

発がんおよびがん幹細胞に特異的な遺伝子の機能解析
研究分担者 尾崎俊文 千葉県がんセンター研究所生化学研究部 主席研究員

研究要旨 細胞周期の調節因子の一つである Plk1 は、p73 のアミノ末端近傍に結合し、27番目のスレオニンをリン酸化することによって、p73 の共役因子である p300 の p73 からの解離を促進することで、p73 の細胞死誘導活性を抑制する。Plk1 は同様に p53 の活性を阻害することから、Plk1 はがん治療における分子標的因子の候補の一つとして考えられた。さらに、グルコース飢餓による細胞死は p53 依存性であるが、興味深いことに p53 の誘導は転写のレベルで起こっていることが判明した。その転写レベルでの p53 の発現誘導に関与しているのが AMPK であった。一般的に、ストレスに応答した p53 の発現誘導は翻訳後の化学修飾（リン酸化、アセチル化）による蛋白質の安定化によるものであるとされているが、我々のデータによれば、必ずしも翻訳後修飾によるわけではなく、転写のレベルで p53 の発現誘導が実行されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

がん細胞が持つ制癌剤に対する感受性の経時的な減少は、制癌剤によるがん治療効果を著しく阻害することから、制癌剤耐性を克服するための具体的な手法の開発が望まれている。本研究は、制癌剤に応答したがん細胞死を誘導する因子の一つであるがん抑制遺伝子 p53 ファミリーに着目し、その発現制御機構ならびに細胞死誘導活性の調節機構を明らかにし、制癌剤耐性獲得という現象が生まれる原因を究明するとともに、制癌剤耐性を克服するための基礎的なきっかけを見出すことを目的とする。

B. 研究方法

モデル細胞株として H1299, HeLa, および U2OS 細胞を用いた。シスプラチン処理による細胞死は MTT アッセイ及びフローサイトメトリー法によって検討した。p53 ファミリーに属する遺伝子群 (p53, p73) およびその標的遺伝子群の発現レベルは RT-PCR、ウェスタンブロット法あるいは免疫沈降法で調べた。また、p73 の標的遺伝子群のプロモーター活性および p53 遺伝子群のプロモーター活性は、ルシフェラーゼレポーター法で検討した。さらに、目的とする遺伝子産物の細胞内における分布は、間接免疫染色法で検討した。

C. 研究結果

野生型の p53 を持たない H1299 細胞において、Plk1 の発現を siRNA によってノックダウンすると、p73 の蓄積に伴って細胞死が誘導された。この実験結果は Plk1 が p73 の活性を阻害する可能性を示唆していた。実際にルシフェラーゼレポーターアッセイと RT-PCR 法を用いて検討した結果、Plk1 は p73

の転写因子としての活性を顕著に阻害することが判明した。また、免疫沈降法およびプルダウンアッセイの結果、Plk1 は細胞核内で p73 のアミノ末端領域に結合することが判明した。さらに、精製した Plk1 を用いたキナーゼアッセイの結果、Plk1 は p73 の 27番目のスレオニンをリン酸化することが明らかにされた。

一方で、グルコース飢餓の条件において野生型 p53 を持つ U2OS 細胞は p53 依存性の細胞死に陥るが、p53 の発現誘導は蛋白質レベルでの安定化によりものではなく、転写のレベルで起こっていることが明らかにされた。その転写の活性化に関しては AMPK が深く関与していることが示唆された。AMPK そのものは DNA 結合能や転写活性化能を持たないことから、未知の転写因子と AMPK との相互作用がグルコース飢餓に応答した p53 の転写レベルでの活性化に関与しているものと考えられた。

D. 考察

DNA 損傷ストレスを含む様々なストレスに応答した細胞の運命決定を実行する重要な因子の一つは、がん抑制遺伝子群である p53 ファミリーである。本研究において、我々は Plk1 が p73 のアミノ末端をリン酸化することを介して制癌剤に応答したがん細胞死を阻害することを明らかにした。我々は既に Plk1 が p53 の活性をも阻害することを見出していることから、p53 の status に関わらず Plk1 が制癌剤に応答したがん細胞死を抑制する機能を持つことが考えられる。従って、Plk1 の効率的な阻害は制癌剤に対する感受性を増加させる手段の一つになり得るものと期待される。さらに、栄養飢餓の条件における細胞死は p53 依存性であるが、p53 の発

現誘導は蛋白質の安定化に起因するものではなく、転写のレベルで実行されていることが判明した。この解析は、p53 遺伝子の転写を調節する転写因子の同定に直結するものであり、特に変異型 p53 の発現抑制を可能とするストラテジーの発見につながるものと思われる。

E. 結論

細胞周期の調節因子の一つである Plk1 がリン酸化を介して p73 の活性を阻害することが判明した。また、栄養飢餓に応答した細胞死誘導過程において、p53 の発現誘導は転写レベルで調節されていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene*, 2008, **27**: 409-420.
2. Yoshida K, Ozaki T, Furuya K, Nakanishi M, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Omura K, Nakagawara A. ATM-dependent nuclear accumulation of IKK- α plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene*, 2008, **27**: 1183-1188.
3. Bu Y, Suenaga Y, Ono, Koda T, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. Spl-mediated transcriptional regulation of *NFBD1/MDC1* plays a critical role in DNA damage response pathway *Genes Cells*, 2008, **13**: 55-66.
4. Arai H, Ozaki T, Niizuma H, Nakamura Y, Ohira M, Takano K, Matsumoto M, Nakagawara A. ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma and induced in response to retinoic acid. *Oncology Rep.*, 2008, **19**: 1381-1388.
5. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kamiyo T, Nakagawara A, Kizaki K. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**: 3979-3987.
6. Li Y, Ozaki T, Kikuchi H, Yamamoto H, Ohira M, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin protein ligase NEDL1 enhances the p53-mediated apoptotic cell death in its catalytic activity-independent manner. *Oncogene*, 2008, **27**: 3700-3709.
7. Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, Okoshi R, Kamiyo T, Omura K, Nakagawara A. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**: 8555-8563.
8. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. Δ Np63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, **369**: 994-1000.
9. Wang H, Ozaki T, Hossain MS, Nakamura Y, Kamiyo T, Xue X, Nakagawara A. A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, **370**: 594-598.
10. Inoue K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Todo S, Nakagawara A, Ozaki T. NFBD1/MDC1 stabilizes oncogenic MDM2 to contribute to cell fate determination in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, **371**: 829-833.
11. Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawara A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamiyo T, Murakami Y, Nakagawara A. Expression of *TSLCI*, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is down-regulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int. J. Cancer*, 2008, **123**: 2087-2094.
12. Hossain MS, Ozaki T, Wang H, Nakagawara A, Takenobu H, Ohira M, Kamiyo T, Nakagawara A. N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma. *Oncogene*, 2008, **27**: 6075-6082.

13. Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, Ozaki T, Nakagawara A. KIF1B functions as a haploidinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 24426-24434.
14. Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y. Ozaki T, Isogai E, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, Nakagawara A. High expression of *ncRAN*, a novel non-coding RNA mapped to chromosoma 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Int. J. Oncol.*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

発がんとうんの転移を制御する遺伝子の解析

研究分担者 竹永啓三 島根大学医学部生命科学講座腫瘍生物学 准教授

研究要旨 マウスおよびヒトの培養細胞系でミトコンドリア DNA (mtDNA) の呼吸鎖複合体 I 活性の低下の原因となる病理性変異ががん細胞の転移能の制御に関わっているという昨年度の知見を基に、肺がん患者の原発巣 25 例、転移巣 35 例及び大腸がん患者の原発巣 13 例、転移巣 9 例における mtDNA 変異を、複合体 I のサブユニットをコードする NADH dehydrogenase subunit 1 (*ND1*)、*ND3*、*ND4L*、*ND6*、複合体 IV のサブユニットをコードする cytochrome c oxidase subunit II (*COII*) 遺伝子、及び複合体 V のサブユニットをコードする ATP synthase 6 (*ATP6*) 遺伝子について調べた。その結果、症例数が少ないために有意差は出ないが、肺がんと大腸がんの転移巣における *ND1* と *ND6* 遺伝子のミスセンス変異の頻度が、原発巣のそれと比べて 2~4 倍高い傾向を示すことが判った。他の 4 遺伝子のミスセンス変異の頻度には差が認められなかった。一方、ヒト肺がん細胞株 A549 を低酸素に曝露すると、幹細胞マーカー遺伝子と言われている *CD133* 遺伝子の転写が亢進することを以前に見出したが、*CD133* 遺伝子の転写調節領域を用いたレポーターアッセイの結果から、この領域中に低酸素応答エレメントが存在することが判った。さらに、この領域が hypoxia-inducible factor (HIF)-1 よりも HIF-2 に顕著に反応することが明らかになった。

A. 研究目的

(1) マウス肺腫瘍及びマウス繊維肉腫由来の低転移性および高転移性細胞株間でミトコンドリア DNA (mtDNA) を完全に交換したサイブリッド細胞を用いた先行研究により（筑波大学・林純一教授及び千葉県がんセンター研究局・越川信子氏との共同研究）、NADH dehydrogenase subunit 6 (*ND6*) 遺伝子中の病理性ミスセンス変異が呼吸鎖 complex I の活性の低下と活性酸素種 (ROS) の高産生を惹起し、これが原因で抗アポトーシス活性を示す Mcl-1 と hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の高発現をもたらす、転移能を亢進させることを明らかにした。そこで、ヒトがんの転移巣においても complex I 活性の低下を惹起する可能性がある mtDNA 変異があるのかどうかを検討することを目的とした。

(2) 先行研究において、ヒト肺がん細胞株 A549 を低酸素に曝露すると、がん幹細胞マーカー遺伝子と言われている *CD133* 遺伝子の転写が亢進することを見出したが、*CD133* 遺伝子が HIF (HIF-1 あるいは HIF-2) の標的遺伝子であるかどうかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ヒト肺がんの原発巣 25 例及び脳転移巣 35 例、並びにヒト大腸がんの原発巣 13 例及び転移巣 9 例（肝転移巣 7 例、肺転移巣 1 例、脳転移巣 1 例）の試料から抽出した DNA を用いて、mtDNA 遺伝子

の変異解析を行った。呼吸鎖複合体 I のサブユニット NADH dehydrogenase subunit 1 をコードする *ND1*、subunit 3 をコードする *ND3*、subunit 4L をコードする *ND4L* 及び subunit 6 をコードする *ND6*、複合体 IV のサブユニット cytochrome c oxidase subunit II をコードする *COII*、及び複合体 V のサブユニット ATP synthase 6 をコードする *ATP6* を解析対象遺伝子とした。塩基配列の決定はダイレクトシーケンシングで行った。

(倫理面への配慮)

ヒト腫瘍におけるミトコンドリア DNA の変異解析は、千葉県がんセンター倫理審査委員会の承認後に、インフォームドコンセントの得られた患者の手術材料を用いて行なった。

(2) *CD133* 遺伝子の転写調節領域（転写開始点から約 2.2 kb 上流域）をルシフェラーゼレポータープラスミド pGL3-basic に挿入した。これを、恒常的活性型 HIF-1 α あるいは HIF-2 α 発現ベクターと共に HeLa 細胞に導入した後、ルシフェラーゼ活性を測定し、プロモーター活性を調べた。

C. 研究結果

(1) 肺がんと大腸がんのいずれにおいても、転移巣において、*ND1* と *ND6* 遺伝子のミスセンス変異の頻度が 2~4 倍高い傾向を示すことが判った。しかし、症例数がまだ少ないために有意差が出るまでには至らなかった。*ND3*、*ND4L*、*COII* 及び *ATP6*

遺伝子のミスセンス変異の頻度には差が認められなかった。*ND1* と *ND6* 遺伝子に見出されたミスセンス変異をヒトミトコンドリアゲノムデータベース (MITOMAP 及び mtSNP) で検索したところ、未報告の変異やミトコンドリア病と関連する可能性が報告されている変異も含まれていることが判った。

(2) *CD133* 遺伝子の転写調節領域を組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子を HIF-2 α 発現ベクターと共に HeLa 細胞に導入すると、対照と比較して、3~4 倍のルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。しかし、恒常的活性型 HIF-1 α を共導入しても顕著な活性の上昇は認められなかった。用いた転写調節領域中には hypoxia-response element (HRE) 候補配列が 3カ所存在することがコンピューター解析から判ったので、それぞれに変異を導入し、HIF-2 α に対する反応性を調べた。その結果、程度の差はあるが、すべての HRE が HIF-2 α に対する反応性を示すことが明らかになった。そこで、ピオチン化オリゴヌクレオチド沈降法により、HIF-2 がこれらの HRE 配列に結合するかどうかを検討したところ、少なくとも一カ所には結合することが示唆された。

D. 考察

(1) 複合体 I のサブユニットをコードする *ND1* 及び *ND6* 遺伝子のミスセンス変異の頻度が、原発巣よりも転移巣において高い傾向にあることが示された。調べた他の 4 つの遺伝子のミスセンス変異の頻度に差が認められないことから、*ND1* と *ND6* 遺伝子の変異頻度が高くであることには何らかし生物学的意味があると推察される。現在のところ見出された変異が病因性であるという明確な証拠はないが、ミトコンドリアゲノムデータベースに登録されていない変異や、ミトコンドリア病に関連する可能性が示唆されている変異が含まれていることは興味深い。これらが病因性であり複合体 I の活性を低下させる変異なのか、さらには転移と関連する変異なのか、を明らかにすることが今後の重要な研究課題である。

(2) *CD133* 遺伝子の転写が HIF-1 よりもむしろ HIF-2 により亢進されることが示された。HIF-1 と HIF-2 の標的遺伝子には異なるものがあることが報告されている。例えば、幹細胞の維持に必須である *Oct-4* 遺伝子は HIF-2 α の標的遺伝子であることが明らかになっている。幹細胞マーカー遺伝子として知られる *CD133* 遺伝子も HIF-2 α の標的遺伝子であることは、低酸素が幹細胞の維持や増殖に及ぼす影響という観点から興味深い。今後、*CD133* 遺伝子の HRE を確定すること、HIF-2 α ががん幹

細胞の維持にどのように関わっているのかを明らかにすることが課題である。

E. 結論

mtDNA 中の病因性変異が転移能の亢進に関与するという概念がヒト腫瘍にも当てはまる可能性が出てきたことから、今後さらに注意深い解析を行うことでこのことが確認できれば、将来転移の予測や予防に応用できる可能性がある。また、*CD133* 遺伝子が HIF-2 の標的遺伝子であることが示されたことから、低酸素環境下でがん細胞が幹細胞様の性状を獲得する過程を HIF 阻害剤が抑制する可能性が考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*, 320, 661-664, 2008.
2. Ishikawa K, Koshikawa N, Takenaga K, Nakada K, Hayashi J. Reversible regulation of metastasis by ROS-generating mtDNA mutations. *Mitochondrion*, 8, 339-344, 2008.
3. Ishikawa K, Hashizume O, Koshikawa N, Fukuda S, Nakada K, Takenaga K, Hayashi J. Enhanced glycolysis induced by mtDNA mutations does not regulate metastasis. *FEBS Lett.*, 582, 3525-3530, 2008.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

翻訳調節を介した細胞増殖と老化制御メカニズムの解明

研究分担者 古関 明彦 独立行政法人理化学研究所免疫アレルギー科学総合
研究センター 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作用して細胞老化を制御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いることを今まで示してきた。昨年度までに、新規ポリコム群タンパク Pcl2 はポリコム群に対し拮抗的に作用し、その作用機序は翻訳調節を介したポリコム群タンパクの発現制御メカニズムであることを新たに示し、新たながん抑制候補遺伝子であることを示した。Pcl2 の機能発現機序を明らかにするために、本年度は、その Tudor ドメイン及びふたつの PHD フィンガーについて構造解析及び生化学的的特性の解析を行った。その結果、いずれも異なるヒストン修飾を認識することが示され、Pcl2 はヒストンコードを文脈として読み取るタンパクであることが示唆された。また、ヒストン以外のメチル化タンパクを認識しうる可能性が示唆された。

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作用して細胞老化を制御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いることを今まで示してきた。昨年度までに、新規ポリコム群タンパク Pcl2 はポリコム群に対し拮抗的に作用し、その作用機序は翻訳調節を介したポリコム群タンパクの発現制御メカニズムであることを新たに示し、新たながん抑制候補遺伝子であることを示した。Pcl2 の機能発現機序を明らかにするために、今までに、その Tudor ドメイン及びふたつの PHD フィンガーはヒストンテールのメチル化状態を認識することが明らかになった。本年度は、そのようなメチル化認識の生物学的機能を解析した。

B. 研究方法

Tudor ドメインと PHD 1 について、それぞれを欠損した Pcl2 及び野生型 Pcl2 を発現するベクターを構築し、Pcl2 を完全に欠損した ES 細胞に導入し、それぞれのクロマチン結合とポリコム群のクロマチン結合への影響をク

ロマチン免疫沈降法 (ChIP) 及びそれをマイクロアレイと組み合わせた (ChIP-Chip 法) により解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験と動物実験については、以下に示す文部科学省及び環境省関係法令・指針に準拠して定められた理研所内規程に則って行っている。

1. 遺伝子組換え実験

【関係法令・指針】

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律

【理研所内規程】

横浜研究所遺伝子組換え実験実施安全管理規程

横浜研究所遺伝子組換え実験に関わる申請及び承認に関する細則

C. 研究結果

Tudor ドメインと PHD 1 について、それぞれを欠損した Pcl2 及び野生型 Pcl2 を発現するベクターを構築し、Pcl2 を完全に欠損した ES 細胞に導入した。ChIP-Chip 法により、野生型 Pcl2 の標的遺伝子群として約 300 遺伝子

を同定した。これらはPc12を含む複合体であるPRC2の標的の約10%にしか過ぎず、もうひとつのポリコム群複合体であるPRC1の標的とより強くオーバーラップすることが明らかになった。すなわち、Pc12のクロマチン結合は通常のPRC2とは異なる制御を受けることが示された。一方、TudorドメインあるいはPHD1を欠損したPc12のクロマチン結合は野生型に比較して10%程度まで減少していたことから、H3K27トリメチル化の認識が必須であることが示された。また、これらを発現させるとH3K27トリメチル化レベルそのものも顕著に低下した。

D. 考察

Pc12のTudorドメイン及びPHDフィンガーを介したヒストンH3K27トリメチル化修飾の認識は、それ自身を維持するのに必要であることが示され、Pc12を介したフィードフォワードループが存在する可能性が示された。また、Pc12による標的遺伝子群の選択は、単にPRC2と複合体を構成する過程だけではなく、PRC1との相互作用を必要とする過程も内在させている可能性も示された。

E. 結論

Pc12はポリコム群が作用するにあたって、クロマチン状況を読み取って、そのポリコム群の機能発現を制御するためのモジュールであることが示唆された。今後、がん抑制遺伝子座Ink4aにおける作用発現メカニズムを明らかにしていく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Mimura N, Yuasa S, Soma M, Jin H, Kimura K, Goto S, Koseki H, Aoe T, Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP *Mol Cell Biol*. (2008) 28(1):293-301
- Calés C, Román-Trufero M, Pavón L, Serrano I, Melgar T, Endoh M, Pérez C,

Koseki H, Vidal M., (2008) Inactivation of the polycomb group protein Ring1B unveils an antiproliferative role in hematopoietic cell expansion and cooperation with tumorigenesis associated with Ink4a deletion. *Mol Cell Biol*. 28(3):1018-28.

- Puschendorf M, Terranova R, Boutsma E, Mao X, Isono K, Brykczynska U, Kolb C, Otte AP, Koseki H, Orkin SH, van Lohuizen M, Peters AH (2008) PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat Genet*. 40(4):411-20.
- Endoh M, Endo TA, Endoh T, Fujimura Y, Ohara O, Toyada T, Otte AP, Okano M, Brockdorff N, Vidal M, Koseki H. (2008) Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development*. 135(8):1513-24.
- Hong Z., Jiang J., Lan L., Nakajima S., Kanno S., Koseki H., Yasui A. (2008) A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell. *Nucleic Acids Res*. 36:2939-2947.
- Ouchida R, Yamasaki S., Hikida M., Masuda K., Kawamura K., Wada A., Mochizuki S., Tagawa M., Sakamoto A., Hatano M., Tokuhisa T., Koseki H., Saito T., Kurosaki T., Wang JY. (2008) A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3zeta-chain degradation. *Immunity*. 29:33-43.
- Hirahara K., Yamashita M., Iwamura C., Shinoda K., Hasegawa A., Yoshizawa H., Koseki H., Gejyo F, Nakayama T. (2008) Repressor of GATA regulates T(H)2-driven allergic airway

- inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 122(3):512-20. e11.
8. Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, Idaira Y, Asada Y, Kitamura H, Yamasaki S, Hojyo S, Nakayama M, Ohara O, Koseki H, Dos Santos HG, Bonafe L, Ha-Vinh R, Zankl A, Unger S, Kraenzlin ME, Beckmann JS, Saito I, Rivolta C, Ikegawa S, Superti-Furga A, Hirano T. (2008) The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS ONE.* 3(11):e3642. Epub .
9. Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE. (2008) Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* 4(10):e1000242.
10. Tanuma N, Kim SE, Beullens M, Tsubaki Y, Mitsuhashi S, Nomura M, Kawamura T, Isono K, Koseki H, Sato M, Bollen M, Kikuchi K, Shima H. (2008) Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase-1 (NIPPI1) Directs Protein Phosphatase-1 (PP1) to Dephosphorylate the U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle (snRNP) Component, Spliceosome-associated Protein 155 (Sap155). *J Biol Chem.* 283(51):35805-35814.
11. Harada M, Murakami H, Okawa A, Okimoto N, Hiraoka S, Nakahara T, Akasaka R, Shiraishi YI, Futatsugi N, Mizutani-Koseki Y, Kuroiwa A, Shirouzu M, Yokoyama S, Taiji M, Iseki S, Ornitz DM, Koseki H. FGF9 monomer-dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion. *Nat Genet.* 15: 41(3) : 289-98
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
出願番号：特願2008-081826(平成20年3月26日出願)発明の名称：変異体FGF
古関明彦他4名
研究成果の意義及び今後の発展性

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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>Kamijo T</u>	INK4a	Manfred Schwab	Encyclopedia of Cancer	Springer	Germany	2008	インターネット出版

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
Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, <u>Ozaki T</u> , <u>Nakagawara A.</u>	TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation.	Oncogene	27	409-420	2008
Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, <u>Nakagawara A.</u>	Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature.	Oncogene	27	441-449	2008
Yoshida K, <u>Ozaki T</u> , Furuya K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Omura K, <u>Nakagawara A.</u>	ATM-dependent nuclear accumulation of IKK- α plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin.	Oncogene	27	1183-1188	2008
Arai H, <u>Ozaki T</u> , Niizuma H, Nakamura Y, Ohira M, Sugita K, <u>Nakagawara A.</u>	ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma and induced in response to retinoic acid.	Oncol. Rep.	19	1381-1388	2008
Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, <u>Nakagawara A.</u> <u>Kamijo T.</u>	Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa up-regulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells.	Oncogene	27	741-754	2008

Bu Y, Suenaga Y, Ono S, Koda T, Song F, <u>Nakagawara A</u> , <u>Ozaki T</u> .	Sp1-mediated transcriptional regulation of NFBFD1/MDC1 plays a critical role in DNA damage response pathway.	Genes Cells	13	53-66	2008
Okoshi R, <u>Ozaki T</u> , Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, <u>Kamijo T</u> , <u>Nakagawara A</u> , Kizaki H.	Activation of AMP-activated Protein Kinase Induces p53-dependent Apoptotic Cell Death in Response to Energetic Stress.	J. Biol. Chem.	283	3979-3987	2008
Li Y, <u>Ozaki T</u> , Kikuchi H, Yamamoto H, Ohira M, <u>Nakagawara A</u> .	A novel HECT-type E3 ubiquitin protein ligase NEDL1 enhances the p53-mediated apoptotic cell death in its catalytic activity-independent manner.	Oncogene	27	3700-3709	2008
Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, <u>Ozaki T</u> , <u>Nakagawara A</u> .	DeltaNp63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	369	994-1000	2008
Honda S, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Ohira M, Matsunaga T, Yamaoka H, Horie H, Ohnuma N, <u>Nakagawara A</u> , Hiyama E, Todo S, Kaneko Y.	The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients.	Int. J. Cancer	123	1117-1125	2008
Wang H, <u>Ozaki T</u> , Shamim Hossain M, Nakamura Y, <u>Kamijo T</u> , Xue X, <u>Nakagawara A</u> .	A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	370	594-598	2008
Abe M, Watanabe N, McDonnell N, Takato T, Ohira M, <u>Nakagawara A</u> , Ushijima T.	Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis.	Oncology	74	50-60	2008

Koida N, <u>Ozaki T</u> , Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, Okoshi R, <u>Kamijo T</u> , Omura K, <u>Nakagawara A</u> .	Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation.	J. Biol. Chem.	283	8555-8563	2008
Inoue K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Todo S, <u>Nakagawara A</u> , <u>Ozaki T</u> .	NFBD1/MDC1 stabilizes oncogenic MDM2 to contribute to cell fate determination in response to DNA damage.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	371	829-833	2008
Nakagawa H, Ohira M, Hayashi S, Abe S, Saito S, Nagahori N, Monde K, Shinohara Y, Fujitani N, Kondo H, Akiyama S, <u>Nakagawara A</u> , Nishimura S.	Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system.	Cancer Lett.	270	295-301	2008
Hossain MS, <u>Ozaki T</u> , Wang H, Nakagawa A, Takenobu H, Ohira M, <u>Kamijo T</u> , <u>Nakagawara A</u> .	N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (<i>NLRR1</i>) gene in neuroblastoma.	Oncogene	27	6075-6082	2008
Ando K, Ohira M, <u>Ozaki T</u> , Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, <u>Kamijo T</u> , Murakami Y, <u>Nakagawara A</u> .	Expression of <i>TSLC1</i> , a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation.	Int. J. Cancer	123	2087-2094	2008
Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, <u>Ozaki T</u> , <u>Nakagawara A</u> .	<i>KIF1Bβ</i> functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death.	J. Biol. Chem.	283	24426-24434	2008

Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, <u>Nakagawara A</u> , Hayashi Y, Mano H, Ogawa S.	Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma.	Nature	455	971-974	2008
Ikematsu S, <u>Nakagawara A</u> , Nakamura Y, Ohira M, Shinjo M, Kishida S, Kadomatsu K.	Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma.	Cancer Sci.	99	2070-2074	2008
Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, <u>Nakagawara A</u> , Hiyama E, Todo S, Kaneko Y.	Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma.	Br. J. Cancer	99	1891-1899	2008
Fujita T, Ikeda H, Kawasaki K, Taira N, Ogasawara Y, <u>Nakagawara A</u> , Doihara H.	Clinicopathological relevance of UbcH10 in breast cancer.	Cancer Sci.	In press		2008
Ishikawa K, <u>Takenaga K</u> , Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J.	ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis.	Science	320	661-664	2008
Ishikawa K, Koshikawa N, <u>Takenaga K</u> , Nakada K, Hayashi J.	Reversible regulation of metastasis by ROS-generating mtDNA mutations.	Mitochondrion	8	339-344	2008
Ishikawa K, Hashizume O, Koshikawa N, Fukuda S, Nakada K, <u>Takenaga K</u> , Hayashi J.	Enhanced glycolysis induced by mtDNA mutations does not regulate metastasis.	FEBS Lett.	582	3525-3530	2008

Mimura N, Yuasa S, Soma M, Jin H, Kimura K, Goto S, <u>Koseki H</u> , Aoe T.	Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP.	Mol. Cell Biol.	28	293-301	2008
Calés C, Román-Trufero M, Pavón L, Serrano I, Melgar T, Endoh M, Pérez C, <u>Koseki H</u> , Vidal M.	Inactivation of the polycomb group protein Ring1B unveils an antiproliferative role in hematopoietic cell expansion and cooperation with tumorigenesis associated with Ink4a deletion.	Mol. Cell Biol.	28	1018-1028	2008
Puschendorf M, Terranova R, Boutsma E, Mao X, Isono K, Brykczynska U, Kolb C, Otte AP, <u>Koseki H</u> , Orkin SH, van Lohuizen M, Peters AH.	PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos.	Nat. Genet.	40	411-420	2008
Endoh M, Endo TA, Endoh T, Fujimura Y, Ohara O, Toyada T, Otte AP, Okano M, Brockdorff N, Vidal M, <u>Koseki H</u> .	Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity.	Development	135	1513-1524	2008
Hong Z, Jiang J, Lan L, Nakajima S, Kanno S, <u>Koseki H</u> , Yasui A.	A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell.	Nucleic Acids Res.	36	2939-2947	2008
Ouchida R, Yamasaki S, Hikida M, Masuda K, Kawamura K, Wada A, Mochizuki S, Tagawa M, Sakamoto A, Hatano M, Tokuhisa T, <u>Koseki H</u> , Saito T, Kurosaki T, Wang JY.	A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3zeta-chain degradation.	Immunity	29	33-43	2008

Hirahara K, Yamashita M, Iwamura C, Shinoda K, Hasegawa A, Yoshizawa H, <u>Koseki H</u> , Gejyo F, Nakayama T.	Repressor of GATA regulates T(H)2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness.	J. Allergy Clin. Immunol.	122	512-520, ell.	2008
Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, Idaira Y, Asada Y, Kitamura H, Yamasaki S, Hojo S, Nakayama M, Ohara O, <u>Koseki H</u> , Dos Santos HG, Bonafe L, Ha-Vinh R, Zankl A, Unger S, Kraenzlin ME, Beckmann JS, Saito I, Rivolta C, Ikegawa S, Superti-Furga A, Hirano T.	The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways.	PLoS ONE.	3	e3642, Epub.	2008
Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, <u>Koseki H</u> , Bernstein BE.	Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains.	PLoS Genet.	4	e1000242	2008

Tanuma N, Kim SE, Beullens M, Tsubaki Y, Mitsuhashi S, Nomura M, Kawamura T, Isono K, <u>Koseki H</u> , Sato M, Bollen M, Kikuchi K, Shima H.	Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase-1 (NIPPI) Directs Protein Phosphatase-1 (PP1) to Dephosphorylate the U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle (snRNP) Component, Spliceosome-associated Protein 155 (Sap155).	J. Biol. Chem.	283	35805-35814	2008
Miyake I, Ohira M, <u>Nakagawara A</u> , Sakai R.	Distinct role of SheC docking protein in the differentiation of neuroblastoma.	Oncogene	28	662-673	2009
Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y, <u>Ozaki T</u> , Isogai E, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, <u>Nakagawara A</u> .	High expression of <i>ncRAN</i> , a novel non-coding RNA mapped to chromosoma 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma.	Int. J. Oncol.	In press		2009
Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Tanaka M, Shikama N, <u>Kamijo T</u> , Shiohara M, Koike K.	Low toxicity of a conditioning with 8-Gy total body irradiation, fludarabine and cyclophosphamide as preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric hematological malignancies.	Pediatr. Transplant.	In press		2009
Abe M, <u>Kamijo T</u> , Matsuzawa S, Miki J, Nakazawa Y, Sakashita K, Okabe T, Honda T, Mitsuyama J, Koike K.	High incidence of meropenem resistance among alpha-hemolytic streptococci in children with cancer.	Pediatric. International.	In press		2009

Harada M, Murakami H, Okawa A, Okimoto N, Hiraoka S, Nakahara T, Akasaka R, Shiraishi YI, Futatsugi N, Mizutani-Koseki Y, Kuroiwa A, Shirouzu M, Yokoyama S, Taiji M, Iseki S, Ornitz DM, Koseki H.	FGF9 monomer-dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion.	Nat. Genet.	41	289-298	2009
--	--	-------------	----	---------	------

IV. 研究成果の刊行物・別刷



ORIGINAL ARTICLE

Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature

N Tomioka^{1,2,3,11}, S Oba^{4,11}, M Ohira^{1,11}, A Misra^{2,12}, J Fridlyand³, S Ishii^{4,13}, Y Nakamura¹, E Isogai¹, T Hirata⁶, Y Yoshida⁷, S Todo³, Y Kaneko⁸, DG Albertson^{9,10}, D Pinkel^{9,10}, BG Feuerstein^{2,9,10,12} and A Nakagawara¹

¹Division of Biochemistry, Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba, Japan; ²Department of Neurological Surgery, Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, CA, USA; ³Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan; ⁴Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Japan; ⁵Department of Epidemiology and Biostatistics, University of California, San Francisco, CA, USA; ⁶Hisamitsu Pharmaceutical Co. Inc., Tokyo, Japan; ⁷GENESHOT project, R&D Center, NGK Insulators, Ltd, Nagoya, Japan; ⁸Saitama Cancer Center Research Institute, Saitama, Japan; ⁹Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, CA, USA and ¹⁰Comprehensive Cancer Center, University of California, San Francisco, CA, USA

Human neuroblastoma remains enigmatic because it often shows spontaneous regression and aggressive growth. The prognosis of advanced stage of sporadic neuroblastomas is still poor. Here, we investigated whether genomic and molecular signatures could categorize new therapeutic risk groups in primary neuroblastomas. We conducted microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) with a DNA chip carrying 2464 BAC clones to examine genomic aberrations of 236 neuroblastomas and used in-house cDNA microarrays for gene-expression profiling. Array-CGH demonstrated three major genomic groups of chromosomal aberrations: silent (GGS), partial gains and/or losses (GGP) and whole gains and/or losses (GGW), which well corresponded with the patterns of chromosome 17 abnormalities. They were further classified into subgroups with different outcomes. In 112 sporadic neuroblastomas, *MYCN* amplification was frequent in GGS (22%) and GGP (53%) and caused serious outcomes in patients. Sporadic tumors with a single copy of *MYCN* showed the 5-year cumulative survival rates of 89% in GGS, 53% in GGP and 85% in GGW. Molecular signatures also segregated patients into the favorable and unfavorable prognosis groups ($P=0.001$). Both univariate and multivariate analyses revealed that genomic and molecular signatures were mutually independent, powerful prognostic indicators. Thus, combined genomic and molecular signatures may categorize novel risk groups and confer new clues for

allowing tailored or even individualized medicine to patients with neuroblastoma.

Oncogene (2008) 27, 441–449; doi:10.1038/sj.onc.1210661; published online 16 July 2007

Keywords: neuroblastoma; array-CGH; molecular signature; risk stratification; microarray

Introduction

Neuroblastoma is one of the most common solid tumors in children. However, its clinical behavior is enigmatic because the tumor usually regresses spontaneously when developed in patients under 1 year of age, but often grows rapidly to cause fatal outcomes when developed as an advanced tumor in patients over the age of 1 year (Brodeur, 2003; Schwab *et al.*, 2003). Recent nationwide mass screening (MS) in Japan for discovering neuroblastoma at the age of 6 months clearly demonstrated the presence of a large number of asymptomatic tumors undergoing spontaneous regression (Woods *et al.*, 2002), which had been suggested by Beckwith and Perrin (1963). The involvement of TrkA, a high-affinity receptor for nerve growth factor, in the regression of neuroblastoma has been suggested; however, the molecular mechanisms of the regressive event still remain elusive (Nakagawara *et al.*, 1993; Nakagawara, 1998). On the other hand, the majority of sporadic neuroblastomas are discovered at advanced stages, and their prognosis is still very poor (Brodeur, 2003; Schwab *et al.*, 2003). Recently advanced cytogenetic analyses revealed that given subsets of neuroblastomas with a favorable prognosis possess the hyperdiploid karyotype of chromosomes (Look *et al.*, 1984; Tomioka *et al.*, 2003) and that the other subsets with an unfavorable prognosis usually possess the diploid or tetraploid karyotype and often have *MYCN* amplification, gains of chromosome arms 1q, 2p and 17q, as well as allelic losses of chromosome arms 1p, 3p and 11q (Brodeur,

Correspondence: Dr A Nakagawara, Division of Biochemistry, Chiba Cancer Center Research Institute, 666-2 Nitona, Chuoh-Ku, Chiba 260-8717, Japan.

E-mail: akiranak@chiba-cc.jp

¹¹These authors contributed equally to this work.

¹²Current address: Department of Neurology, Barrow Neurological Institute, St. Joseph's Hospital and Medical Center, Phoenix, AZ, USA.

¹³Current address: Graduate School of Informatics, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Received 29 December 2006; revised 29 May 2007; accepted 11 June 2007; published online 16 July 2007

2003; Schwab *et al.*, 2003). We and other investigators have previously reported the high accuracy of gene-expression profiling to predict the prognosis of neuroblastoma (Wei *et al.*, 2004; Ohira *et al.*, 2005). However, the prognostic significance of genomic signatures when using a high-resolution DNA microarray in primary neuroblastomas has never been reported. Here, we applied microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) to both sporadic and MS-detected neuroblastomas in order to comprehend their clinical behavior and found that genomic signatures, together with molecular signatures, stratified the novel risk groups in sporadic neuroblastomas.

Results

Patterns of genomic signatures in 236 primary neuroblastomas

The most prominent feature of 236 primary neuroblastomas (112 sporadic and 124 MS detected) was the apparent presence of three genomic groups (GGs) (Figure 1a, its magnified, high-resolution figures are also indicated in Supplementary Figures S1a and b): the group of few chromosomal events (silent, GGS; $n=29$); the group of partial chromosomal gains/losses (GGP; $n=77$) and the group of whole chromosomal gains/losses (GGW; $n=130$) (Supplementary Figures S2a and b). Correlation analysis revealed that the global feature (see Materials and methods) was maximally correlated with the gain of the long arm of chromosome 17 ($R=-0.807$) and with the gain of a whole chromosome 17 ($R=0.75$) (Supplementary Table S1a), therefore the genomic groups GGP and GGW were defined by the status of aberration, by 17q gain and 17 whole chromosomal gain occurred in chromosome 17, respectively. They were followed by DNA ploidy ($R=-0.642$), loss of chromosome 1p ($R=-0.521$), *MYCN* amplification ($R=-0.531$), loss of chromosome 11q ($R=-0.5$), low *TrkA* expression ($R=-0.47$) and age ≥ 1 -year old ($R=-0.466$). Even when tested in 112 sporadic tumors, the correlation coefficient was -0.773 in 17q gain, -0.705 in DNA ploidy, -0.598 in 1p loss, -0.565 in tumor stages, -0.502 in *MYCN* amplification, -0.49 in low *TrkA* expression and -0.458 in age ≥ 1 -year old (Supplementary Table S1b). These suggested that 17q gain was a characteristic and prognosis-related event in primary neuroblastomas. The percentages of DNA diploidy or tetraploidy were 83% (15/18), 66% (33/50) and 18% (17/94) in GGS, GGP and GGW tumors, respectively (Supplementary Table S2a).

GGs tumors rarely showed chromosomal aberrations except *MYCN* amplification in 5 among 29 tumors (Figure 1b, a high-resolution figure is also indicated in Supplementary Figure S1c). To date, the presence of the GGS subgroup with very silent aberrations of the tumor genome has never been verified definitely. The concern about the possible dilution of the tumor-cell DNA content by contamination of stromal cells was cleared by the detailed examination of GGS tumor specimens

(see Supplementary Figure S2b and Supplementary Information).

Seventy-seven GGP tumors, which had 17q gain, were further subgrouped computationally according to the detailed chromosomal event, the presence and/or absence of 1p loss and 11q loss, which are characteristic and *MYCN* amplification (s, single copy of *MYCN*; a, *MYCN* amplification) (Figures 1a and b, and see Supplementary Information). GGP1 tumors were characterized by 1p loss and 17q gain as main aberrations. GGP1a ($n=23$) was one of the most common GGP tumors. They showed the diploid karyotype (10/13, 77%) and had *MYCN* amplification in addition to 1p loss and 17q gain. Interestingly, GGP1s tumors lacking *MYCN* amplification ($n=6$) showed relatively frequent 2p gain, as well as 14q loss, 1q gain, 4p loss and 7p gain that were rare in GGP1a tumors with *MYCN* amplification. GGP2 tumors were characterized by the presence of both 1p loss and 11q loss, in addition to 17q gain. In GGP2a, tumors with *MYCN* amplification ($n=4$) also frequently showed 1q gain. GGP3 tumors formed a group typically characterized by the presence of 11q loss and 17q gain without 1p loss. Intriguingly, only 1 of 27 GGP3 tumors had *MYCN* amplification. All GGP4 tumors except one, which presented neither 1p loss nor 11q loss, also had no *MYCN* amplification. The percentages of diploidy/tetraploidy in GGP1, GGP2, GGP3 and GGP4 tumors were 76% (13/17), 75% (6/8), 76% (13/17) and 13% (1/8), respectively (Supplementary Table S2a).

GGW tumors with whole chromosomal gains and/or losses, especially with the predominant gain of whole chromosome 17 (Figure 1b), were mostly the tumors detected by MS (94/130, 73%; see Supplementary Table S2a). The highest incidence of MS-detected neuroblastomas was observed in GGW4s tumors that were purely composed of whole chromosomal gains/losses. The DNA ploidy analysis revealed that 82% (77/94) of GGW tumors were hyperdiploidy. Similarly to GGP tumors, GGW tumors were categorized into tumors with the following aberrations: 1p loss (GGW1, $n=5$); both 1p loss and 11q loss (GGW2, $n=2$); 11q loss (GGW3, $n=11$) and without any one (GGW4, $n=92$). GGW5 tumors ($n=20$) formed a group of tumors with a low frequency of chromosome 17 on the BAC array. Like chromosome 17, chromosomes 6 and 7 were frequently gained in GGW tumors. *MYCN* amplification was observed in only three tumors belonging to GGW4 or GGW5 (3/112, 2.7%).

Genomic signatures and clinical outcomes

Genomic signatures of neuroblastomas unveiled previously unknown relationships between genetic subgroup and patient prognosis (Figure 1b). The greatest surprise was the difference in the 5-year survival rates between the GGSa (0%, $n=5$) and GGSs (91%, $n=24$) subgroups ($P<0.001$). The other *MYCN*-amplified tumor subgroups, GGP1a ($n=23$), GGP2a ($n=4$) and GGWa ($n=3$), also showed very poor survival rates of 42, 0 and 0%, respectively. On the other hand, GGWs