

厚生労働科学研究研究費補助金
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17年度 総括研究報告書

主任研究者 中川原 章

平成18(2006)年3月

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		
中川原 章	-----	1
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		
中川原 章	-----	6
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		
尾崎 俊文	-----	9
3. 発がんとかんの進展を制御する遺伝子の解析		
竹永 啓三	-----	11
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		
古関 明彦	-----	14
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	24

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 ゲノム情報を利用し、個体発生と発がん・進展の分子機構を明らかにするとともに、それらの情報を臨床応用することを目的として、昨年度に引き続き以下のことを明らかにした。
(1) 神経芽腫および肝芽腫のアレイ CGH および発現プロファイルの結果から、神経芽腫の発がんに関する新しい作業仮説を提唱し、MYCN増幅症例の治癒に関与する遺伝子群を明らかにした。また、肝細胞がんと異なる肝芽腫に特異的なゲノム異常領域を同定した。(2) DNA 損傷に伴う p53 の機能制御に NFBD1 が関与すること、および p53 非依存性経路として p73 の活性化と安定化機構が存在することを明らかにした。(3) 低酸素応答遺伝子として見いだした NEDL1 と PDLIM2 が HIF1 のターゲットであり、がん細胞の運動能、浸潤能の制御に関わっている可能性を見いだした。(4) ほ乳類ポリコム群による Ink4a/p53 経路への抑制作用は、ポリコム群の Ink4a 遺伝子座への直接結合によるものであり、その結合は Pc12 のポリコム群への直接作用により解除される可能性を示した。

分担研究者

尾崎俊文・千葉県がんセンター・上席研究員
竹永啓三・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

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、昨年度に引き続き、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的とした。

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、肝芽腫、肝細胞がんに関してアレイ 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、肝芽腫、肝細胞がん組織は、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、本年度は神経芽腫 243 例のアレイ CGH (comparative genomic hybridization)、神経芽腫 136 例の cDNA マイクロアレイ解析、さらに、肝芽腫および肝細胞がんを対象に同様の解析を行った。その結果、243 例の神経芽腫を対象としたアレイ CGH の解析から、神経芽腫の発がんに関する新しい作業仮説を導いた。また、MYCN 増幅症例のうち、現在の治療により治癒する群と治癒しない群との間で異なって発現する遺伝子群を同定した。この中に、多くの神経発生に関連した遺伝子が含まれていた。さらに、17q gain の候補遺伝子 OAN を同定し、その機能を明らかにした。一方、肝芽腫のアレイ CGH と発現プロファイルにより、予後の予測系が確立できた。また、肝芽腫と成人肝細胞がんとは異なるゲノム異常領域を複数同定した。

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、シスプラチンによる DNA 損傷時に起こる p53 非依存性のアポトーシスの誘導が核内 IKK α による p73 の安定化を介しており、さらにその上流に ATM が存在することを明らかにした。また、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 を蛋白質レベルで直接制御することにより細胞の生と死の選択に深く関わっていることを明らかにした。さらに、NF- κ B による p73 の負の制御機構を見いだした。

3. 新規低酸素応答 NEDL1 遺伝子の転写開始点の近傍に機能的な HIF-1 結合配列が存在することを見いだした。また、NEDL1 の強制発現は Dvl-1 によるマウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞の神経突起形成の促進を阻害した。一方、やはり低酸素に応答する PDLIM2 遺伝子の発現が HIF-1 の制御下にあること、高浸潤性乳癌細胞では PDLIM2 遺伝子が高発現しており、siRNA を用いて PDLIM2 遺伝子の発現を抑制すると運動能、浸潤能が顕著に抑制されることを見出した。

4. ポリコム群複合体は、MEF において Ink4a 遺伝子座へ直接結合することにより、Ink4a 遺伝子座の転写抑制に寄与した。同じく Ink4a 遺伝子座の転写抑制に寄与する分子である E2F3b の Ink4a 遺伝子座への結合は、E2F サイトだけではなくポリコム群複合体との直接的な結合を介しておこるものと考えられた。一方、ポリコム複

合体に結合するタンパクである Pcl2 は、Ink4a を脱抑制させる機能を有し、この機能はポリコム群タンパクの発現を低下させることにより起こった。

D. 考察

神経芽腫の網羅的ゲノム情報により、silent genomic pattern を示す群の中に Knudson が言う神経芽腫の抑制遺伝子が存在する可能性を提唱した。今後、その神経芽腫抑制遺伝子の同定に向けて研究を展開する必要がある。また、予後不良な神経芽腫において高頻度見られる 17q gain の候補遺伝子 OAN の同定は極めて興味深く、今後これをターゲットとする治療法の開発が期待できる。さらに、MYCN が増幅した神経芽腫は、約 20 年前にはほぼ全例死亡していたが、現在では国際的にも約 30% が生存出来る時代になっている。しかしながら、その理由は全く不明である。今回の我々の解析は、まず、上記の生存、死亡を有意に分ける遺伝子群を同定したことに重要な意味があり、さらに、それらの上位にランクされた遺伝子群には神経発生の過程で重要な機能を発揮していることが明らかになっている遺伝子が複数含まれていた。したがって、我々が当初目指した、個体発生と発がん、あるいは、発がんとなんの悪性度決定に関わる遺伝子群の同定に、早くも達してきたことになる。今後は、それらの遺伝子が神経芽腫の生物学的特性とどのように関わっているのか解析を進める必要がある。

肝芽腫のゲノム異常パターンにも、神経芽腫と同様、silent 群が存在し、しかも予後良好であることが分かったことは、成人がんとは対照的な知見として大変興味深い。また、成人肝細胞がんのゲノム異常と異なる領域が明らかになったことは、肝細胞に由来するがんの制癌剤感受性を規定する遺伝子を同定するうえで大変重要であると思われる。

p53 および p73 は個体発生の過程でも重要な機能を果たしていることが近年報告されているが、その詳細は不明である。我々の解析から、p53 ファミリー遺伝子が異なる機能的役割分担を有していることが明らかになってきた。

また、低酸素応答遺伝子として同定された NEDL1 と PDLIM2 が共に HIF1 のターゲットであることがわかり、がん細胞の運動能や浸潤能を制

御する分子である可能性が高くなった。

E. 結論

ゲノム情報に基づいた神経芽腫、肝芽腫の解析が展開し、発がんやがんの進展に関わる重要遺伝子が大量に同定されつつある。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 ターゲット遺伝子の同定は、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

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(主任研究者：中川原 章)

(分担研究者：尾崎 俊文)

(分担研究者：竹永 啓三)

(分担研究者：古関 明彦)

1. Nakagawara A. Chapter 5. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg, pp41-53.
2. 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
3. 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
4. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* 228:5-11, 2005
5. 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* 24:3385-3396, 2005
6. 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.* 228:29-35, 2005
7. 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* 7:337-350, 2005
8. 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 beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* 280:16665-16675, 2005
9. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR. *J. Clin. Oncol.* 23: 5205-5210, 2005
10. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 167:213-222, 2005
11. 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.* 65:4587-4597, 2005
12. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of FBN2 correlates with progression of human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 50:43-49, 2005
13. Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 96:653-660, 2005
14. Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 96:729-737, 2005
15. Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene* 24:7156-7169, 2005
16. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogen* 25:917-928, 2006
17. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* 46:285-291, 2006
18. Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis.

19. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Moll. Cell. Biol.* 26:2758-2771, 2006
20. Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCC1*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* (in press)
21. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* (in press)
22. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* (in press)
23. 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.
24. 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.
25. Kozlova EN, 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.*, 15: 59-65, 2005.
26. Koshikawa N, Takenaga K. Hypoxia-regulated expression of attenuated diphtheria toxin A fused with hypoxia-inducible factor-1 α oxygen-dependent degradation domain preferentially induces apoptosis of hypoxic cells in solid tumor. *Cancer Res.*, 65: 11622-1630, 2005.
27. Takenaga K, Kozlova EN. Role of intracellular S100A4 for migration of rat astrocytes. *Glia.* 53: 313-321, 2006.
28. Fang Z, Forslund N, Takenaga K, Lukanidin E, Kozlova EN. Sensory neurite outgrowth on white matter astrocytes is influenced by intracellular and extracellular S100A4 protein. *J Neurosci Res.*, 2006, in press.
29. Fang Z, Duthoit N, Wicher G, Kallskog O, Ambartsumian N, Lukanidin E, Takenaga K, Kozlova EN. Intracellular calcium-binding protein S100A4 influences injury-induced migration of white matter astrocytes. *Acta Neuropathol (Berl.)*, 2006, in press.
30. Isono K, Mizutani-Koseki Y, Komori T, Schmidt-Zachmann M.S, Koseki H Mammalian Polycomb-mediated repression of *Hox* genes requires the essential spliceosomal protein sf3b1. *Gene Dev.* 19:536-41, 2005
31. Lin L , Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J.H, Simonds W, Nakagawara A, and 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* 24:3385-96, 2005
32. Shin T, Yoshimura K, Shin T, Crafton E.B. , Tsuchiya H, Housseau F, Koseki H, Schulick R. D., Chen L, and Pardoll D M. ¹ In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med.* 201:1531-41, 2005
33. Inoue K, Wakao H, Ogonuki N, Miki H, Seino K, Nambu-Wakao R, Noda S, Miyoshi H, Koseki H, Taniguchi M and Ogura A Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. *Curr Biol.* 15:1114-8, 2005
34. Baba T, Shimizu T, Suzuki Yi, Ogawara M, Isono KI, Koseki H, Kurosawa H, Shirasawa T Estrogen, insulin, and dietary signals cooperatively regulate longevity signals to enhance resistance to oxidative stress in mice. *J Biol Chem.* 280:16417-26, 2005
35. 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, Suda T. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance *Nat Med.* 11:400-8, 2005
36. Isono K, Fujimura Y, Shinga J, Yamaki M, O-Wang J, Takihara Y, Murahashi Y, Takada Y, Mizutani-Koseki Y, Koseki H. Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate Polycomb-repression of *Hox* genes. *Molecular and Cellular Biology* 25:6694-706, 2005
37. Masuda K, Ouchida R, Takeuchi A, Saito Takashi, Koseki H, Kawamura K, Tagawa M, Tokuhisa T, Azuma T, O-Wang J DNA polymerase {theta} contributes to the generation of C/G mutations during somatic hypermutation of Ig genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13986-91, 2005
38. Nakajima M, Ogawa M, Shimoda Y, Hiraoka S, Iida M, Koseki H, Shirasawa T, Furukawa K. Presenilin-1 controls the growth and differentiation of endothelial progenitor cells through its beta-catenin-binding region. *Cell Biol Int.* 30:239-243, 2006

39. Isono, K., Nemoto, K., Li, Y., Takada, Y., Suzuki, R., Katsuki, M., Nakagawara, A., and Koseki, H., Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Molecular and Cellular Biology* (in press)
40. Takano-Maruyama M, Hase K, Fukamachi H, Kato Y, Koseki H, Ohno H., Foxl1-deficient mice exhibit aberrant epithelial cell positioning due to dysregulated EphB/EphrinB expression in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. (in press)
41. Blewitt M.E., Vickaryous N K. , Paldi A., Koseki H, Whitelaw E, “Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice” *PLoS Genetics* (in press)
42. Lee T, Jenner R.G., Boyer L.A., Guenther M.G., Levine S.S., Kumar R.M., Chevalier B, Johnstone S.E, Cole M.F., Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray H.L., Zucker J.P., Yuan B., Bell G. W., Herbolsheimer E, Hannett N.M., Sun K, Odom D.T., Volkert T.L., Bartel D.P., Melton D.A., Gifford D.K., Jaenisch R, Young R.A., Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願中：2件

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、昨年度に引き続き、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行った。その結果、（1）243例の神経芽腫を対象としたアレイ CGH の解析から、神経芽腫の発がんに関する新しい作業仮説を導いた。（2）MYCN 増幅症例のうち、現在の治療により治癒する群と治癒しない群の間で異なって発現する遺伝子群を同定した。この中に、多くの神経発生に関連した遺伝子が含まれていた。（3）17q gain の候補遺伝子 OAN を同定し、その機能を明らかにした。（4）肝芽腫のアレイ CGH と発現プロファイルにより、予後の予測系が確立できた。（5）肝芽腫と成人肝細胞がんとで異なるゲノム異常領域を複数同定した。これらの違いは、制癌剤に対する反応性を反映しているものと思われた。

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。今年度は、昨年度に得られたゲノム情報をさらに深く解析し、具体的な候補遺伝子の同定まで行うことを目的とした。

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 を固定したものを用い、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

（1）神経芽腫のゲノムアレイ結果から導かれた発がんの新しい作業仮説

昨年度の解析結果から、神経芽腫には3つのゲノム異常様式 (silent, partial gains/losses, and whole chromosome gains/losses) があることが判明した。したがって、神経芽腫は大きく分けて、genomic instability (予後不良) によるものと mitotic dysfunction (予後良好) によるものとに分けられたが、我々は silent group に注目し、この群は予後良好、不良の両群にも存在し、しかもほとんどが diploidy であることを見いだした。そこで、この silent group に起こっている未知のゲノム異常が神経芽腫の first hit に相当し、真の抑制遺伝子である可能性が示唆された。

（2）MYCN 増幅と治療効果を選別する遺伝子群の同定

我が国を含め、現在国際的にも、MYCN 増幅腫瘍の中で約 30%が治癒する時代に入っている。しかし、その理由は全く不明であった。我々の in-house microarray を用いた解析結果から、その両群を有意に分ける遺伝子群を同定した。その中には、神経発生の過程で機能していることが明らかになっている重要な遺伝子が複数含まれていた。今後それらの機能解析を展開する予定である。

（3）17q gain の候補遺伝子 OAN の同定とその

機能

我々の神経芽腫ゲノムアレイおよび発現プロファイルの解析から、17q gain 領域にマップされ、partial gains/losses 群のみに高発現している遺伝子を探索したところ、新規遺伝子を同定し、OAN と命名した。OAN の過剰発現により神経芽腫細胞の増殖が促進され、siRNA による発現抑制によりその増殖が抑制された。したがって、OAN は 17q gain の候補遺伝子と思われた。

(4) 肝芽腫のゲノムおよび発現の網羅的解析とその臨床応用

肝芽腫 58 例のアレイ CGH 解析から、本腫瘍はゲノム異常様式から silent と aberrant 群に分けられ、前者の予後は極めて良く組織学的にも高分化型が多いこと、それに反して、後者は予後不良で低分化型であることが明らかとなった。また、後者はさらに発現プロファイルにより予後が有意に分けられることが明らかになった。

(5) 肝芽腫と肝細胞がんにおけるゲノム異常の違い

同一のアレイ CGH チップを用いた解析から、肝芽腫と肝細胞がんの間で明らかに異なるゲノム異常領域を多数同定した。なかでも、17p 欠失は後者で高頻度見られたのに対し、前者では全くなかった。

D. 考察

約 30 年前、がん抑制遺伝子の存在を初めて提唱した Knudson は、3 つの小児がん(網膜芽腫、Wilms 腫瘍、神経芽腫)を対象に報告したが、前 2 者ではそれぞれ Rb, Wt 遺伝子が同定されたにもかかわらず、神経芽腫の抑制遺伝子は未だ発見されていない。我々は、本研究において、silent genomic pattern を示す群の中にその異常を有するものが存在する可能性を提唱した。今後、その神経芽腫抑制遺伝子の同定に向けて研究を展開する。また、予後不良な神経芽腫において高頻度見られる 17q gain の候補遺伝子 OAN の同定は重要であり、今後これをターゲットとする治療法の開発が期待できる。さらに、MYCN が増幅した神経芽腫は、約 20 年前にはほぼ全例死亡していたが、現在では国際的にも約 30% が生存出来る時代になった。しかしながら、その理由は全く不明である。今回の我々の解析は、まず、上記の生存、死亡を有意に分ける遺伝子群を同定したことに重要な意味があり、さらに、それ

らの上位にランクされた遺伝子群には神経発生の過程で重要な機能を発揮していることが明らかになっている遺伝子が複数含まれていた。したがって、我々が当初目指した、個体発生と発がん、あるいは、発がんとがんの悪性度決定に関わる遺伝子群の同定に、早くも達してきたことになる。今後は、それらの遺伝子が神経芽腫の生物学的特性とどのように関わっているのか解析を進める必要がある。

肝芽腫のゲノム異常パターンにも、神経芽腫と同様、silent 群が存在し、しかも予後良好であることが分かったことは、成人がんと対照的な知見として大変興味深い。また、成人肝細胞がんのゲノム異常と異なる領域が明らかになったことは、肝細胞に由来するがんの制癌剤感受性を規定する遺伝子を同定するうえで大変重要であると思われる。

E. 結論

神経芽腫と肝芽腫のアレイ 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と遺伝子の同定に成功した。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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagawara A. Chapter 5. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg, pp41-53.
2. 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
3. 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
4. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* 228:5-11, 2005

5. 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* 24:3385-3396, 2005
6. 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.* 228:29-35, 2005
7. 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* 7:337-350, 2005
8. 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 beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* 280:16665-16675, 2005
9. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T. Prediction of *MYCN* amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR. *J. Clin. Oncol.* 23: 5205-5210, 2005
10. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 167:213-222, 2005
11. 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.* 65:4587-4597, 2005
12. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of *FBN2* correlates with progression of human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 50:43-49, 2005
13. Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 96:653-660, 2005
14. Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 96:729-737, 2005
15. Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. ubiquitination. *Oncogene* 24:7156-7169, 2005
16. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogen* 25:917-928, 2006
17. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* 46:285-291, 2006
18. Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* 580:627-632, 2006
19. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Moll. Cell. Biol.* 26:2758-2771, 2006
20. Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCC1*, a novel gene with the *BNIP2* and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* (in press)
21. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* (in press)
22. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of *RASGRF2* and *RASSF1A* in human non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* (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 DNA double-strand break を誘導する制癌剤に暴露されたがん細胞の運命決定（生と死）が、DNA 修復複合体の構成メンバーの一つである NFB1 と p53 との物理的ならびに機能的相互作用の有無によってなされることを明らかにした。また、DNA 損傷に反応して ATM が IKK- α の上流因子として機能し、p73 依存性のアポトーシスを促進することが判明した。さらに、細胞生存因子の一つである NF- κ B がその転写活性化能を介して、p73 のユビキチン依存性の蛋白質分解を促進することによって、p73 のアポトーシス誘導活性を阻害することを見出した。

A. 研究目的

制癌剤に暴露されたがん細胞が時間経過とともに制癌剤に対する耐性を獲得する現象は、制癌剤によるがん治療効果の著しい低下を招くことから、治療の現場において大きな問題になっており、その克服を可能とする仕組みの分子レベルでの解明および具体的な方法の確立が強く望まれている。本研究は、がん細胞の制癌剤感受性を規定する重要な蛋白質である p53 ファミリー（p53, p73, p63）の活性制御機構を解明するとともに、制癌剤耐性克服を可能にする手法の開発を目的とする。さらに、難治性神経芽腫がん幹細胞の同定およびその性質を規定すると考えられる遺伝子産物を探索し、発がん過程における p53 ファミリーとの機能的相互作用、あるいは p53 ファミリー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、免疫染色法および 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ト法および RT-PCR を用いて評価した。またアポトーシスの検出は、FACS 法、コロニー形成法および 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

ヒト肺癌由来の細胞株 A549 細胞は、アドリアマイシンに反応して最終的に p53 依存性のアポトーシスに陥る。アドリアマイシンに対する初期反応過程においては、DNA 修復複合体の構成メンバーの一つである NFB1 が損傷 DNA の修復に関与するとともに、その BRCT ドメインを介して p53 のアミノ末端領域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した。しかしながら、アドリアマイシンに対する後期反応過程においては、NFB1 の転写および蛋白質レベルでの発現低下が検出され、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 の活性化が検出された。また、シスプラチンに反応した ATM の活性化を介して核内 IKK- α がリン酸化され細胞核内に蓄積し、p73 との相互作用を通して p73 のアポトーシス誘導能が昂進した。一方、野生型の MEF では NF- κ B の活性化に伴って内在性の p73 の蛋白質レベルが顕著に減少したが、NF- κ B ノックアウトマウス由来の MEF では p73 の蛋白質レベルは一定であった。さらに、NF- κ B は p73 のユビキチン化を促進することによって、その半減期を短くする機能を持つことが明らかになった。興味深いことに、転写活性化能を欠いた NF- κ B の変異体は p73 の分解を誘導する機能を失ってい

た。

D. 考察

制癌剤処理に起因する DNA 損傷の初期応答過程においては、NFBD1 による p53 のリン酸化阻害を介したアポトーシス誘導活性の抑制が認められ、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。一方、DNA 損傷の後期応答過程においては、NFBD1 の発現レベルが抑制され p53 の活性が昂進することから、NFBD1 の発現調節機構の解析が急務である。また、ATM/IKK- α を介した p73 の特異的な活性化機構の解明は、変異型 p53 を持ちしかも抗癌剤耐性を示すがん細胞の制癌剤感受性の向上に貢献するものと期待される。さらに、多くの腫瘍組織において NF- κ B の活性が上昇しているとともに、制癌剤処理による DNA 損傷の初期応答過程においても、NF- κ B の一過性の活性昂進が報告されている。今回の我々の研究結果から、NF- κ B の標的遺伝子群の中に p73 のユビキチン依存性の蛋白質分解を触媒する未知の E3 ubiquitin ligase をコードする遺伝子が含まれていると考えられる。

E. 結論

NFBD1 による p53 のリン酸化阻害を介した p53 の抑制機構は、制癌剤に対する初期応答過程におけるがん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。また、ATM/IKK- α を介した p73 の特異的な活性化機構および NF- κ B による p73 の選択的な分解機構は新たな p73 の活性制御システムである。特に p73 の分解を触媒する E3 ubiquitin ligase の同定は、変異型 p53 を持ちしかも抗癌剤耐性を示すがん細胞に p73 依存性の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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Niizuma,H., Nakamura,Y., Ozaki,T., Ohira,M., Isogai,E., Kageyama,H., Imaizumi,M., Nakagawara,A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* (in press).

- 2) Ozaki,T., Nakagawara, A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.*, 96: 729-737, 2005.
- 3) Hosoda,M., Ozaki,T., Miyazaki,K., Hayashi,S., Furuya,K., Watanabe,K., Nakagawa,T., Hanamoto,T., Todo,S., Nakagawara,A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene*, 24: 7156-7169, 2005.
- 4) 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.*, 228: 29-35, 2005.
- 5) 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.*, 65: 4587-4597, 2005.
- 6) 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.*, 280: 16665-16675, 2005.
- 7) 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*, 24: 3385-3396, 2005.
- 8) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

申請中 1件

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

発がんのが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所化学療法研究部 主席研究員

研究要旨 昨年度見出した新規低酸素応答 *NEDL1* 遺伝子が hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) の標的遺伝子であるのかどうかの検討と、dishevelled-1 (Dvl-1) による神経芽細胞腫の分化の促進に *NEDL1* が及ぼす影響についての検討を行った。さらに、*PDLIM2* 遺伝子の低酸素応答機序及び細胞接着、細胞運動、浸潤能における役割を解析した。その結果、*NEDL1* 遺伝子の転写開始点の近傍に機能的な HIF-1 結合配列が存在すること、*NEDL1* の強制発現は Dvl-1 によるマウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞の神経突起形成の促進を阻害することを見出した。また、*PDLIM2* 遺伝子の発現が HIF-1 の制御下にあること、高浸潤性乳癌細胞では *PDLIM2* 遺伝子が高発現しており、siRNA を用いて *PDLIM2* 遺伝子の発現を抑制すると運動能、浸潤能が顕著に抑制されることを見出した。これらの結果より、低酸素による *NEDL1* 発現亢進は Dvl-1 による神経芽細胞腫の分化促進を抑制すること、*PDLIM2* はがん細胞の運動能、浸潤能と密接に関連することが示唆された。

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がある。

昨年度我々は、低酸素ががん細胞に及ぼす作用を分子レベルで解明することを目的とし、神経芽細胞腫と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、新規低酸素応答遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、HECT 型ユビキチンリガーゼ *NEDL1* 遺伝子及び細胞接着班蛋白質 *PDLIM2* 遺伝子を含む数種類の新規低酸素応答遺伝子を見出した。

これまでの研究で、*NEDL1* 遺伝子のプロモーター領域中に転写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) の結合部位 (HRE, hypoxia-response element) が存在することが示唆されているが、その同定には至っていない。一方、*NEDL1* は Wnt シグナル伝達系の鍵分子である Dishevelled-1 (Dvl-1) を基質としユビキチン化するが、その生物学的意義は不明である。そこで、*NEDL1* 遺伝子の HRE の同定及び Dvl-1 による神経芽細胞腫の分化の促進における *NEDL1* の役割について検討した。

一方、*PDLIM2* 遺伝子は細胞接着班に存在する蛋

白質をコードするが、低酸素による発現促進の生

物学的意義、細胞接着、細胞運動や浸潤における役割については不明である。そこで、本年度はこれらの点について解析した。

B. 研究方法

細胞は、ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-BE(2)C、マウス神経芽腫細胞株 Neuro2A、ヒト低浸潤性乳癌細胞株 MCF-7、ヒト高浸潤性乳癌細胞株 MDA-MB-231 及び BT549、ヒト肺癌細胞株 A549、ヒト肝癌細胞株 HepG2 を用いた。*NEDL1* 及び *PDLIM2* 遺伝子プロモーター領域中の HRE の解析は、各種欠失変異及び点突然変異を導入したプロモーターを作製し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて行った。Dvl-1 による Neuro2A 細胞の神経突起形成促進は、*Dvl-1* cDNA を pIRES2-EGFP ベクターに組み込み、これを細胞に遺伝子導入した後、分化誘導用培地中で培養し、3日後に EGFP 陽性細胞の中で神経突起を形成している細胞の割合を計測することで評価した。*PDLIM2* の細胞内局在は、pIRES2-EGFP ベクターに *PDLIM2* cDNA を組み込んだプラスミドを遺伝子導入することにより調べた。細胞進展は、フィブロネクチン、ラミニン、タイプ IV コラーゲン、マトリゲルをコートしたプレート上に細胞を播き、45分後に固定し、進展した細胞の割合を計測した。細胞運動能及び浸潤能はトランスウェルチャンバー及びマトリゲルでコートしたトランスウェルチャンバーを用いて測定した。ケモアトラクタントとして 10%牛胎児血清を

使用した。PDLIM2 siRNA 及び control siRNA の細胞内導入は Lipofectamine 2000 を用いて行った。

C. 研究結果

SK-N-BE(2)C 細胞における *NEDL1* 遺伝子の発現は、constitutive active HIF-1 α の発現ベクター導入によって増加した。*NEDL1* 遺伝子プロモーター領域 (約 4kb) を有するルシフェラーゼレポーターベクターを用いたアッセイにより、低酸素あるいは constitutive active HIF-1 α の発現ベクターの共導入によってルシフェラーゼ活性が増加することが判った。また、この活性増加は dominant negative HIF-1 α 発現ベクターの共導入によって抑制された。*NEDL1* 遺伝子プロモーター領域の欠失変異体を用いて HRE 部位を検討したところ、転写開始点から上流約 700bp 中に存在することが示された。この領域中に存在する 3 つの HRE 候補に変異を導入した結果、-96 から -91 に存在する CGCGTG が *NEDL1* 遺伝子の HRE と同定された。一方、Neuro2A 細胞に Dvl-1 を強制発現させたところ神経突起形成が促進されたが、*NEDL1* との共発現により阻害された。また、細胞内で *NEDL1* が Dvl-1 を分解することが示された。

SK-N-BE(2)C 細胞、MCF7 細胞、MDA-MB-231 細胞、A549 細胞及び HepG2 細胞での *PDLIM2* 遺伝子発現を検討したところ、すべての細胞で発現されていることが判った。これらの細胞を 1% 酸素濃度下で培養すると、いずれの細胞株においても培養時間に依存した *PDLIM2* 遺伝子の発現亢進が認められた。また、低酸素模倣薬剤である desferri-oxamine 処理や constitutive active HIF-1 α 遺伝子の導入によっても発現が亢進した。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、*PDLIM2* 遺伝子プロモーター領域 (約 1.9kb) が constitutive active HIF-1 α に反応することが確認された。*PDLIM2* の細胞内局在を確認するために、MCF7 及び MDA-MB-231 細胞で EGFP-*PDLIM2* 融合蛋白質を発現させたところ、MCF7 細胞では細胞接着班及び lamellipodia への集積が、MDA-MB-231 細胞では lamellipodia への集積が観察された。一方、MDA-MB-231 細胞では、MCF7 細胞と比較して、*PDLIM2* 遺伝子が高発現していることが判った。MDA-MB-231 細胞を低酸素下で培養するとマトリゲルを用いた浸潤能アッセイ系において浸潤能が亢進したが、*PDLIM2* 遺伝子発現を siRNA で抑制すると浸潤能が顕著に抑制された。また、運動能も顕著に抑制されることが判明した。しかし、各種細胞外マトリックス蛋白質上での細胞伸展は影響を受けなかった。

D. 考察

NEDL1 遺伝子プロモーター中の転写開始点近傍に機能的な HRE が存在することがレポーターアッセイにより示された。今後、この HRE に HIF-1 が結合するかどうかをゲルシフトアッセイ及びクロマチン免疫沈降法により確認することが必要である。一方、*NEDL1* の発現が Dvl-1 による Neuro2A 細胞の神経突

起形成の促進を阻害することが明らかになった。*NEDL1* が Dvl-1 をユビキチン化することが以前に報告されているが、Dvl-1 が分解されるかどうかは不明であった。そこで、Neuro2A 細胞で *NEDL1* と Dvl-1 を共発現させ Dvl-1 の分解を検討したところ、*NEDL1* の発現量が増加するに従って Dvl-1 の分解が促進されることが判明した。これらの結果より、*NEDL1* が Dvl-1 を分解することで、神経突起形成の促進を阻害することが示唆された。

PDLIM2 遺伝子は調べた細胞株いずれにおいても発現しており、ユビキチンな蛋白質であることが明らかになった。また、いずれの細胞株でも低酸素処理により発現が亢進することから共通の発現制御機序があることが示唆された。事実、レポーターアッセイにおいて *PDLIM2* 遺伝子プロモーターが constitutive active HIF-1 α に反応した。このことは、*PDLIM2* 遺伝子の発現が HIF-1 により制御されることを示唆する。一方、*PDLIM2* が細胞接着班蛋白質であることより細胞接着や細胞運動さらには浸潤・転移能に関連する可能性が考えられた。そこで、MDA-MB-231 細胞における *PDLIM2* 発現を siRNA で抑制した際のこれらの性状を調べた。その結果、マトリックス蛋白質上での細胞伸展は影響を受けなかったが、細胞運動が顕著に抑制されることが判明した。MDA-MB-231 細胞で *PDLIM2* は lamellipodia に集積していることからこの結果は支持されると考えられる。興味深いことに、浸潤能の高い乳癌細胞株では *PDLIM2* が多く発現しており、さらに *PDLIM2* の発現を抑制すると浸潤能が顕著に阻害されることが明らかになった。*PDLIM2* の発現抑制が MDA-MB-231 細胞の接着性に影響を与えないことより、浸潤能の抑制は主に運動能の抑制の結果であると推察される。今後、*PDLIM2* が細胞運動においてどのような役割を演じているのか、lamellipodia の形成に重要な Rac1 などの small GTPase と相互作用しているのかなどを検討する必要がある。

E. 結論

NEDL1 遺伝子が HIF-1 の標的遺伝子であることが判明した。また、*NEDL1* が Dvl-1 による神経芽細胞腫の分化促進を抑制することが示唆された。さらに、*PDLIM2* 遺伝子は HIF-1 の下流遺伝子であり、がん細胞の運動・浸潤能と密接に関連することが示唆された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 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.
2. 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.

3. Kozlova EN, 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.*, 15: 59-65, 2005.
4. Koshikawa N, Takenaga K. Hypoxia-regulated expression of attenuated diphtheria toxin A fused with hypoxia-inducible factor-1 α oxygen-dependent degradation domain preferentially induces apoptosis of hypoxic cells in solid tumor. *Cancer Res.*, 65: 11622-1630, 2005.
5. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene.* 25: 917-28, 2006.
6. Takenaga K, Kozlova EN. Role of intracellular S100A4 for migration of rat astrocytes. *Glia.* 53: 313-321, 2006.
7. Fang Z, Forslund N, Takenaga K, Lukanidin E, Kozlova EN. Sensory neurite outgrowth on white matter astrocytes is influenced by intracellular and extracellular S100A4 protein. *J Neurosci Res.*, 2006, in press.
8. Fang Z, Duthoit N, Wicher G, Kallskog O, Ambartsumian N, Lukanidin E, Takenaga K, Kozlova EN. Intracellular calcium-binding protein S100A4 influences injury-induced migration of white matter astrocytes. *Acta Neuropathol (Berl)*., 2006, in press.

F. 知的財産権の出願・登録状況
出願中 1件

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

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

分担研究者 古関 明彦 独立行政法人理化学研究所 免疫器官形成研究グループ グループディレクター

研究要旨 ほ乳類ポリコム群は、Ink4a/p53 経路に対して抑制的に機能することが遺伝学的に示されている。この抑制は、ポリコム群複合体の Ink4a 遺伝子座への直接結合を介しており、ポリコム群タンパクの結合は同じく転写抑制因子である E2F3b の Ink4a 遺伝子座への結合を安定化させることを明らかにした。一方、ポリコム複合体に結合するタンパクである Pcl2 は、Ink4a を脱抑制させる機能を有することが示され、この機能はポリコム群タンパクの発現を低下させることによることを実験的に示した。このことは、継代に依存したポリコム群複合体の Ink4a 遺伝子座への結合低下は Pcl2 を介している可能性を示唆している。

A. 研究目的

ほ乳類ポリコム群は、Ink4a/p53 経路に対して抑制的に機能することが遺伝学的に示されている。さらに、この経路は一部の白血病では腫瘍幹細胞において重要な機能を果たすことも示唆されている。本研究では、ポリコム群タンパクの機能発現メカニズムを明らかにするために、ポリコム群結合タンパク群の Ink4a 遺伝子座への結合と結合による作用を解析する。また、ポリコム群の Ink4a 遺伝子座への結合がどのように制御されているのかを解析する。

B. 研究方法

本年度の業務目標に従い、以下に示すような目的をもって委託業務にあたった。①クロマチン免疫沈降法を用いて、ポリコム群複合体の Ink4a 遺伝子座への結合パターンを明らかにし、胎児性繊維芽細胞（MEF）の継代あるいはポリコム群変異により、結合がどのように修飾されるかを解析する。②マウス・ポリコム群である Pcl2 を欠損したマウスを用いて、Pcl2 によるポリコム群を介した Ink4a 遺伝子座の転写制御メカニズムを明らかにする。

C. 研究結果

① ポリコム群タンパクの Ink4a 遺伝子座への結合

ポリコム群タンパクである Rnf2、Mel18 と Phc2

の Ink4a 遺伝子座への結合様式を胎児性繊維芽細胞（MEF）を用いたクロマチン免疫沈降により明らかにした。ポリコム群タンパクの結合は継代を経るにしたがい減少し、その減少は Mel18 あるいは Phc2 欠損マウスではより早くなることが明らかになった。すなわち、ポリコム群の結合と MEF 細胞における細胞老化の程度はよく相関していることが示された。このことから、ポリコム群の結合が直接的に転写抑制に寄与している可能性が示された。同様に Ink4a 遺伝子座の転写抑制に寄与すると考えられている E2F3b の結合パターンの解析を行った。E2F3b の結合も、ポリコム群同様に MEF が継代を経るにしたがい減少し、その減少は Mel18 あるいは Phc2 欠損マウスではより早くなることが明らかになった。さらに、E2F3b はポリコム群タンパクに直接結合しうることが示された。すなわち、E2F3b とポリコム群タンパクの複合体が、Ink4a 遺伝子座上に構成され、その結合は継代によるシグナルによって制御されていることが示された。

② ポリコム群複合体の Ink4a 遺伝子座への結合の制御メカニズム

ポリコム群タンパクである Mel18 に結合するタンパクとして、ショウジョウバエ・ポリコムライクホモログ Pcl2 を同定した。このタンパクは、TUDOR ドメインとふたつの PHD フィンガーを有している。Pcl2 欠損マウスでは、ホメオ

ティック変異が見られ、それは Me118 あるいは Phc2 変異によって増強された。さらには、Pcl2 と Phc2 とは免疫共沈されたことから、サブストイキオメトリックであるにせよ Pcl2 はポリコム群複合体の機能的な構成成分であり、Hox 遺伝子座ではポリコム群複合体の機能を正に制御していることが示された。一方、Pcl2 を欠損した MEF では、他のポリコム群を欠損した MEF とは逆に、10 回程度継代したところで老化がキャンセルされ不死化することが示された。30 回以上の継代あるいは RASV12 の過剰発現により、容易にトランスフォームしたことからがん抑制遺伝子座であると考えられる。実際、Pcl2 を欠損した MEF では継代にかかわらず Ink4a の発現は安定に抑制されていた。

Pcl2/Phc2 二重欠損 MEF では、Pcl2 欠損 MEF で観察された不死化はキャンセルされ、Phc2 欠損 MEF 同様の細胞老化の亢進が観察されたことから、Pcl2 はポリコム群複合体を介して細胞老化を制御していることが明らかになった。この二重欠損 MEF の継代を続けると 20 回程度継代したところで、突然不死化し、それは Ink4a 遺伝子座の欠失によっておこることが示された。以上の結果は、Pcl2 は MEF においてはポリコム群タンパクに対して拮抗的に作用することを示唆している。Pcl2 欠損 MEF におけるポリコム群タンパクの発現を調べた結果、継代にしたがってポリコム群タンパクの発現が増強してくることが示された。すなわち、Pcl2 は、ポリコム群複合体の発現量をリミットする機能があることが示された。

D. 考察

ポリコム群複合体は、MEF において Ink4a 遺伝子座へ直接結合することにより、Ink4a 遺伝子座の転写抑制に寄与することが示された。同じく Ink4a 遺伝子座の転写抑制に寄与する分子である E2F3b の Ink4a 遺伝子座への結合は、E2F サイトだけではなくポリコム群複合体との直接的な結合を介しておこると考えられた。一方、ポリコム複合体に結合するタンパクである Pcl2 は、Ink4a を脱抑制させる機能を有することが示され、この機能はポリコム群タンパクの発現を低下させることによることを実験的に示した。このことは、継代に依存したポリコム群複合体の Ink4a 遺伝子座への結合低下は Pcl2 を介している可能性を示唆している。

E. 結論

ポリコム群複合体による Ink4a 遺伝子座の発現制御メカニズムの一部を解明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

- Isono K, Mizutani-Koseki Y, Komori T, Schmidt-Zachmann M.S, Koseki H Mammalian Polycomb-mediated repression of *Hox* genes requires the essential spliceosomal protein sf3b1 **Gene Dev.** 19(5):536-41 (2005)
- Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J.H, Simonds W, Nakagawara A, and 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.** 12;24(21):3385-96 (2005)
- Shin T, Yoshimura K, Shin T, Crafton E.B., Tsuchiya H, Housseau F, Koseki H, Schulick R. D., Chen L, and Pardoll D M. ¹ In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses **J Exp Med.** 201(10):1531-41(2005)
- Inoue K, Wakao H, Ogonuki N, Miki H, Seino K, Nambu-Wakao R, Noda S, Miyoshi H, Koseki H, Taniguchi M and Ogura A Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. **Curr Biol.** 15(12):1114-8 (2005)
- Baba T, Shimizu T, Suzuki YI, Ogawara M, Isono KI, Koseki H, Kurosawa H, Shirasawa T Estrogen, insulin, and dietary signals cooperatively regulate longevity signals to enhance resistance to oxidative stress in mice. **J Biol Chem.** 280(16):16417-26. (2005)
- 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, Suda T. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance **Nat Med.** 11(4):400-8 (2005)
- Isono K, Fujimura Y, Shinga J, Yamaki M, O-Wang J, Takihara Y, Murahashi Y, Takada Y, Mizutani-Koseki Y, Koseki H. Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate Polycomb-repression of *Hox* genes **Molecular and Cellular Biology.** Aug;25(15):6694-706 (2005)
- Masuda K, Ouchida R, Takeuchi A, Saito Takashi, Koseki H, Kawamura K, Tagawa M, Tokuhisa T, Azuma T, O-Wang JDNA polymerase {theta} contributes to the generation of C/G mutations during somatic hypermutation of Ig genes. **Proc Natl Acad Sci**

U S A. 102(39):13986-91. (2005)

9. Nakajima M, Ogawa M, Shimoda Y, Hiraoka S, Iida M, Koseki H, Shirasawa T, Furukawa K. Presenilin-1 controls the growth and differentiation of endothelial progenitor cells through its beta-catenin-binding region. **Cell Biol Int.** 30(3) 239-243(2006)
10. Isono, K., Nemoto, K., Li,Y., Takada, Y., Suzuki, R., Katsuki, M., Nakagawara, A., and Koseki H., Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals **Molecular and Cellular Biology** (2006 in press)
11. Takano-Maruyama M, Hase K, Fukamachi H, Kato Y, Koseki H, Ohno H.; Foxl1-deficient mice exhibit aberrant epithelial cell positioning due to dysregulated EphB/EphrinB expression in the small intestine **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** (2006 in press)
12. Blewitt M.E., Vickaryous N K. , Paldi A., Koseki H, Whitelaw E, “Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice” **PLoS Genetics** (2006 in press)
13. Lee T, Jenner R.G., Boyer L.A., Guenther M.G., Levine S.S., Kumar R.M., Chevalier B, Johnstone S.E, Cole M.F., Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray H.L., Zucker J.P., Yuan B., Bell G. W., Herbolsheimer E, Hannett N.M., Sun K, Odom D.T., Volkert T.L., Bartel D.P., Melton D.A., Gifford D.K., Jaenisch R, Young R.A., Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells **Cell** (2006 in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者：中川原 章

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Nakagawara A.</u>	Molecular and developmental biology of neuroblastoma.	N.K.Cheung & S. Cohn,	Neuroblastoma	Springer-Verlag	Heidelberg	2005	41-53

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, <u>Nakagawara A.</u>	Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells.	Oncogene	24(5)	938-944	2005
Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, <u>Nakagawara A.</u> , Ushijima T.	CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas.	Cancer Res.	65(3)	828-834	2005
Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, <u>Nakagawara A.</u>	A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas.	Cancer Lett.	228(1-2)	5-11	2005
Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, <u>Nakagawara A.</u> , 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	24(21)	3385-3396	2005
Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, <u>Nakagawara A.</u>	Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death.	Cancer Lett.	228(1-2)	29-35	2005
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, <u>Nakagawara A.</u>	Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas.	Cancer Cell	7(4)	337-350	2005

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 beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function.	J. Biol. Chem.	280(17)	16665-16675	2005
Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T.	Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction.	J. Clin. Oncol.	23(22)	5205-10	2005
Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R.	Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma.	Am. J. Pathol.	167(1)	213-222	2005
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.	65(1)	4587-4597	2005
Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H.	Aberrant methylation of FBN2 in human non-small cell lung cancer.	Lung Cancer	50(1)	43-49	2005
Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y.	Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma.	Cancer Sci.	96(10)	653-660	2005
Ozaki T, Nakagawara A.	p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world.	Cancer Sci.	96(11)	729-737	2005
Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A.	UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination.	Oncogene	24(48)	7156-7169	2005
Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K.	Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors.	Oncogene	25(6)	917-928	2006
Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A.	Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan.	Pediatr. Blood Cancer	46(3)	285-291	2006
Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A.	High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis.	FEBS Lett.	580(2)	627-632	2006