列をプローブとして用い行った。クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ)

は抗 Sp1 抗体および抗アセチル化ヒストン H4 抗体を用いて行った。活性酸素種 (ROS) の検出は H₂DCFDA を用いて行った。低酸素応答遺伝子の解析は、2% 酸素濃度下で 24 時間培養した神経芽細胞株から調製した全 RNA と神経芽腫 DNA チップを用いて行った。

C. 研究結果

最初に、actinomycin D 処理後の A11 および P29 細胞における HIF-1 α mRNA の安定性を比較したところ差は認められず、A11 細胞における HIF-1 α mRNA の高発現は転写レベルの差に起因することが示唆された。次に、A11 細胞に PI3K の阻害剤 LY294002 を作用させたところ、HIF-1 α mRNA の発現量が P29 細胞における発現量と同じレベルにまで減少することが判った。また、PI3K の下流に存在する Akt/PKB の活性化をそのリン酸化を指標にして調べたところ、高転移性細胞株では恒常的にリン酸化されていることが明らかになった。しかし、p38MAPK、p44/p42MAPK、JNK あるいは PTEN のリン酸化に差異は認められなかった。さらに、PKC 阻害剤 Ro31-8220 処理により HIF-1 α mRNA の発現が顕著に抑制されることが判明した。一方、HIF-1 α 遺伝子プロモーター領域 (転写開始点より約 1.9Kb 上流領域) の欠失変遺体および点突然変遺体の解析およびゲリシフト解析により、転写開始点近傍に存在する Sp1 結合配列がそのプロモーター活性に重要であることが判った。そこで、ChIP アッセイを用い、この領域への *in vivo* における Sp1 の結合量とヒストン H4 のアセチル化の程度を A11 と P29 細胞間で比較したが差は認められなかった。次に、高転移性細胞株で Akt/PKB が活性化されている原因を追及したところ、Akt/PKB を活性化させることの報告されている ROS が A11 細胞で多く発生していることが判った。さらに、A11 細胞に抗酸化剤 ebselene や PDTC あるいはミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤であり ROS の発生を抑制する myxothiazol を作用させると HIF-1 α mRNA の発現が

低下することが判った。逆に、P29 細胞に H₂O₂ を作用させると HIF-1 α mRNA の発現が上昇することが明らかになった。

一方、神経芽細胞腫を 2% 酸素下で 24 時間培養し、低酸素に応答して発現の変化する遺伝子を網羅的に解析したところ、現在までに報告されている遺伝子以外に、数種類の遺伝子の発現が低酸素に反応することが明らかになった。そのうちの 1 つは筋萎縮性側索硬化症に関連することが示唆されている HECT 型ユビキチンライゲース NEDL1 であった。この遺伝子の発現は、低酸素を模倣する薬剤の処理や constitutive active HIF-1 α の導入により亢進されるこが判った。

D. 考察

高転移性肺癌細胞株における HIF-1 α mRNA の発現の亢進は、ミトコンドリア由来の ROS による PI3K-Akt/PKB の活性化および PKC の活性化が主な原因であることが示唆された。Sp1 は HIF-1 α 遺伝子の転写調節に重要な役割を果たしているが、高転移性と低転移性細胞株間でその発現量や転写調節領域中の Sp1 結合部位への結合量に差がないことより、HIF-1 α mRNA の高発現に直接には関わっていないと考えられた。本実験で用いた転写調節領域よりもさらに上流領域への何らかの転写因子の結合が重要である可能性があり、今後の検討課題である。本研究により、ROS が HIF-1 α mRNA の転写の調節に関わっていることが明らかになったことから、ROS の発生を阻害することにより低酸素下での HIF-1 α 蛋白質の蓄積や VEGF の産生の抑制、さらには腫瘍血管新生や転移の抑制ができる可能性も考えられる。

神経芽細胞における低酸素応答遺伝子の検索により、新たに NEDL1 が HIF-1 の標的遺伝子であることが明らかになった。HIF-1-NEDL1 が、がんの悪性度進展や筋萎縮性側索硬化症の発症とどのように関連するのかの解明が今後の研究課題である。また、他