

201118019A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 中川原 章

平成24(2012)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23年度 総括研究報告書

研究代表者 中川原 章

平成24(2012)年3月

# 目 次

<b>I. 総括研究報告</b>	
難治性神経芽腫の発がん和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
<b>II. 分担研究報告</b>	
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	----- 7
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	----- 11
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	----- 15
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	----- 19
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	----- 23
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	----- 25
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷</b>	----- 31

# 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して、新薬開発へ展開することを目的として、本年度は以下の知見を得た。(1) 1番染色体短腕 1p36.2 にマップされる RUNX3 は、MYCN 蛋白質と結合してプロテアゾーム依存的にその分解を促進し、MYCN の安定化に寄与した。さらに、MYCN のアンチセンス遺伝子である NCYM が蛋白質に翻訳され、MYCN 蛋白質の安定化に寄与していることを明らかにした。また、MYCN と NCYM のダブルトランスジェニックマウスを作製し、新たな神経芽腫マウスモデルを創出した。さらに、新規膜蛋白質 NLRR1 が ALK の機能を負に制御することを明らかにした。(2) *in silico screening* により見いだした7個の TrkB 阻害剤候補は、マウスにおいて毒性を認めず、新薬開発への期待が持てた。(3) 神経芽腫 I-type 細胞を iPS 化することができ、発がんトリプログラミングの関連を解析するツールができた。(4) 神経芽腫幹細胞において、CD133 による sphere 形成の促進、さらに、増腫瘍性における CD133 C 末細胞内ドメインを明らかにした。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 を見だし、KO マウスを作製した。

### 研究分担者

上條岳彦・千葉県がんセンター・部長  
大平美紀・千葉県がんセンター・室長  
岩間厚志・千葉大学医学部・教授  
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

最近の治癒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 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ースウェイを標的とする治療法の開発を試みる。また、新薬の開発にも力を入れる。

#### B. 研究方法

細胞レベルにおける各種遺伝子の機能解析には、標準的な分子生物学的実験手法を用いた。また、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。遺伝子の発現抑制には siRNA を用い、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。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を用いた。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。NCYM トランスジェニックマウスの作製は、TH-NCYM construc を用いて行った。さらに、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に万全の対策を講じ、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

今回はとくに、MYCN, RUNX3, NLRR1, ALK に限って報告する。

RUNX 3 mRNA は進行神経芽腫において発現が有意に低下していた。しかし、MYCN が増幅していても、RUNX3 発現が高い症例には長期生存例が多かったため、RUNX3 と MYCN の機能的関連について解析したところ、RUNX3 は MYCN 蛋白質と結合してプロテアゾーム依存的にその分解を促進した。

また、我々は、MYCN 遺伝子座においてアンチセンスに転写されている NYCM mRNA が蛋白質に翻訳され、MYCN 蛋白質の機能制御に関わっていることを見いだした。MYCN と NYCM は神経芽腫組織において 100% co-amplify しており、両者の mRNA 発現レベルはほぼ完全に相関していた。なお、NYCM 蛋白質はヒト、チンパンジーの霊長類にしか存在せず、マウス等には発現していなかった。また、MYCN/NYCM ダブルトランスジェニックマウスを作製し、現在その解析を行っている。

さらに、NLRR1 は神経芽腫において EGFR お

よび IGFR 受容体からの増殖シグナルを促進し、腫瘍細胞の増殖促進に寄与することを見いだしていた。しかし、今回、NLRR1 は ALK 受容体シグナルを負に制御することを新たに見いだした。現在、その分子機構の解析を行っている。

2) in silico drug screening による新規 TrkB 機能抑制低分子化合物の同定とその解析

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 in silico 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。マウスを用いて in vivo 毒性試験 (経口、静注) を行った結果、いずれの化合物についても有意な毒性は見られなかった。

3) 神経芽腫 I-type 細胞のリプログラミング  
神経芽腫のがん幹細胞様細胞である I-type 細胞をセンダイウイルスを用いてリプログラミング (iPS 化) させ、クローン化した。現在、マウスを用いて奇形腫形成能を検索している。また、I-, N-, S-type 細胞と iPS 化させた sphere 細胞のアレイ CGH、mRNA 発現プロファイル、miRNA 発現プロファイルを解析し、特徴的な遺伝子を抽出した。NYCM がリプログラミングファクターのいくつかを転写誘導していることも明らかにした。

4) 神経芽腫幹細胞性における CD133 の役割とエピジェネティクス変化

神経芽腫細胞の無血清・bFGF/EGF 培地による neurosphere 形成において、CD133 の転写誘導および CD133 による sphere 形成の促進と、増腫瘍性に関与する CD133 C 末細胞内ドメインを明らかにした。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 (H3K4me2/3, H3K27me3, H2AK119ub1, H3K9Ac) を解析中である。また、発がんおよび幹細胞性に関係するポリコム複合体の新規一員として USP7 を見いだした。USP7/HAUSP コンディショナル変異マウス、Ring1B コンディショナル変異、2 重変異 MEF を作製し、細胞老化の亢進を確認した。

### D. 考察

MYCN は神経芽腫における最大の発がんドライ

バー遺伝子であると同時に、治療の標的でもある。しかし、過去 30 年以上 MYCN を直接抑制する方法は開発できなかった。今回、MYCN を安定化する蛋白質として、MYCN のアンチセンス遺伝子である NCYM を同定し、その機能を初めて明らかにしたことは大きな発見であった。このことにより、今後、NCYM を標的にする治療薬が開発できる道が示された。また、MYCN/NCYM ダブルトランスジェニックマウスを作製したが、そこに発生する神経芽腫はよりヒト腫瘍に近いことが推測され、その解析を進める予定である。

1p36.2 にマップされる神経芽腫抑制遺伝子 RUNX3 が MYCN 蛋白質の安定化を制御し、その分解を促進することを見いだした。また、RUNX3 の発現は進行神経芽腫において有意に低下しており、RUNX3 による MYCN 蛋白質の不安定化は臨床的にも極めて重要と思われた。事実、MYCN 増幅症例において RUNX3 発現の高い例は、比較的長期生存しており、このような事実は大変興味深く重要であると思われた。

In silico screening による TrkB 阻害剤の同定は、マウスを用いた毒性試験において毒性が認められなかったことから、新薬開発へ弾みがついた。

さらに、神経芽腫 I-type 細胞を iPS 化できたことは、神経芽腫細胞の plasticity と reprogramming の分子機構を知り、ひいては発がんの機構を明らかにするうえで極めて重要な成果であった。

神経芽腫の自然退縮機構のみならず、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今後期待できる。

## F. 健康危険情報

該当事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.

2. Zhang L, Haraguchi S, Koda T, Hashimoto K, **Nakagawara A.** Muscle atrophy and motor neuron degeneration in human NEDL1 transgenic mice. *J Biomed. Biotechnol.* 2011:831092. 2011
3. 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.* 44: 103-114. 2011
4. 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
5. Ozaki T, **Nakagawara A.** p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J. Biomed. Biotechnol.:* 603925. 2011
6. 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
7. 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.* 102:983-990. 2011
8. 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.* 1:723-729. 2011
9. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers* , 3:994-1013. 2011
  10. 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*,1,15, 06, 2011
  11. 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* 6(5):e19297. 2011
  12. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, Berthold F, Nakagawara A, Ladenstein RL, Iehara T, Matthay KK. Clinical and Biologic Features Predictive of Survival After Relapse of Neuroblastoma: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Project. *J. Clin. Oncol.* 29:3286-3292.2011
  13. Nakajima T, Yasufuku K, Nakagawara A, Kimura H, Yoshino I. Multi-gene mutation analysis of metastatic lymph nodes in non-small cell lung cancer diagnosed by EBUS-TBNA. *Chest.* 140:1319-1324. 2011
  14. Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A. ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer.* 75:66-72. 2012
  15. Kawahara N, Roh JK, Akaza H, Inoue H, Shibuya K, Iwasaki M, Tsuji T, Nishiyama M, Nakagawara A, Watanabe K, Nozaki S, Inoue M, Sugimura H, Miyake J, Li F. The 7th Asia Cancer Forum: from the perspective of human security, how can we collaborate as Asians in order to place cancer on the global health agenda? How can we fill in the gaps that exist among us? *Jpn. J. Clin. Oncol.* 41:825-831.2011
  16. Shih YY, Lee H, Nakagawara A, Juan HF, Jeng YM, Tsay YG, Lin DT, Hsieh FJ, Pan CY, Hsu WM, Liao YF. Nuclear GRP75 Binds Retinoic Acid Receptors to Promote Neuronal Differentiation of Neuroblastoma. *PLoS One.* 6(10):e26236. 2011
  17. Taggart DR, London WB, Schmidt ML, Dubois SG, Monclair TF, Nakagawara A, De Bernardi B, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, Matthay KK. Prognostic Value of the Stage 4S Metastatic Pattern and Tumor Biology in Patients With Metastatic Neuroblastoma Diagnosed Between Birth and 18 Months of Age. *J. Clin. Oncol.* 29:4358-4364. 2011
  18. Ozaki T, Yamada C, Nakagawara A. A novel role of RUNX3 in the regulation of p53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Seikagaku*, 83:751-754. Japanese. No abstract available, 2011
  19. Akter J, Takatori A, Hossain S, Ozaki T, Nakazawa A, Ohira M, Suenaga Y, Nakagawara A. Expression of NLRR3 orphan receptor gene is negatively regulated by MYCN and Miz-1, and its down-regulation is associated with unfavorable outcome in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 17:6681-6692. 2011
  20. Shih YY, Nakagawara A, Lee H, Juan HF, Jeng YM, Lin DT, Yang YL, Tsay YG, Huang MC, Pan CY, Hsu WM, Liao YF. Calreticulin Mediates Nerve Growth Factor-Induced Neuronal Differentiation. *J Mol Neurosci.* 2011 [Epub ahead of print]
  21. Yoshihara Y, Wu D, Kubo N, Sang M, Nakagawara A, Ozaki T. Inhibitory role of E2F-1 in the regulation of tumor suppressor p53 during DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Mar 29. [Epub ahead of print]
  22. 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 Polycomb like 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.* 31:351-364. 2011
23. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, **Kamijo T**, Zhang Y, Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Tomohiko Maehama T, Mori M, and Suzuki A. Regulation of the MDM2-P53 Pathway and Tumor Growth by PICT1/GLTSCR2 via Nucleolar RPL11. *Nat Med.* 17:944-951, 2011
  24. Sharif J, Endoh M, **Koseki H**. Epigenetic memory meets G2/M: to remember or to forget? *Dev Cell.* 20:5-6. 2011
  25. 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. 2011
  26. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, **Koseki H**, Kyba M, **Iwama A**, Osawa M. Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood.* 117:e142-150. 2011
  27. Casanova M, Preissner T, Cerase A, Poot R, Yamada D, Li X, Appanah R, Bezstarosti K, Demmers J, **Koseki H**, Brockdorff N. Polycomblike 2 facilitates the recruitment of PRC2 Polycomb group complexes to the inactive X chromosome and to target loci in embryonic stem cells. *Development.* 138:1471-1482. 2011
  28. Hojyo S, Fukada T, Shimoda S, Ohashi W, Bin BH, **Koseki H**, Hirano T. The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth. *PLoS One.* 6:e18059. 2011
  29. Sharif J, **Koseki H**. Recruitment of Dnmt1 roles of the SRA protein Np95 (Uhrf1) and other factors. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 101:289-310 . Review. 2011
  30. Nishida K, Yamasaki S, Hasegawa A, Iwamatsu A, **Koseki H**, Hirano T. Gab2, via PI-3K, regulates ARF1 in Fc  $\epsilon$  RI-mediated granule translocation and mast cell degranulation. *J Immunol.* 187(2):932-941, 2011
  31. Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, **Koseki H**, **Iwama A**. The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. *Blood.* 118(9):2443-2453. 2011
  32. Takada Y, Naruse C, Costa Y, Shirakawa T, Tachibana M, Sharif J, Kezuka-Shiotani F, Kakiuchi D, Masumoto H, Shinkai Y, Ohbo K, Peters AH, Turner JM, Asano M, **Koseki H**. HP1  $\gamma$  links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice. *Development.* 138(19):4207-4217. 2011
  33. Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, Negishi M, Saraya A, Konuma T, Shinga J, **Koseki H**, **Iwama A**. Dependency on the polycomb gene Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood.* 118(25):6553-6561. 2011
  34. Zhang J, Gao Q, Li P, Liu X, Jia Y, Wu W, Li J, Dong S, **Koseki H**, Wong J. S phase-dependent interaction with DNMT1 dictates the role of UHRF1 but not UHRF2 in DNA methylation maintenance. *Cell Res.* 21(12):1723-1739. 2011
  35. Tan J, Jones M, **Koseki H**, Nakayama M, Muntean AG, Maillard I, Hess JL. CBX8, a polycomb group protein, is essential for MLL-AF9-induced leukemogenesis.

- Cancer Cell*. 20(5):563-575. 2011
36. Hisada K, Sánchez C, Endo TA, Endoh M, Román-Trufero M, Sharif J, **Koseki H**, Vidal M. RYBP represses endogenous retroviruses and preimplantation- and germ line-specific genes in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 32:1139-1149. 2012
  37. T Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, **Koseki H**, Ohara O, Saito T, Taniguchi S, Shultz LD, Ishikawa F. Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood*. 119:2768-2777. 2012
  38. Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Motomura Y, Yasuda T, Satoh R, Yoshida H, Kubo M, Kawamoto H, **Koseki H**, Taniguchi M. Development and function of invariant natural killer T cells producing t(h)2- and t(h)17-cytokines. *PLoS Biol*. 10:e1001255. 2012
  39. Oguro H, Yuan J, Tanaka S, Miyagi S, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Yamazaki S, **Koseki H**, Nakauchi H, **Iwama A**. Lethal myelofibrosis induced by Bmi1-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes. *J Exp Med*. 209:445-454. 2012
  40. Chiba T, Suzuki E, Negishi M, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Tanaka S, Tada M, Kanai F, Imazeki F, **Iwama A**, and Yokosuka O. 3-deazaneplanocin is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2011 doi: 10.1002/ijc.26264. [Epubahead of print].
  41. Yuan J, Takeuchi M, Negishi M, Oguro H, Ichikawa H, and **Iwama A**. Bmi1 is essential for leukemic reprogramming of myeloid progenitor cells. *Leukemia* 25, 1335-1343, 2011.
  42. **Takehiko Kamijo**, Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatric Research*, 2012, In press
- 2.書籍
1. **Takehiko Kamijo**, Neuroblastoma: Role of MYCN/Bmi1 Pathway in Neuroblastoma. *Pediatric Cancer, Volume 1, Neuroblastoma*, Springer Science+Business Media B.V. 2012
- 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

研究分担者 中川原 章 千葉県がんセンター・センター長

**研究要旨** これまでの神経芽腫の網羅的ゲノム解析によって得られた情報に基づき、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) 1番染色体短腕1p36.2にマップされるRUNX3は、MYCN蛋白質と結合してプロテアゾーム依存的にその分解を促進し、MYCNの安定化に寄与した。さらに、MYCNのアンチセンス遺伝子であるNCYMが蛋白質に翻訳され、MYCN蛋白質の安定化に寄与していることを明らかにした。また、MYCNとNCYMのダブルトランスジェニックマウスを作製し、新たな神経芽腫マウスモデルを創出した。(2) 新規膜蛋白質NLRR1がALKの機能を負に制御することを明らかにした。(3) *in silico screening*により見いだした7個のTrkB阻害剤候補は、マウスにおいて毒性を認めず、新薬開発への期待が持てた。(4) 神経芽腫I-type細胞をiPS化することができ、発がんトリプログラミングの関連を解析するツールができた。我々が見いだした遺伝子の上記解析により、神経芽腫発がんに関わる恒常性維持の破綻機構が明らかになりつつある。

### 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, KIF1Bb & RUNX3；2p領域：MYCN, NCYM, ALK；11q領域：TSLC1；17q領域：SVV, ncRANであるが、今回はRUNX3, MYCN, NCYM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：Shf, BMCC1, LM03, 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關与するTrkBを選択し、モデルマウスの作製も試みた。

### B. 研究方法

細胞レベルにおける各種遺伝子の機能解析には、標準的な分子生物学的実験手法を用いた。また、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。遺伝子の発現抑制にはsiRNAを用い、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。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を用いた。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。NCYMトランスジェニックマウスの作製は、TH-NCYM construcを用いて行った。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 RUNX3 の機能解析  
約100例の神経芽腫における RUNX3 mRNA の発現レベルを測定したところ、RUNX3 は進行神経芽腫において発現が有意に低下していた。しかし、興味深いことに、MYCN が増幅していても、RUNX3 発現が高い症例には長期生存例が多かった。そこで、RUNX3 と MYCN の機能的関連について解析したところ、RUNX3 は MYCN 蛋白質と結合してプロテアゾーム依存的にその分解を促進した。したがって、RUNX3 の発現抑制状況にある進行神経芽腫では MYCN がより安定化され、逆に、MYCN が増幅していても RUNX3 発現が高ければ、MYCN 蛋白質レベルは低く維持されていることが示唆された。

(2) MYCN アンチセンス遺伝子 NCYM の機能解析

我々は、MYCN 遺伝子座においてアンチセンスに転写されている NCYM mRNA が従来言われていたような non-coding RNA ではなく、蛋白質に翻訳され、MYCN 蛋白質の機能制御に関わっていることを見いだした。MYCN と NCYM は神経芽腫組織において 100% co-amplify しており、両者の mRNA 発現レベルはほぼ完全に相関していた。興味深いことに、NCYM 蛋白質はヒト、チンパンジーの霊長類にしか存在せず、マウス等には発現していなかった。したがって、これまで作製され世界中で実験に汎用されている MYCN トランスジェニックマウスに発生する神経芽腫は NCYM を共発現せず、ヒト神経芽腫とは異なることが判明した。そこで、我々は MYCN/NCYM ダブルトランスジェニックマウスを作製し、現在その解析を行っている。

(3) 新規オーファン受容体 NLRR1 による ALK 機能の抑制

我々はこれまで、NLRR1 は神経芽腫において

EGFR および IGF1R 受容体からの増殖シグナルを促進し、腫瘍細胞の増殖促進に寄与することを見いだしていた。しかし、今回、NLRR1 は ALK 受容体シグナルを負に制御することを新たに見いだした。現在、その分子機構の解析を行っている。

(4) *in silico* drug screening による新規 TrkB 機能抑制低分子化合物の同定とその解析  
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 *in silico* 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。マウスを用いて *in vivo* 毒性試験(経口、静注)を行った結果、いずれの化合物についても有意な毒性は見られなかった。

(5) 神経芽腫 I-type 細胞のリプログラミング

神経芽腫のがん幹細胞様細胞である I-type 細胞をセンダイウイルスを用いてリプログラミング(iPS化)させ、クローン化した。現在、マウスを用いて奇形腫形成能を検索している。また、I-, N-, S-type 細胞と iPS 化させた sphere 細胞のアレイ CGH、mRNA 発現プロファイル、miRNA 発現プロファイルを解析し、特徴的な遺伝子を抽出した。NCYM がリプログラミングファクターのいくつかを転写誘導していることも明らかにした。

### D. 考察

MYCN が神経芽腫発がんにおける最大のドライバー遺伝子であることは明白であり、その機能が神経芽腫の悪性化と悪性度を決定していると言っても過言ではない。

今回、我々は、1p36.2 にマップされる神経芽腫抑制遺伝子 RUNX3 が MYCN 蛋白質の安定化を制御し、その分解を促進することを見いだした。また、RUNX3 の発現は進行神経芽腫において有意に低下しており、RUNX3 による MYCN 蛋白質の不安定化は臨床的にも極めて重要と思われた。事実、MYCN 増幅症例において RUNX3 発現の高い例は、比較的長期生存しており、このような事実は大変興味深く重要であると思われた。

一方、MYCN のアンチセンス遺伝子である NCYM は、non-coding RNA であると信じられて

いたが、我々はそれは蛋白質にコードされ、ヒトとチンパンジーに限って発現していること明らかにした。しかも、NCYM が MYCN 蛋白質を安定化する機能を有することを見いだしたことは、神経芽腫における MYCN 制御機構を理解するうえで極めて重要な発見であった。また、MYCN/NCYM ダブルトランスジェニックマウスを作製したが、そこに発生する神経芽腫はよりヒト腫瘍に近いことが推測され、その解析を進める予定である。

In silico screening による TrkB 阻害剤の同定は、マウスを用いた毒性試験において毒性が認められなかったことから、新薬開発へ弾みがついた。

さらに、神経芽腫 I-type 細胞を iPS 化できたことは、神経芽腫細胞の plasticity と reprogramming の分子機構を知り、ひいては発がんの機構を明らかにするうえで極めて重要な成果であった。

#### 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さら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による個別化医療への展開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. 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.
2. Zhang L, Haraguchi S, Koda T, Hashimoto K, **Nakagawara A**. Muscle atrophy and motor neuron degeneration in human NEDL1 transgenic mice. *J Biomed. Biotechnol*. 2011:831092. 2011
3. 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*. 44: 103-114. 2011

4. 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
5. Ozaki T, **Nakagawara A**. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J. Biomed. Biotechnol*. 2011: 603925. 2011
6. 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
7. 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*. 102:983-990. 2011
8. 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*. 1:723-729. 2011
9. Ozaki T, **Nakagawara A**. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers* , 3:994-1013. 2011
10. 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*,1,15, 06, 2011
11. 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* 6(5):e19297. 2011
  12. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, Berthold F, **Nakagawara A**, Ladenstein RL, Iehara T, Matthay KK. Clinical and Biologic Features Predictive of Survival After Relapse of Neuroblastoma: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Project. *J. Clin. Oncol.* 29:3286-3292.2011
  13. Nakajima T, Yasufuku K, **Nakagawara A**, Kimura H, Yoshino I. Multi-gene mutation analysis of metastatic lymph nodes in non-small cell lung cancer diagnosed by EBUS-TBNA. *Chest.* 140:1319-1324. 2011
  14. Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, **Nakagawara A**. ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer.* 75:66-72. 2012
  15. Kawahara N, Roh JK, Akaza H, Inoue H, Shibuya K, Iwasaki M, Tsuji T, Nishiyama M, **Nakagawara A**, Watanabe K, Nozaki S, Inoue M, Sugimura H, Miyake J, Li F. The 7th Asia Cancer Forum: from the perspective of human security, how can we collaborate as Asians in order to place cancer on the global health agenda? How can we fill in the gaps that exist among us? *Jpn. J. Clin. Oncol.* 41:825-831.2011
  16. Shih YY, Lee H, **Nakagawara A**, Juan HF, Jeng YM, Tsay YG, Lin DT, Hsieh FJ, Pan CY, Hsu WM, Liao YF. Nuclear GRP75 Binds Retinoic Acid Receptors to Promote Neuronal Differentiation of Neuroblastoma. *PLoS One.* 6(10):e26236. 2011
  17. Taggart DR, London WB, Schmidt ML, Dubois SG, Monclair TF, **Nakagawara A**, De Bernardi B, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, Matthay KK. Prognostic Value of the Stage 4S Metastatic Pattern and Tumor Biology in Patients With Metastatic Neuroblastoma Diagnosed Between Birth and 18 Months of Age. *J. Clin. Oncol.* 29:4358-4364. 2011
  18. Ozaki T, Yamada C, **Nakagawara A**. A novel role of RUNX3 in the regulation of p53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Seikagaku*, 83:751-754. Japanese. No abstract available, 2011
  19. Akter J, Takatori A, Hossain S, Ozaki T, Nakazawa A, Ohira M, Suenaga Y, **Nakagawara A**. Expression of NLRR3 orphan receptor gene is negatively regulated by MYCN and Miz-1, and its down-regulation is associated with unfavorable outcome in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 17:6681-6692. 2011
  20. Shih YY, **Nakagawara A**, Lee H, Juan HF, Jeng YM, Lin DT, Yang YL, Tsay YG, Huang MC, Pan CY, Hsu WM, Liao YF. Calreticulin Mediates Nerve Growth Factor-Induced Neuronal Differentiation. *J Mol Neurosci.* 2011 [Epub ahead of print]
  21. Yoshihara Y, Wu D, Kubo N, Sang M, **Nakagawara A**, Ozaki T. Inhibitory role of E2F-1 in the regulation of tumor suppressor p53 during DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Mar 29. [Epub ahead of print]
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

## 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

研究分担者 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、Neurosphere細胞がTumor Initiating Cellsであることが知られている（Hansford et al., Cancer Res. 2007）。我々は、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、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、CD133のC末細胞内ドメインが、C-Srcによってチロシンリン酸化を受け、腫瘍形成能に深く関わる知見が得られた。現在、胎児脳由来cDNAライブラリーからCD133のC末細胞内ドメインに結合する分子のスクリーニングを行い、いくつかの候補分子を同定している。

### 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な大きな問題であり、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。

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。

我々はこれまでに、神経芽腫におけるCD133の発現を多くの細胞株、Neurosphereで認め、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。

今年度本研究では、CD133のC末細胞内ドメインのチロシンの修飾とそのシグナル伝達系で役割の解析、さらに、CD133のC末細胞内ドメインに結合する分子のスクリーニングを胎児脳由来cDNAライブラリーから行うことを目的とした。

### B. 研究方法

1. 神経芽腫細胞株に対する遺伝子導入および遺伝子ノックダウン：神経芽腫細胞株において、CD133遺伝子の遺伝子導入およびノックダウンはレンチウイルスベクター系を用いて行った。

2. 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)を用いて培養した。

3. CD133による分化阻害の分子機構の解析：CD133による分化阻害の分子を検索し、これを明らかにする。CD133のC末細胞内ドメインのチロシンの修飾とそのシグナル伝達系で役割の解析、さらに神経芽腫細胞の生物学的機能における役割を解析した。さらに、CD133



のC末細胞内ドメインに結合する分子のスクリーニングを、Yeast 2-hybrid 法を用いて胎児脳由来cDNAライブラリーから行った。

#### (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の高発現によって、オーファン受容体であり交感神経細胞の分化に関わる受容体RETのmRNA発現量が低下した。この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。これに関わるシグナル系としてAKT/PI3K, p38MAPK経路の活性化がCD133発現細胞で認められ、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)。

このCD133分子のシグナル伝達活性化を明らかにすべく、CD133分子のC末(細胞内ドメイン)に着目した。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では、コロニー形成能の減少が認められた。さらにこのC末端部分に存在するチロシン残基が、細胞内でリン酸化されることを見出した。このチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体CD133を作成し、軟寒天培地におけるコロニー形成能を検討したところ、コロニ-

ー形成能の減少が認められた。

現在、Yeast 2-hybrid 法を用いて胎児脳由来cDNAライブラリーからCD133のC末細胞内ドメインに結合する分子のスクリーニングを行い、アダプター分子、膜型タンパク質でチロシンリン酸化に関与する分子などを同定している。

### D. 考察

今後は、Yeast 2-hybrid 法によるスクリーニングで得られたCD133 C末細胞内ドメインに結合する候補分子を、細胞内での結合実験で検証していく。またこれらの候補分子がCD133の生物学的な機能をどのように修飾するかを確認する必要があると思われる。

### 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、神経芽腫細胞でCD133が示す分化抑制能、およびNeuro-sphere形成促進の分子機構を検討した。CD133のC末細胞内ドメインが、C-Srcによってチロシンリン酸化を受け、腫瘍形成能に深く関わる知見が得られた。現在、胎児脳由来cDNAライブラリーからCD133のC末細胞内ドメインに結合する分子のスクリーニングを行い、いくつかの候補分子を同定している。

### F. 健康危険情報 (特記なし)

### G. 研究発表

- 論文発表(2011年度)
  1. 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.
  2. 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.
3. 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 May;102(5):983-990.
  4. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, **Kamijo T**, Zhang Y, Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Tomohiko Maehama T, Mori M, and Suzuki A. Regulation of the MDM2-P53 Pathway and Tumor Growth by PICT1/GLTSCR2 via Nucleolar RPL11 *Nat Med.* 2011 Jul 31;17(8):944-51.
  5. **Takehiko Kamijo**, Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatric Research*, 2012, In press
  6. 上條岳彦, 中川原章, 神経芽腫の遺伝子検査、小児科 Vol.52 No.12 小児医療における診断・治療の進歩、2011/11/01発売号
- 2.書籍
1. **Takehiko Kamijo**, Neuroblastoma: Role of MYCN/Bmi1 Pathway in Neuroblastoma. *Pediatric Cancer, Volume 1, Neuroblastoma*, Springer Science+Business Media B.V. 2012
- 3.学会発表
1. Bmi1 regulates cell fate via tumor suppressor WWOX repression in small cell lung cancer cells, Masaki Kimura, Hisanori Takenobu, Nobuhiro Akita, Osamu Shimozato, Hideki Kimura, Akira Nakagawara, and **Takehiko Kamijo** 2011AACR, Late-Breaking Research: Cellular and Molecular Biology 3
  2. MDM2 IMPAIRS NOXA TRANSCRIPTION AND AFFECTS APOPTOTIC CELL DEATH IN A p53/p73-DEPENDENT MANNER IN NEUROBLASTOMA Yun Shi, Hisanori Takenobu1, Kenji Kurata, Yohko Yamaguchi, Kenichi Koike, Akira Nakagawara, and **Takehiko Kamijo** p63/p73 Workshop, Lyon, September 2011
- 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

## 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

研究分担者 大平 美紀 千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室 室長

研究要旨：難治性神経芽腫の新規治療戦略の開発を目指し、神経芽腫細胞株ならびに臨床サンプルを用いた神経芽腫の幹細胞性に関わるゲノム異常やトランスクリプトームなどの分子プロファイルの取得を進めている。本年度は幹細胞様神経芽腫細胞株とその iPC 化細胞についてアレイ CGH 解析と網羅的遺伝子発現解析を行い、これまでに臨床検体から取得した難治性神経芽腫に特徴的な遺伝子発現プロファイルとの関連性を検討した。幹細胞様神経芽腫細胞株で特異的に高発現する遺伝子群には複数の予後不良関連遺伝子群が同定された一方で、iPC 化によりリプログラミングされた細胞では予後良好関連遺伝子群の高発現が見られた。

### A. 研究目的

小児の代表的な腹部固形腫瘍のひとつである神経芽腫の進行例は依然として非常に予後不良であり、新たな治療戦略の構築が緊急の課題となっている。そこで本研究課題では、難治性神経芽腫の分子的背景を幹細胞性の観点から網羅的に解析し、新規治療標的の同定につなげることを目的とする。

具体的には、複数の幹細胞様神経芽腫細胞株の詳細な解析に加え、Neurospere 形成前後、iPC 化前後、幹細胞性制御因子候補の導入前後の網羅的ゲノム変化ならびにトランスクリプトーム解析（mRNA ならびに ncRNA を含む）を行うとともに、臨床経過が治療抵抗性であった臨床サンプル自体との分子プロファイルの比較や、本研究班の成果から得られるエピゲノムデータとの比較を行なうことにより、神経芽腫におけるがん幹細胞性維持などに関与し、治療標的となる可能性のある分子パスウェイの探索を行う。

### B. 研究方法

幹細胞様神経芽腫細胞株：

同一の神経芽腫細胞株から派生し、神経分化タイプ（N-type neuroblastic/neuroendocrine precursors）、Schwannian タイプ（S-type

Schwannian/melanoblastic precursors）、そして N-type、S-type 両方への分化能を有する中間タイプあるいは幹細胞様タイプ（I-type stem cells）と呼ばれる3つの形態的に分離された SK-N-BE ならびに SH-SY5Y 由来のサブライン 2 種類（Ross RA et al, *Cancer Lett.* 197:35-9, 2003）について分子プロファイル比較を行なった。これまでにアレイ CGH 解析と遺伝子発現解析を行ったが、今回は miRNA の発現解析を加えた。

神経芽腫組織の収集と選択：

全国の小児がん治療施設において検査後の残余サンプルの研究使用についての文書による説明と同意取得ののち、千葉県がんセンター神経芽腫組織バンクに保管された腫瘍検体 48 例（予後良好群：19 例、予後不良群：13 例、中間予後群：16 例）を対象とした。

アレイ CGH によるゲノム変化プロファイルの解析：

500ng のゲノム DNA を対象とし、直接標識法により DNA を蛍光標識し、ヒトオリゴアレイ（アジレント社 Whole Human Genome oligo DNA microarray, 244K フォーマット）を用いてゲノムコピー数異常解析を行った。対照コントロールには

ヒト胎盤由来 DNA500ng を全例について用いた。ハイブリダイゼーション後の数値化とマッピングは Feature Extraction、Genomic Workbench CGH Module を用いた。

#### 遺伝子発現解析：

神経芽腫細胞株ならびに神経芽腫の凍結腫瘍組織から small RNA 分画を含む total RNA を調製し、そのうち 5 $\mu$ g を用いて蛍光標識を行い、自家製小児がん特化型 DNA チップならびに汎用遺伝子発現解析用 DNA チップ（アジレント社 Whole Human oligo DNA microarray、4x44K フォーマット）へのハイブリダイゼーションを行った。マイクロ RNA 発現レベルの解析には miRNA 解析用マイクロアレイ（アジレントテクノロジー社、8x15K フォーマット）を用いて既知の miRNA の発現レベルを網羅的に解析した。神経芽腫細胞株については N-type と I-type の比較を、腫瘍組織由来 RNA の解析には進行例と予後良好例についてそれぞれ発現パターンを比較検討した。

#### （倫理面への配慮）

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、関連法規を遵守し、倫理委員会ならびに実施機関長の承認を経た上で、検体提供者の人権の擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

### C. 研究結果

神経芽腫がん幹細胞の分離・同定と新規マーカーの発見を目的とした基礎データの取得：

#### 1. ゲノムコピー数異常解析：

同一の神経芽腫細胞株から派生した神経分化タイプ (N-type)、Schwannian タイプ (S-type)、中間タイプ (I-type : N-type、S-type 両方への分化能を有する) の 3 つの形態的に分離されたサブライン 2 種類について取得したアレイ CGH 解析の結果では、SK-N-BE 株、SH-SY5Y 株それぞれで N-type から I-type で加わったゲノム異常が 1p の欠失、2p の欠失およ

び増加など各染色体に散見され、獲得されたゲノム異常のパターンが両細胞株の I-type で共通しておらず、散発的であった。このことは、臨床検体のゲノム異常解析において、初発時検体におけるゲノム異常に再発・転移部位で加わったゲノム異常のプロファイルが散在的であることと似通っている。本細胞株における形態の変化はゲノム異常獲得の効果よりも、遺伝子発現の変化によるものが大きいと考えられる。

#### 2. mRNA 発現解析：

mRNA 発現データからは、N-type 特異的遺伝子群、I-type 特異的遺伝子群など特徴的な遺伝子候補が合計 36 種類同定された。I-type 細胞株において特に高発現が見られた遺伝子群には、神経増殖関連転写因子群、転写因子複合体の構成要素であるアダプタータンパク質、MAP キナーゼ群などが候補として含まれており、これらのプロファイルが I-type 細胞株の強い増殖性に強く関連していることが予想された。これらの遺伝子群のいくつかは進行神経芽腫において高発現していることが報告されている。そこで本年度は、予後不良群 (16 例)、予後良好群 (16 例) の神経芽腫臨床検体を用いて、実際に予後の異なる臨床検体間で発現レベルに差があるかの検証を多検体 RT-PCR にて行った。予想に反して、N, I に特異的な発現プロファイルを示す遺伝子群はプライマリー腫瘍の予後との強い相関を示す遺伝子のごく一部であった。今後これらの検証には初発時腫瘍と再発時腫瘍での比較を行うこととした。

#### 3. miRNA 発現解析：

これまでに複数のグループから予後の異なる神経芽腫の間で発現レベルが有意に異なる遺伝子群の報告がなされている。これらは予後診断マーカーとして検証が進められているが、難治性神経芽腫の幹細胞性の維持に関与する遺伝子群の同定は未だ進んではいない。本研究ではまず基礎的データとして、近年癌関連遺伝子