

2010/9021A

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

難治性神経芽腫の発がんと幹細胞性を制御
する遺伝子の同定および解析とその臨床応用
に関する研究
(H22・3次がん・一般・004)

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 中川原 章

平成23(2011)年3月

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

難治性神経芽腫の発がんと幹細胞性を制御
する遺伝子の同定および解析とその臨床応用
に関する研究
(H22・3次がん・一般・004)

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 中川原 章

平成23(2011)年3月

目 次

I. 総括研究報告	
難治性神経芽腫の発がん幹細胞性を制御する遺伝子の同定および解析 とその臨床応用 中川原 章	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 難治性神経芽腫の発がんに関わる恒常性維持破綻の分子機構解明と その臨床応用 中川原 章	----- 9
2. 神経芽腫におけるがん幹細胞の同定に向けた基盤研究とその臨床応用 上條 岳彦	----- 15
3. 難治性神経芽腫の幹細胞性とトランスクリプトーム解析 大平 美紀	----- 19
4. 遺伝子改変マウスを用いた神経芽腫発がんに関わる新規遺伝子の解析 古関 明彦	----- 23
5. 難治性神経芽腫における特異的ヒストン修飾の解析とその臨床応用 岩間 厚志	----- 27
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 37

I . 総括研究報告書

難治性神経芽腫の発がん幹細胞性を制御する遺伝子の 同定および解析とその臨床応用

研究代表者 中川原 章 千葉県がんセンター・センター長

研究要旨 網羅的なゲノム情報解析に基づいて、個体発生と発がん・進展の分子機構を明らかにし、新しい臨床リスク分類の開発と治療の標的分子を明らかにすることを目的として、本年度は以下の知見を得た。(1) NGF/TrkA シグナルの最下流ターゲットである KIF1B β がミトコンドリアの YME1L1 と結合して活性化し、チトクロムC放出を制御する OPA1 を分解することによってアポトーシスを誘導していることを明らかにした。また、Shf が ALK の新規結合アダプタータンパク質であり、そのシグナルを負に制御していることを見いだした。(2) 神経芽腫培養細胞の増殖を抑制する抗 NLRP1 単クローン抗体を同定した。また、300 万個の低分子化合物ライブラリーを分子イメージングでスクリーニングし、TrkB および ALK に対する機能阻害化合物をそれぞれ7個と3個同定した。(3) 神経芽腫において MYCN と常に共増幅している逆転写 RNA である NCYM を同定した。NCYM は Oct4 を直接転写誘導し、神経芽腫細胞のリプログラミングに関与するものと思われた。(4) 神経芽腫幹細胞において、sphere 形成による CD133 の転写誘導および CD133 による sphere 形成の促進、さらに、増腫瘍性における CD133 C 末細胞内ドメインの重要性を見いだした。また、発がんおよび幹細胞性に関係するポリコム群複合体の新規一員として USP7 を見いだした。

A. 研究目的

最近の治療率向上が目覚ましい小児がんの中で、神経芽腫の約3分の2を占める進行神経芽腫は現在もなお予後が極めて不良であり、わが国のみならず国際的にも大きな問題となっている。したがって、難治性神経芽腫に対する新しい治療戦略を構築することは緊急の課題となっており、本研究では、最新の技術を駆使した神経芽腫発がんの分子機構解明とそれに基づく新しい治療法開発の基盤研究を展開する。これまでの第3次対がん総合戦略研究事業（H16-3次がん一般-005；H19-3次がん一般-006）において、神経芽腫の網羅的ゲノムおよび遺伝子発現解析から、新規がん遺伝子・がん抑制遺伝子の同定に加え、予後

予測用ミニチップの実用化、ゲノム異常パターンによる新しい臨床的リスク分類の開発に成功してきた。今回は、それらの基盤をさらに発展させ、難治性神経芽腫のがん幹細胞や山中らが開発した iPS 細胞技術、さらにはマウスを用いたコンディショナルな神経芽腫発がん誘発系等の新規技術を導入して、神経芽腫発がんのエピジェネティックな分子制御機構を明らかにし、新たな細胞療法や分子パスウェイを標的とする治療法の開発を試みる。

B. 研究方法

主に神経芽腫細胞株および U2OS, Hela 細胞を用いて遺伝子の transfection を行った。また、遺伝子の発現抑制には siRNA を用いた。蛋白質の細胞内局在は免疫蛍光法によった。

その他の細胞レベルでの実験は、標準的な分子生物学的実験方法を用いた。さらに、蛋白質の結合は免疫沈降法を用いて調べた。抗NLRR1モノクローナル抗体の作成には、ヒトNLRR1細胞外ドメインをエピトープとし、ウサギを用いた。がん細胞のiPS化は、センダイウイルスベクターを用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(2001年3月)」に則って行い、患者および患者家族に不利益が生じないよう万全の対策を講じ、必要な研究は千葉県がんセンターの倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 神経芽腫ゲノム情報に基づく神経芽腫発がん機構の解析

これまでのゲノム解析から得られた神経芽腫候補遺伝子(1p領域: TAp73, KIF1Bβ & RUNX3; 2p領域: ALK; 11q領域: TSLC1; 17q領域: SVV, ncRN)および神経芽腫に特化したcDNA

librariesから選択した神経芽腫発がん関連遺伝子(UNC5D, NEDL1, Shf, BMCC1, LMO3, NLRR等)を対象に機能解析を行った。その結果、NGF/TrkAシグナルの最下流ターゲットであるKIF1BβがミトコンドリアのYME1L1と結合して活性化し、チトクロムC放出を制御するOPA1を分解することによってアポトーシスを誘導していることを見いだした。また、ShfがALKの新規結合アダプタータンパク質であり、そのシグナルを負に制御していることを見いだした。

2) 同定した神経芽腫関連遺伝子の創薬への展開

神経芽腫培養細胞の増殖を抑制する抗NLRR1単クローン抗体を同定した。治療への応用が期待される。また、300万個の低分子化合物ライブラリーを分子イメージングでスクリーニングし、これまでにTrkBおよびALKに対する機能阻害化合物をそれぞれ7個と3個同定した。

3) 神経芽腫幹細胞性とリプログラミング機構の臨床応用への展開

神経芽腫においてMYCNと常に共増幅している逆転写RNAであるNCYMを同定した。NCYMはOct4を直接転写誘導し、リプログラミングに関与していることが示唆された。また、神経芽腫のがん幹細胞様細胞であるI-type細胞に山中因子を搭載したセンダイウイルスを感染させ、リプログラミングに成功した。また、I-, N-, S-type細胞を用いた神経芽腫がん幹細胞の可塑性について解析を行い、それぞれのタイプにおいて特異的に発現している遺伝子を同定した。

4) 神経芽腫の発がんエピジェネティクス変化

神経芽腫細胞の無血清・bFGF/EGF培地でのNeurosphere形成とCD133の機能的役割について解析し、sphere形成によるCD133の転写誘導およびCD133によるsphere形成の促進、さらに、増殖場におけるCD133 C末細胞内ドメインの重要性を見いだした。現在、このsphereと通常の接着培養による分化度の高い細胞の2群を用いてゲノムワイドなヒストン修飾(H3K4me23, H3K27me3, H2AK119ub1, H3K9Ac)を解析中である。発がんおよび幹細胞性に関係するポリコム群複合体の新規一員としてUSP7を見いだした。

D. 考察

KIF1Bβは、我々が神経芽腫NB1細胞の染色体1p36.2領域に見いだしたホモ欠失領域から同定したがん抑制遺伝子である。一方、W. Kaelinのグループも独立に家族性褐色細胞腫の研究から、NGF/TrkAシグナルの下流標的分子がKIF1Bβであることを見だし、KIF1Bβが誘導する細胞死の分子機構解明が求められていた。我々は今回、KIF1Bβがミトコンドリアのチトクロムc放出によるアポトーシス経路を上流で制御していることを見だし、その機能的意義を明らかにした。したがって、UNC5Dの役割と共に、NGF欠乏による神経芽腫自然退縮の分子機構が明らかになってきた。神経芽腫の悪性化では、この過程が抑制されているものと思われた。

神経芽腫発がんの分子機構解明から創薬へ

展開する方針を立ててきたが、治療薬としての抗 NLRR1 モノクロナル抗体の候補が同定でき、大規模イメージングによるスクリーニングで TrkB および ALK を標的とした低分子化合物が見つかったことは大きな成果であった。

神経芽腫 I-type 細胞はがん幹細胞様の特性を有しており、N-type と S-type 細胞との間で transconversion が見られる。我々は今回、この I-type 細胞をセンダイウイルスを用いて iPS 化することに成功した。神経芽腫の幹細胞性と発がん機構の解明にこのシステムが極めて有用と思われる。また、我々が見いだした NCYM が Oct4 を転写標的としていることも重要な発見であった。

さらに、神経芽腫幹細胞性の維持に CD133 およびその C 末ドメインの重要性を確認できた。また、ポリコム群複合体の新規一員として USP7 を見出したが、これらは幹細胞の恒常性維持において重要な役割を果たしているものと思われた。

このように、ゲノム情報から同定した新規遺伝子や MYCN のがん、とくに神経芽腫における機能的役割が明らかになってきた。

E. 結論

これまでのゲノム情報から同定した神経芽腫候補遺伝子の機能解析とそれらを標的とする治療薬の同定研究が具体的に進み、実用化への道が拓けて来た。また、平行して、がん幹細胞性および神経芽腫のリプログラミングに関する NCYM など新規遺伝子が明らかになってきており、臨床的な新規診断法や治療への応用展開も期待できる。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. De Katleen P, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris JM, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A,

Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schulte JH, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. Accurate Outcome Prediction in Neuroblastoma across Independent Data Sets Using a Multigene Signature. *Clin. Cancer Res.* 16:1532-1541, 2010

2. Kojima S, Hyakutake A, Koshikawa N, Nakagawara A, Takenaga K. MCL-1V, a novel mouse antiapoptotic MCL-I variant, generated by RNA splicing at a non-canonical splicing pair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:492-497, 2010
3. Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamijo T. Bmil is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene* 29:2681-2690, 2010
4. Yamada C, Ozaki T, Ando K, Suenaga Y, Inoue K, Ito Y, Okoshi R, Kageyama H, Kimura H, Miyazaki M, Nakagawara A. RUNX3 modulates DNA damage-mediated phosphorylation of tumor suppressor p53 at Ser-15 and acts as a Co-activator for p53. *J. Biol. Chem.* 285:16693-16703, 2010
5. Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A. LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392:252-257, 2010
6. Arai Y, Honda S, Haruta M, Kasai F, Fujiwara Y, Ohshima J, Sasaki F, Nakagawara A, Horie H, Yamaoka H, Hiyama E, Kaneko Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes*

- Cancer*. 49:596-609, 2010.
7. Bu Y, Suenaga Y, Okoshi R, Sang M, Kubo N, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. NFBD1/MDC1 participates in the regulation of G2/M transition in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397:157-162, 2010.
 8. Iwata S, Takenobu H, Kageyama H, Koseki H, Ishii T, Nakazawa A, Tatezaki S, Nakagawara A, Kamijo T. Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma. *Cancer Sci.* 101:1646-1652, 2010.
 9. Shi Y, Takenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Jiang LL, Kamijo T. HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer.* 46:2324-2334, 2010
 10. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeeck J, Van Maerken T, De Paepe A, Laureys G, Schulte JH, Schramm A, Van Den Broecke C, Vermeulen J, Van Roy N, Beiske K, Renard M, Noguera R, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Kogner P, Martinsson T, Nakagawara A, Ohira M, Caron H, Eggert A, Cools J, Versteeg R, Speleman F. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin. Cancer Res.* 16:4353-4362, 2010
 11. Ohira M, Nakagawara A. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. *Cancer Sci.* 101:2295-2301, 2010
 12. Kubo N, Okoshi R, Nakashima K, Shimozato O, Nakagawara A, Ozaki T. MDM2 promotes the proteasomal degradation of p73 through the interaction with Itch in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 403:405-411, 2010.
 13. Hishiki T, Saito T, Terui K, Sato Y, Takenouchi A, Yahata E, Ono S, Nakagawara A, Kamijo T, Nakamura Y, Matsunaga T, Yoshida H. Reevaluation of trkA expression as a biological marker of neuroblastoma by high-sensitivity expression analysis—a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute. *J. Pediatr. Surg.* 2010 45:2293-2298. 2010.
 14. Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Masumoto K, Ohira M, Nakagawara A, Taguchi T. Concordance for neuroblastoma in monozygotic twins: Case report and review of the literature. *J. Pediatr. Surg.* 45:2312-2316, 2010.
 15. Rintaro O, Kubo N, Kizaki H, Nakagawara A, Ozaki T. A novel molecular mechanism behind p53-dependent apoptosis in response to energetic stress. *Seikagaku.* 82:1117-1120. Japanese. No abstract available. 2010
 16. Kimura W, Machii M, Xue X, Sultana N, Hikosaka K, Sharkar MT, Uezato T, Matsuda M, Koseki H, *Miura N. Irx11 mutant mice show reduced tendon differentiation and no patterning defects in musculoskeletal system development. *Genesis* 49:2-9. 2010.
 17. Negishi M, Saraya A, Mochizuki S, Helin K, Koseki H, *Iwama A. A novel zinc finger protein Zfp277 mediates transcriptional repression of the Ink4a/arf locus through polycomb repressive complex 1. *PLoS One* 5:e12373. 2010.
 18. Wada T, Ishiwata K, Koseki H, Ishikura T, Ugajin T, Ohnuma N, Obata K, Ishikawa R, Yoshikawa S, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Yokozeki H, Watanabe N, *Karasuyama H. Selective ablation of

- basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. *J Clin Invest.* 120:2867-2875. 2010.
19. Oka A, Mita A, Takada Y, Koseki H, *Shiroishi T. Reproductive isolation in hybrid mice due to spermatogenesis defects at three meiotic stages. *Genetics* 186: 339-351. 2010.
 20. Pereira CF, Piccolo FM, Tsubouchi T, Sauer S, Ryan NK, Bruno L, Landeira D, Santos J, Banito A, Gil J, Koseki H, Merkenschlager M, *Fisher AG. ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency. *Cell Stem Cell.* 6:547-556. 2010.
 21. Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Shozaki Y, Sharif J, Matsuda M, Mochiduki S, Hasegawa T, Kitahara G, Endo TA, Toyoda T, Ohara O, Harigaya K, *Koseki H, *Taniguchi M. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest.* 120:2610-2618. 2010.
 22. Majewski IJ, Ritchie ME, Phipson B, Corbin J, Pakusch M, Ebert A, Busslinger M, Koseki H, Hu Y, Smyth GK, Alexander WS, Hilton DJ, *Blewitt ME. Opposing roles of polycomb repressive complexes in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 116:731-739. 2010.
 23. Suzuki A, Iwamura C, Shinoda K, Tumes DJ, Y Kimura M, Hosokawa H, Endo Y, Horiuchi S, Tokoyoda K, Koseki H, Yamashita M, *Nakayama T. Polycomb group gene product Ring1B regulates Th2-driven airway inflammation through the inhibition of Bim-mediated apoptosis of effector Th2 cells in the lung. *J Immunol.* 184:4510-4520. 2010.
 24. Xue X, Kimura W, Wang B, Hikosaka K, Itakura T, Uezato T, Matsuda M, Koseki H, *Miura N. A unique expression pattern of Tbx10 in the hindbrain as revealed by Tbx10(lacZ) allele. *Genesis* 48:295-302. 2010.
 25. Shimoyama T, Hiraoka S, *Takemoto M, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, Watanabe A, Fujimoto M, Kawamura H, Sato S, Tsurutani Y, Saito Y, Perbal B, *Koseki H, Yokote K. CCN3 Inhibits Neointimal Hyperplasia Through Modulation of Smooth Muscle Cell Growth and Migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:675-682. 2010.
 26. Konuma T, Oguro H, and Iwama A. Role of polycomb group proteins in Hematopoietic stem cells. (Review) *Dev Growth Differ* 52, 505-516, 2010.
 27. Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, and Iwama A. The polycomb-group gene Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion & tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and independent manners. *Hepatology* 52, 1111-1123, 2010.
 28. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, and Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene* 24, 3723-3731, 2010.
 29. Ozaki T, Kubo N, Nakagawara A. p73-binding partners and their functional significance. *Int. J. Proteomics.* 2010 (Accepted)
 30. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M,

- Nakagawara A, Kamijo T. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene*. 30:97-105, 2011.
31. Ryu M, Hamano M, Nakagawara A, Shinoda M, Shimizu H, Miura T, Yoshida I, Nemoto A, Yoshikawa A. The benchmark analysis of gastric, colorectal and rectal cancer pathways: toward establishing standardized clinical pathway in the cancer care. *Jpn J Clin Oncol*. 41:2-9. 2011
 32. Okoshi R, Kubo N, Nakashima K, Shimozato O, Nakagawara A, Ozaki T. CREB represses p53-dependent transactivation of MDM2 through the complex formation with p53 and contributes to p53-mediated apoptosis in response to glucose deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 406:79-84. 2011
 33. Li X, Isono K, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Koseki YM, Otte AP, Casanova M, Kitamura M, Kamijo T, Sharif J, Ohara O, Toyada T, Bernstein BE, Brockdorff N and Koseki H. Mammalian Polycomblike Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes. *Mol Cell Biol*. Jan;31(2):351-64. 2011.
 34. Zhang L, Haraguchi S, Koda T, Hashimoto K, Nakagawara A. Muscle atrophy and motor neuron degeneration in human NEDL1 transgenic mice. *J Biomed Biotechnol*. 2011 (Accepted).
 35. Iwama E, Tsuchimoto D, Iyama T, Sakumi K, Nakagawara A, Takayama K, Nakanishi Y, Nakabeppu Y. Cancer-related PRUNE2 protein is associated with nucleotides and is highly expressed in mature nerve tissues. *J Mol Neurosci*. 2011 (Accepted).
 36. Ozaki T, Nakagawara A. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol*. 2011 (Accepted).
 37. Kimura M, Takenobu H, Akita N, Nakazawa A, Ochiai H, Shimozato O, Fujimura YI, Koseki H, Yoshino I, Kimura H, Nakagawara A, Kamijo T. Bmi1 regulates cell fate via tumor suppressor WWOX repression in small cell lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2011 (Accepted).
 38. Kawahara N, Sugimura H, Nakagawara A, Masui T, Miyake J, Akiyama M, Wahid IA, Hao X, Akaza H. The 6th Asia Cancer Forum: What Should We Do to Place Cancer on the Global Health Agenda? Sharing Information Leads to Human Security. *Jpn J Clin Oncol*. 2011 (Accepted).
 39. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers* (Accepted).
 40. Takahashi A, Tokita H, Takahashi K, Takeoka T, Murayama K, Tomotsune D, Ohira M, Iwamatsu A, Ohara K, Yazaki K, Koda T, Nakagawara A, Tani K. A novel potent tumour promoter aberrantly overexpressed in most human cancers. *Scientific Reports* (Accepted)
 41. Isogai E, Ohira M, Ozaki T, Oba S, Nakamura Y, Nakagawara A. Oncogenic LMO3 collaborates with HEN2 to enhance neuroblastoma cell growth through transactivation of Mash1. *PLoS ONE* (Accepted).
 42. Takeda Y, Nakaseko C, Tanaka H, Takeuchi M, C Yui M, Saraya A, Miyagi S, Wang C, Tanaka S, Ohwada C, Sakaida E, Yamaguchi N, Yokote K, Hennighausen L, and Iwama A. Direct activation of STAT5 by ETV6-Lyn fusion protein promotes induction of myeloproliferative

neoplasm with myelofibrosis. Br J
Haematol 2011 (Accepted).

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

難治性神経芽腫の発がんに関わる恒常性維持破綻の
分子機構解明とその臨床応用

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター・センター長

研究要旨 これまでに得られた神経芽腫の網羅的ゲノム解析情報に基づいて、個体発生と発がん・進展及びがん細胞の恒常性維持破綻の分子機構を明らかにし、治療法開発のための標的分子を明らかにすることを目的として、以下の知見を得た。(1) NGF/TrkAシグナルの最下流ターゲットであるKIF1B β がミトコンドリアのYME1L1と結合して活性化し、チトクロムC放出を制御するOPA1を分解することによってアポトーシスを誘導していることを見いだした。したがって、UNC5Dの役割と共に、NGF欠乏による神経芽腫自然退縮の分子機構が明らかになってきた。神経芽腫の悪性化では、この過程が抑制されているものと思われた。(2) 我々が同定した神経芽腫がん遺伝子LMO3がNotchシグナルを介してMash1を転写促進し、悪性化に寄与していることを明らかにした。(3) 新規結合アダプタータンパク質であるShfがALK受容体と結合し、そのシグナルを制御していることを見いだした。(4) 神経芽腫培養細胞の増殖を抑制する抗NLRR1単クローン抗体を同定し、治療への応用が期待された。(5) 300万個の低分子化合物ライブラリーを分子イメージングでスクリーニングし、これまでにTrkBおよびALKに対する機能阻害化合物をそれぞれ7個と3個同定した。

A. 研究目的

これまでに我々が得た神経芽腫の網羅的ゲノム解析情報に基づいて、個体発生と発がん・進展及びがん細胞の恒常性維持破綻の分子機構を明らかにし、治療法開発のための標的分子を明らかにすることを目的とした。具体的な解析対象とした神経芽腫候補遺伝子は、1p領域: TAp73, KIF1B β & RUNX3 ; 2p領域: ALK ; 11q領域: TSLC1 ; 17q領域: SVV, ncRAN であるが、今回はKIF1B β と ALK に対して解析を行った。また、神経芽腫に特化した cDNA libraries から選択した神経芽腫発がん関連遺伝子: UNC5D, NEDL1, Shf, BMCC1, LMO3, NLRR 等も解析した。また、創薬の標的分子として、神経芽腫の発がん と進展に関与する TrkB と ALK を選択した。

B. 研究方法

主に神経芽腫細胞株および U2OS, Hela 細胞を用いて遺伝子の transfection を行った。また、遺伝子の発現抑制には siRNA を用いた。蛋白質の細胞内局在は免疫蛍光法によった。腫瘍組織内の蛋白質発現および局在の検索は免疫組織化学によった。遺伝子発現量の測定は定量的 RT-PCR によった。また、KIF1B β の結合蛋白質は酵母ツーハイブリッドスクリーニング法によって同定した。その他の分子生物学的実験は標準的組み替え DNA 実験の手法を用いた。低分子化合物 300 万個のライブラリーは米国スクイブ研究所が開発したものを用了。低分子化合物のスクリーニングは、クラウドによるグリッ

ドコンピューティングを用いた分子イメージング法によった。さらに、統計解析には、student's t-test, Logrank test, Cox regression analysis を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、「ヒトゲノムに関する基本原則」(科学技術会議生命倫理委員会)を十分に理解したうえで、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省共同告示第1号)(平成16年12月28日全部改正)(平成17年6月29日一部改正)」を遵守して行った。また、必要なものは千葉県がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。

動物実験は、動物委員会の定める動物実験倫理規定に従って、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をとまなう実験への十分な配慮のもとに行った。

C. 研究結果

(1) 1番染色体短腕1p36.2にマップされる神経芽腫抑制遺伝子 KIF1Bβ の機能解析
我々が神経芽腫細胞株 NB1 の 1p36.2 ホモ欠失領域から同定した新規がん抑制遺伝子 KIF1Bb は、細胞に高発現すると p53 非依存的にアポトーシスを誘導したことから、その責任領域である coiled coil 領域をベイトにして酵母ツーハイブリッド法により結合する蛋白質をスクリーニングし、YME1L1 を同定した。YME1L1 は KIF1Bβ により活性化され、ミトコンドリア膜に局在する GTPase である OPA1 をクリーブにより活性化し、チトクロム c の放出を促した。また、この現象に伴い、KIF1Bβ の高発現はミトコンドリアの融合を阻害して細胞死を誘導し、逆に、その低発現はミトコンドリアの融合を促進して細胞の生存を促した。なお、KIF1Bα にはそのような機能は全く見られなかった。

(2) 神経芽腫がん遺伝子 LM03 の機能解析
我々が神経芽腫のがん遺伝子として同定した LM03 は、HEN2 とヘテロ複合体を形成し、

Mash1 の転写を直接誘導した。ちなみに、100 例の神経芽腫臨床検体において、LM03 mRNA および Mash1 mRNA の高発現は共に予後不良と有意に相関していた。また、両蛋白質は Mash1 の転写抑制因子である HES1 と結合し、Mash1 発現の制御に関与していることが強く示唆された。

(3) 新規遺伝子 Shf の機能解析と予後因子としての意義

神経芽腫 cDNA プロジェクトより同定した Shf (*Src homology 2 domain containing F*) は、4 個のリン酸化チロシン残基と 1 個の SH2 ドメインを持つアダプター蛋白質である。今回、我々は、Shf が TrkA と結合し、NGF 依存的な神経分化を促進すること、293T 細胞で Shf と ALK を共発現し免疫沈降を行ったところ、これらが細胞内で相互作用を示し、さらに F1174L 活性型変異体 ALK との結合は野生型より顕著であることを見いだした。次に臨床検体を用いて Shf と ALK の発現量を解析したところ、Shf mRNA は予後不良な神経芽腫で有意に発現が低かった。

(4) 新規オーファン受容体 NLRR1 の機能と創薬標的としての意義

NLRR1 はハイリスク神経芽腫において発現が高く、その転写は MYCN により直接誘導されていることが明らかになった。そこで、NLRR1 細胞外領域を標的とする単クローン抗体を作製し、NLRR1 を発現する神経芽腫細胞株の増殖を抑制するクローンを同定した。

(5) グリッド・コンピューティングによる低分子化合物の創薬スクリーニング
300 万個の低分子化合物ライブラリーから、グリッドコンピューティングによる分子イメージング法によって、TrkB 細胞外領域に結合して神経芽腫細胞株の増殖を抑制する 7 個の化合物を同定した。

D. 考察

我々と W. Kaelin のグループが独立して同定した 1p36 がん抑制遺伝子である KIF1Bβ は、NGF/TrkA シグナルの最下流分子である

ことが判明していたが、その機能は全く不明であった。今回、KIF1Bβがミトコンドリアの融合とチトクロムc放出を制御する重要な分子であることが明らかになり、そのがん抑制遺伝子としての機能が明確になったことは、アポトーシス誘導の機構のみならず、ミトコンドリア融合の制御がキネシンであるKIF1Bβによって行われていることが判明したことにもなり、細胞生物学上極めて重要な発見となった。

一方、神経芽腫がん遺伝子であるLMO3が交感神経の運命決定に重要な役割を果たしているMash1の転写制御に直接関与していたことは、神経芽腫の発がん機構を考えるうえで極めて重要な発見であった。

また、Shfは、TrkAおよびALKの生存シグナルを調節することによって腫瘍の悪性化を抑制することが示唆され、神経芽腫における治療標的の一つになり得る分子であると考えられた。

さらに、神経芽腫細胞の増殖を抑制するNLRR1に対する単クローン抗体が同定され、TrkBに結合して神経芽腫細胞を死滅させる低分子化合物が複数同定されたことは、難治性神経芽腫の治療薬開発に直接繋がる成果として大いに期待される。

E. 結論

これまでのゲノム情報解析に基づいて見いだした具体的な候補遺伝子の機能が次々に明らかになってきた。また、神経芽腫発がんの分子機構が明らかになると共に、標的分子に対する治療法開発も具体的になり、神経芽腫のトランスレーショナルリサーチが現実のものとなって来た。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. De Katleen P, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M,

Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris JM, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A, Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schulte JH, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. Accurate Outcome Prediction in Neuroblastoma across Independent Data Sets Using a Multigene Signature. *Clin. Cancer Res.* 16:1532-1541, 2010

2. Kojima S, Hyakutake A, Koshikawa N, Nakagawara A, Takenaga K. MCL-1V, a novel mouse antiapoptotic MCL-I variant, generated by RNA splicing at a non-canonical splicing pair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:492-497, 2010
3. Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamijo T. Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene* 29:2681-2690, 2010
4. Yamada C, Ozaki T, Ando K, Suenaga Y, Inoue K, Ito Y, Okoshi R, Kageyama H, Kimura H, Miyazaki M, Nakagawara A. RUNX3 modulates DNA damage-mediated phosphorylation of tumor suppressor p53 at Ser-15 and acts as a Co-activator for p53. *J. Biol. Chem.* 285:16693-16703, 2010
5. Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A. LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392:252-257, 2010
6. Arai Y, Honda S, Haruta M, Kasai F, Fujiwara Y, Ohshima J, Sasaki F, Nakagawara A, Horie H, Yamaoka H, Hiyama E, Kaneko Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and

- MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 49:596-609, 2010.
7. Bu Y, Suenaga Y, Okoshi R, Sang M, Kubo N, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. NFBD1/MDC1 participates in the regulation of G2/M transition in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397:157-162, 2010.
 8. Iwata S, Takenobu H, Kageyama H, Koseki H, Ishii T, Nakazawa A, Tatezaki S, Nakagawara A, Kamijo T. Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma. *Cancer Sci.* 101:1646-1652, 2010.
 9. Shi Y, Takenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Jiang LL, Kamijo T. HDIM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer.* 46:2324-2334, 2010
 10. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeek J, Van Maerken T, De Paepe A, Laureys G, Schulte JH, Schramm A, Van Den Broecke C, Vermeulen J, Van Roy N, Beiske K, Renard M, Noguera R, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Kogner P, Martinsson T, Nakagawara A, Ohira M, Caron H, Eggert A, Cools J, Versteeg R, Speleman F. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin. Cancer Res.* 16:4353-4362, 2010
 11. Ohira M, Nakagawara A. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. *Cancer Sci.* 101:2295-2301, 2010
 12. Kubo N, Okoshi R, Nakashima K, Shimozato O, Nakagawara A, Ozaki T. MDM2 promotes the proteasomal degradation of p73 through the interaction with Itch in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403:405-411, 2010.
 13. Hishiki T, Saito T, Terui K, Sato Y, Takenouchi A, Yahata E, Ono S, Nakagawara A, Kamijo T, Nakamura Y, Matsunaga T, Yoshida H. Reevaluation of trkA expression as a biological marker of neuroblastoma by high-sensitivity expression analysis--a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute. *J. Pediatr. Surg.* 2010 45:2293-2298, 2010.
 14. Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Masumoto K, Ohira M, Nakagawara A, Taguchi T. Concordance for neuroblastoma in monozygotic twins: Case report and review of the literature. *J. Pediatr. Surg.* 45:2312-2316, 2010.
 15. Rintaro O, Kubo N, Kizaki H, Nakagawara A, Ozaki T. A novel molecular mechanism behind p53-dependent apoptosis in response to energetic stress. *Seikagaku.* 82:1117-1120. Japanese. No abstract available. 2010
 16. Ozaki T, Kubo N, Nakagawara A. p73-binding partners and their functional significance. *Int. J. Proteomics.* 2010 (Accepted)
 17. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamijo T. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene.* 30:97-105, 2011.
 18. Ryu M, Hamano M, Nakagawara A, Shinoda M, Shimizu H, Miura T, Yoshida I, Nemoto A, Yoshikawa A. The benchmark analysis of gastric, colorectal and rectal cancer pathways: toward

- establishing standardized clinical pathway in the cancer care. *Jpn J Clin Oncol.* 41:2-9. 2011
19. Okoshi R, Kubo N, Nakashima K, Shimozato O, Nakagawara A, Ozaki T. CREB represses p53-dependent transactivation of MDM2 through the complex formation with p53 and contributes to p53-mediated apoptosis in response to glucose deprivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 406:79-84. 2011
 20. Zhang L, Haraguchi S, Koda T, Hashimoto K, Nakagawara A. Muscle atrophy and motor neuron degeneration in human NEDL1 transgenic mice. *J Biomed. Biotechnol.* 2011 (Accepted)
 21. Iwama E, Tsuchimoto D, Iyama T, Sakumi K, Nakagawara A, Takayama K, Nakanishi Y, Nakabeppu Y. Cancer-related PRUNE2 protein is associated with nucleotides and is highly expressed in mature nerve tissues. *J. Mol. Neurosci.* 2011 (Accepted)
 22. Ozaki T, Nakagawara A. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (Accepted)
 23. Kimura M, Takenobu H, Akita N, Nakazawa A, Ochiai H, Shimozato O, Fujimura YI, Koseki H, Yoshino I, Kimura H, Nakagawara A, Kamijo T. Bmi1 regulates cell fate via tumor suppressor WWOX repression in small cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 2011 (Accepted)
 24. Kawahara N, Sugimura H, Nakagawara A, Masui T, Miyake J, Akiyama M, Wahid IA, Hao X, Akaza H. The 6th Asia Cancer Forum: What Should We Do to Place Cancer on the Global Health Agenda? Sharing Information Leads to Human Security. *Jpn J Clin Oncol.* 2011 (Accepted)
 25. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers* (Accepted)
 26. Takahashi A, Tokita H, Takahashi K, Takeoka T, Murayama K, Tomotsune D, Ohira M, Iwamatsu A, Ohara K, Yazaki K, Koda T, Nakagawara A, Tani K. A novel potent tumour promoter aberrantly overexpressed in most human cancers. *Scientific Reports* (Accepted)
 27. Isogai E, Ohira M, Ozaki T, Oba S, Nakamura Y, Nakagawara A. Oncogenic LMO3 collaborates with HEN2 to enhance neuroblastoma cell growth through transactivation of Mash1. *PLoS ONE* (Accepted)
- 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）
平成22年度分担研究報告書

神経芽腫におけるがん幹細胞の同定に向けた基盤研究とその臨床応用

分担研究者 上條岳彦 千葉県がんセンター研究所 発がん制御研究部長

研究要旨

神経芽腫におけるがん幹細胞を規定するマーカーは未だに知られておらず、無血清・bFGF/EGF培地でのNeurosphere細胞が非常に少数でのマウス移植腫瘍形成を行うTumor Initiating Cellsをもたらすことが知られている (Hansford et al., Cancer Res. 2007)。そこでこの神経芽腫Neurosphere細胞での未分化性および分化関連分子の発現を解析した。この中で、多くのがんにおけるがん幹細胞マーカーCD133がSphere形成によって転写レベルで発現が増加することを見出した。さらに、CD133発現は神経芽腫細胞のNeurosphere形成を促進した (Takenobu H et al., ONCOGENE, 2011)。さらに軟寒天培地におけるコロニー形成能から、CD133のC末細胞内ドメインが腫瘍形成能に深く関わる知見が得られた。

A. 研究目的

がん幹細胞は1. 自己複製、2. 分化能、3. 高い造腫瘍能、4. 薬剤耐性などの性質を持ち、がん幹細胞の存在が再発に深く関わっていると考えられている。神経系腫瘍（脳腫瘍、神経芽腫）でもこの再発は臨床上的大きな問題であり、小児の代表的な固形腫瘍である神経芽腫での5年生存率はStage III, IVの進行例では30～50%と未だに小児腫瘍としては難治であり、その主因は再発にある。

神経系腫瘍（脳腫瘍、神経芽腫）におけるNeurosphere形成とはがん細胞の初代培養を無血清DMEM:F12 (1:1) 培地にEGF, FGFなどを添加した培養系で行うものである。培養細胞は細胞集塊を形成して増殖し、脳腫瘍および神経芽腫の双方で高い腫瘍形成能を示すTumor initiating cells; がん幹細胞を得ることが可能になる。このSphere形成によって自己複製能・分化能・造腫瘍

能が亢進した細胞が得られる分子機構は解明途上であり、神経芽腫でのSphere細胞での特有の表面マーカーも同定されていない。

CD133は5回膜貫通型の膜型タンパク質であり、従来そのシグナル系における昨日は明らかにされていなかった。近年CD133が脳腫瘍、白血病、大腸がん、肝臓がん、すい臓がんなどの多くのがんでがん幹細胞マーカーとして同定されたが、がん幹細胞における機能は同定されていない。

我々は神経芽腫におけるCD133の発現を多くの細胞株、Neurosphereで認めたことから、CD133のがん幹細胞性における機能解析を本研究で行い、明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 神経芽腫細胞株に対する遺伝子導入: CD133遺伝子導入はレンチウイルスベクター系CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsdを用いて行った。

2. 神経芽腫細胞株における遺伝子ノックダウン：神経芽腫細胞株において、CD133遺伝子のノックダウンをMISSION™ shRNA Plasmid DNA (NM_005180 B lymphoma Mo-M LV insertion region: Bmi1)を用いて行った。

3. 神経芽腫細胞におけるNeurosphereアッセイ：初代培養神経芽腫細胞および細胞株をDMEM / F12 (1:1); F12 supplement (1 x, Gibco); EGF (20 ng/ml, Sigma); bFGF (20 ng/ml, Sigma)を用いて培養する。

4. CD133による分化阻害の分子機構の検討：細胞内シグナル系の活性化を検索し、この結果をシグナル阻害剤で検証する。

(倫理面への配慮)

本研究計画は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が定めるB群試料等に相当する腫瘍組織を用いるため、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」(科学技術会議生命倫理委員会)を十分に理解し、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省共同告示第1号)(平成16年12月28日全部改正)(平成17年6月29日一部改正)」を遵守して実施する。千葉県がんセンター倫理審査委員会において課題番号18-13として承認を受けている。

動物実験は動物委員会の定める動物実験倫理規定に従って、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をとまなう実験への十分な配慮のもとに、慎重に進めている。

C. 研究結果

CD133の機能解析のため、shRNAを用いたCD133の発現抑制を行うと、刺激非依存的に

分化促進のマーカである神経突起の形成；分化マーカーGAP43/NF68の増加が観察された。これらの細胞を用いて、神経の分化に関与する栄養因子およびその受容体の発現量を調べたところ、CD133の発現量の上昇に伴って受容体RETのmRNA発現量が低下した。そこで、CD133を高発現した細胞にRETのcDNAを導入したところ、刺激依存的な分化能の回復が見られた。さらに、CD133を高発現した細胞において、RETプロモーター領域の転写活性の有意な低下が見られた。さらにシグナル系としてAKT/PI3K, p38MAPK経路の活性化がCD133発現細胞で認められ、PI3K阻害剤、p38MAPKK阻害剤で抑制されたことから、これらの経路が重要であることを明らかにした。さらに、がん幹細胞マーカーCD133の発現がSphere形成で亢進すること、CD133発現がSphere形成を促進していることを見出した(Takenobu H et al., *ONCOGENE*, 2011)。

また、CD133分子のC末欠損変異体を用いた軟寒天培地におけるコロニー形成能から、CD133のC末細胞内ドメインが神経芽腫腫瘍形成能に深く関わる知見が得られた(未発表データ)。

D. 考察

今後はCD133 C末細胞内ドメインに存在するチロシンの重要性を、点変異体を作成し、軟寒天培地におけるコロニー形成能などでさらに検討したい。また、Neurosphere細胞での細胞階層性を明らかにすべく、機能スクリーニングを試みる。

E. 結論

脳腫瘍、白血病、大腸がん、肝臓がん、

すい臓がんなどの多くのがんでがん幹細胞マーカーとして同定されたCD133のがん幹細胞における機能を解析した。神経芽腫細胞ではCD133は分化抑制能を示し、Neuro-sphere形成を促進することを見出した。さらにこの機能においてシグナル系としてAKT/PI3K, p38MAPK経路が重要であることを明らかにした。

F. 健康危険情報 (特記なし)

G. 研究発表

1. 論文発表(2010年度)

1. Kimura M, Takenobu H, Akita N, Nakazawa A, Ochiai H, Shimozato O, Fujimura Y, Koseki H, Yoshino I, Kimura H, Nakagawara A, Kamijo T

(corresponding author)

Bmi1 regulates cell fate via tumor suppressor WWOX repression in small cell lung cancer cells.

Cancer Sci. 2011, In press

2. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author)

CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification

ONCOGENE, 2011 Jan 6;30(1):97-105.

3. Li X, Isono K, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Koseki YM, Otte AP, Casanova M, Kitamura M, Kamijo T, Sharif J, Ohara O, Toyada T, Bernstein

BE, Brockdorff N and Koseki H
Mammalian Polycomblike Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes.

Mol Cell Biol. 2011 Jan;31(2):351-64.

4. Hishiki T, Saito T, Terui K, Sato Y, Takenouchi A, Yahata E, Ono S, Nakagawara A, Kamijo T, Nakamura Y, Matsunaga T, Yoshida H. Reevaluation of

trkA expression as a biological marker of neuroblastoma by high-sensitivity expression analysis—a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute.

J Pediatr Surg. 2010 Dec;45(12):2293-8.

5. Shi Y, Takenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Jiang LL, Kamijo T (corresponding author)

HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma

European J of Cancer, 2010

Aug;46(12):2324-34.

6. Iwata S, Takenobu H, Kageyama H, Koseki H, Ishii T, Nakazawa A, Tatezaki SI, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author).

Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma.

Cancer Sci. 2010 Jul;101(7):1646-52.

7. Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura K, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamijo T

(corresponding author). Bmi1 is a MYCN target gene and regulates tumorigenesis via repression of KIF1B β and TSLC1 in neuroblastoma.

ONCOGENE, 2010 May 6;29(18):2681-90.

2. 書籍

1. 上條岳彦、中村洋子、大平美紀、中川原章 「がん組織バンクとその応用研究」千葉県がんセンター／監修、癌診療ハンドブック改訂第2版、永井書店、

130-132頁、2010

2. 上條岳彦、青山敏文「VLCAD欠損症」総編集 五十嵐隆 専門編集 高柳正樹、小児科診療ピクシス 2 3 見逃せない先天代謝