

201220004A

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24年度 総括研究報告書

研究代表者 中川原 章

平成25(2013)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24年度 総括研究報告書

研究代表者 中川原 章

平成25(2013)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 ----- 13

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 ----- 17

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 ----- 21

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 ----- 25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 33

I . 総括研究報告書

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24年度 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、本年度は以下の知見を得た。(1) MYCN の *cis*-antisense large non-coding RNA である NCYM が実は蛋白質に翻訳され、*de novo* evolved gene product であることを明らかにした。MYCN と NCYM のダブルトランスジェニックマウスに発生した神経芽腫は強い転移性を有し、よりヒト神経芽腫に近いマウスモデルを創出した。(2) 治療用抗体の候補として、新規膜蛋白質 NLRR1 に対する増殖抑制性単クローン抗体を作製した。(3) *in silico* screening により見いだした TrkB 阻害剤候補低分子化合物は、*in vivo* で抗腫瘍効果を示し、さらに新薬開発へ近づいた。(4) 幹細胞様神経芽腫細胞株を iPC 化し遺伝子プロファイルを解析したところ、難治性神経芽腫に特徴的な遺伝子発現の低下、ならびに予後良好マーカーの上昇が見られた。(5) 神経芽腫がん幹細胞マーカー CD133 が転写因子 CDX1 によって直接誘導されることを見出した。(6) MBLR/Pcgf6 コンディショナル欠損 ES 細胞を作成し、USP7/HAUSP は PRC1 と MBLR 複合体に共有の触媒分子である Ring1 機能の制御をすることが示された。

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
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
岩間厚志・千葉大学医学部・教授

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が、平成22～24年度は、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新たな神経芽腫発がん誘発系の開発、神経芽腫発がんのエピジェネティックな分子制御機構の解明、さらには、新薬の開発を実現化することを目的とした。

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 construct 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。NLRR1 の解析はノックアウトマウスを作製し、治療用抗体の探索には細胞外ドメインを標的とした単クローン抗体を作製した。さらに、統計解析には、student's t-test, Logrank test, Cox regression analysis を用いた。網羅的遺伝子発現解析には、自家製小児がん由来遺伝子特化型 DNA チップと市販遺伝子発現解析用 DNA チップ（アジレント社 Whole Human oligo DNA microarray, 4x44K フォーマット）を用いた。

（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) NCYM, a *de novo* evolved gene product : 当初 large non-coding RNA と考えられていた MYCN のシス・アンチセンス遺伝子である NCYM は *de novo* evolved gene であり、

ヒトとチンパンジーへの進化に伴って新しくでき、蛋白質をコードする遺伝子であることを明らかにした。NCYM 発現は予後の悪さと相関した。また、NCYM 蛋白質は GSK3b と結合し、MYCN の安定化を促進した。さらに、NCYM-Tg マウスでは腫瘍形成は無いものの、MYCN-Tg/NCYM-Tg マウスでは、明らかに神経芽腫の転移促進と抗がん剤抵抗性獲得を示した。したがって、NCYM はヒト神経芽腫特異的に発がんを促進し、MYCN-Tg/NCYM-Tg マウスに発生する神経芽腫がよりヒトに近いモデルマウスと思われた。

2) NLRR1 の解析と治療用抗体の開発 :

MYCN の転写標的である NLRR1 は、がん細胞膜の lipid raft を介して、増殖シグナルを送るチロシンキナーゼ受容体のみを選択的に活性化した。事実、NLRR1 KO マウスは成長抑制を示した。また、同定した抗腫瘍性抗 NLRR1 単クローン抗体のエピトープマッピングにより結合部位を確定した。

3) 抗腫瘍性低分子化合物の同定 :

300 万個の低分子化合物ライブラリーから *in silico* screening によって7個のTrkB阻害剤、8個のALK/ShcC阻害薬候補を同定し、解析を行なった。前者は、ヒト神経芽腫移植マウスにおいても抗腫瘍効果を示した。また、ポリコーム阻害剤の抗腫瘍剤としての有用性が示された。

4) 神経芽腫幹細胞性とリプログラミング機構の解析

幹細胞様神経芽腫細胞株を iPC 化し、遺伝子プロファイルを解析したところ、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の低下、ならびに予後良好マーカーの上昇が顕著に見られた。次世代シーケンシングにより一遺伝子についてヘテロな SNV を見いだした。また、がん幹細胞マーカーCD133 が転写因子 CDX1 によって直接誘導されることを見出した。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行い、PTPRKを同定した。また、MBLR/Pcgf6コンディショナル欠損ES細胞を作成し、Ink4a、p53、MDM2経路において、クロマチン結合に依存しない経路にUSP7/HAUSPが寄与し、USP7/HAUSPはPRC1とMBLR複合体に共有の触媒分子であるRing1機能の制御をすることが示された。

D. 考察

進行神経芽腫において、MYCNと100%共増幅している遺伝子の探索が過去約30年にわたって行なわれて来たが不明であった。しかし、それがNCYMであったことが我々の研究から明らかになったことになる。つまり、NCYMはnon-coding RNAではなく、蛋白質に翻訳されており、GSK3bを介してMYCNを安定化していることを明らかにした。また、NCYM蛋白質はヒトとチンパンジーにしか保存されておらず、いわゆるde novo evolved proteinであることを証明した。また、NCYMはマウスには存在しないため、ヒト神経芽腫と転移形態に関して類似しているNCYM/MYCN double transgenic miceが抗がん剤スクリーニングにより適していることを明らかにした。

神経芽腫に対する新規抗がん剤開発に関しては、NLRR1に対する治療用単クローン抗体の開発に成功した。今回、エピトープマッピングにも成功し、結合部位を明らかにすることができた。さらに、TrkBに対する治療用低分子化合物の作用機序およびin vivoでの抗腫瘍効果も有意に出、創薬へ向けた基盤固めが進んだ。

一方、神経芽腫の発がんおよび幹細胞性に関する研究においては、I-type神経芽腫細胞をiPS化することに成功し、網羅的な発現解析を行なうことができた。このリプログラミングにより、神経芽腫の一連の予後良好マーカーの発現が上昇していたことは、リプログラミングががん細胞の脱分化状態を分化へ誘導することを示唆しており、

大変興味深い知見であった。

さらに、神経芽腫のがん幹細胞マーカーであるCD133の転写誘導因子がCDX1であることが明らかになり、その制御機構から新たな治療薬開発の標的探索がより現実味を帯びて来た。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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.* 2421:57-63. 2012
3. Kamijo T (corresponding author), Nakagawara A. Molecular and genetic bases of neuroblastoma. *Int. J. Clin. Oncol.* 17:190-195. 2012
4. Hossain S, Takatori A, Nakamura Y, Suenaga Y, Kamijo T, Nakagawara A. NLRR1 Enhances EGF-Mediated MYCN Induction in Neuroblastoma and Accelerates Tumor Growth In Vivo. *Cancer Res.* 72:4587-4596. 2012
5. Tonini GP, Nakagawara A, Berthold F. Towards a turning point of neuroblastoma therapy. *Cancer Lett.* 326:128-134. 2012
6. Schleiermacher G, Mosseri V, London WB, Maris JM, Brodeur GM, Attiyeh E,

- Haber M, Khan J, Nakagawara A, Speleman F, Noguera R, Tonini GP, Fischer M, Ambros I, Monclair T, Matthay KK, Ambros P, Cohn SL, Pearson AD. Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Br J Cancer*. 107:1418-1422. 2012
7. Shum CK, Lau ST, Tsoi LL, Chan LK, Yam JW, Ohira M, Nakagawara A, Tam PK, Ngan ES. Krüppel-like factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage differentiation. *Oncogene*. 2012 Oct 8. doi: 10.1038/onc.2012.437. [Epub ahead of print]
 8. Chand D, Yamazaki Y, Ruuth K, Schönherr C, Martinsson T, Kogner P, Attiyeh EF, Maris J, Morozova O, Marra MA, Ohira M, Nakagawara A, Sandström PE, Palmer R, Hallberg B. Cell culture and Drosophila model systems define three classes of anaplastic lymphoma kinase mutations in neuroblastoma. *Dis Model Mech*. 6:373-382, 2013
 9. Nozato M, Kaneko S, Nakagawara A, Komuro H. Epithelial-mesenchymal transition-related gene expression as a new prognostic marker for neuroblastoma. *Int J Oncol*. 42:134-140. 2013
 10. Wu D, Ozaki T, Yoshihara Y, Kubo N, Nakagawara A. Runt-related Transcription Factor 1 (RUNX1) Stimulates Tumor Suppressor p53 in Response to DNA Damage Through Complex Formation and Acetylation. *J Biol Chem*. 288:1353-1364. 2013
 11. Kubo N, Wu D, Yoshihara Y, Sang M, Nakagawara A, Ozaki T. Co-chaperon DnaJC7/TPR2 enhances p53 stability and activity through blocking the complex formation between p53 and MDM2. *Biochem Biophys Res Commun*. 430: 1034-1039. 2013
 12. Sugimoto T, Gotoh T, Yagyu S, Kuroda H, Iehara T, Hosoi H, Ohta S, Ohira M, Nakagawara A. A MYCN-amplified cell line derived from a long-term event-free survivor among our sixteen established neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett*. 331:115-121, 2013
 13. Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, Ohira M, Kamijo T, Kondo S, Fujii Y, Nakagawara A. Shf, a novel adaptor protein, interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 2013 Jan 30. doi: 10.1111/cas.12115. [Epub ahead of print] PMID: 23360421 [PubMed - as supplied by publisher] Related citations
 14. Yamaki T, Suenaga Y, Iuchi T, Alagu J, Takatori A, Itami M, Araki A, Ohira M, Inoue M, Kageyama H, Yokoi S, Saeki N, Nakagawara A. Temozolomide suppresses MYC via activation of TAp63 to inhibit progression of human glioblastoma. *Sci Rep*. 2013;3:1160. doi: 10.1038/srep01160. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23362460 [PubMed - in process] Free PMC Article Related citations
 15. Kamijo T(corresponding author). Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatric Res*. 2012 Apr;71(4 Pt 2):511-5. doi: 10.1038/pr.2011.54. Epub 2012 Feb 1. PMID:22430387
 16. Oonishi K, Cui X, Hirakawa H, Fujimori A, Kamijo T, Yamada S, Yokosuka O, Kamada T. Different effects of carbon ion beams and X-rays on clonogenic survival

- and DNA repair in human pancreatic cancer stem-like cells. *Radiother Oncol.* 2012 Sep 24. doi:pii: S0167-8140(12)00360-X. 10.1016/j.radonc.2012.08.009.
17. Hashizume O, Shimizu A, Yokota M, Sugiyama A, Nakada K, Miyoshi H, Itami M, Ohira M, Nagase H, Takenaga K, Hayashi J. Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(26):10528-33, 2012.
 18. Hisada K, Sanchez C, Endo TA, Endoh M, Roman-Trufero M, Sharif J, Koseki H, Vidal M. (2012) RYBP represses endogenous retroviruses and preimplantation- and germ line-specific genes in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 32(6):1139-49
 19. 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. (2012) Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood.* 119(12):2768-77
 20. Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Motomura Y, Yasuda T, Satoh R, Yoshida H, Kubo M, Kawamoto H, Koseki H, Taniguchi M. (2012) Development and function of invariant natural killer T cells producing t(h)2- and t(h)17-cytokines. *PLoS Biol.* 10(2):e1001255
 21. Oguro H, Yuan J, Tanaka S, Miyagi S, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Yamazaki S, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. (2012) Lethal myelofibrosis induced by Bmi1-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes. *J Exp Med.* 209(3):445-54
 22. Shinoda K, Tokoyoda K, Hanazawa A, Hayashizaki K, Zehentmeier S, Hosokawa H, Iwamura C, Koseki H, Tumes DJ, Radbruch A, Nakayama T. (2012) Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(19):7409-14
 23. Lapthanasupkul P, Feng J, Mantesso A, Takada-Horisawa Y, Vidal M, Koseki H, Wang L, An Z, Miletich I, Sharpe PT. (2012) Ring1a/b polycomb proteins regulate the mesenchymal stem cell niche in continuously growing incisors. *Dev Biol.* 367(2):140-53
 24. Watarai H, Yamada D, Fujii S, Taniguchi M, Koseki H. (2012) Induced pluripotency as a potential path towards iNKT cell-mediated cancer immunotherapy. *Int J Hematol.* 95(6):624-31
 25. Nakamura S, Oshima M, Yuan J, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Yamazaki S, Osawa M, Nakauchi H, Koseki H, Iwama A. (2012) Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. *PLoS One.* 7(5):e36209
 26. Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, Koseki H, Iwama A. (2012) Ezh2 augments leukemogenesis by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. *Blood.* 120(5):1107-17
 27. Visconte V, Rogers HJ, Singh J, Barnard J, Bupathi M, Traina F, McMahon J, Makishima H, Szpurka H, Jankowska A, Jerez A, Sekeres MA, Sauntharajah Y, Advani AS, Copelan E, Koseki H, Isono K, Padgett RA, Osman S, Koide K, O'Keefe C, Maciejewski JP, Tiu RV. (2012) SF3B1

- haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 120(16):3173-86
28. Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T, Eskeland R, Bickmore WA, Vidal M, Bernstein BE, Koseki H. (2012) Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity. *PLoS Genet*. 8(7):e1002774
 29. Onoguchi M, Hirabayashi Y, Koseki H, Gotoh Y. (2012) A noncoding RNA regulates the neurogenin1 gene locus during mouse neocortical development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(42):16939-44
 30. Ku M, Jaffe JD, Koche RP, Rheinbay E, Endoh M, Koseki H, Carr SA, Bernstein BE. (2012) H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions. *Genome Biol*. 13(10):R85
 31. Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. (2013) Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*. 121(3):447-58
 32. Farcas AM, Blackledge NP, Sudbery I, Long HK, McGouran JF, Rose NR, Lee S, Sims D, Cerase A, Sheahan TW, Koseki H, Brockdorff N, Ponting CP, Kessler BM, Klose RJ. (2012) KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *elife*. :e00205
 33. Nishimura T, Kaneko S, Kawana-Tachikawa A, Tajima Y, Goto H, Zhu D, Nakayama-Hosoya K, Iriguchi S, Uemura Y, Shimizu T, Takayama N, Yamada D, Nishimura K, Ohtaka M, Watanabe N, Takahashi S, Iwamoto A, Koseki H, Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H. (2013) Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 12(1):114-26
 34. Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S, Koseki H, Kawamoto H. (2013) Regeneration of Human Tumor Antigen-Specific T Cells from iPSCs Derived from Mature CD8(+) T Cells. *Cell Stem Cell*. 12(1):31-6
 35. Sharif J, Shinkai Y, Koseki H. (2013) Is there a role for endogenous retroviruses to mediate long-term adaptive phenotypic response upon environmental inputs? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 368(1609) Review
 36. Koseki H. (2012) An interview with Haruhiko Koseki. Interviewed by Eva Amsen. *Development*. 139:3469-70
 37. Shide K, Kameda T, Shimoda H, Yamaji T, Abe H, Kamiunten A, Sekine M, Hidaka T, Katayose K, Kubuki Y, Yamamoto S, Miike T, Iwakiri H, Hasuike S, Nagata K, Iwama A, Matsuda T, Kitanaka A and Shimoda K. TET2 is essential for survival and hematopoietic stem cell homeostasis. *Leukemia* 26:2216-2223 2012..
 38. Ashinuma H, Takiguchi Y, Kitazono S, Kitazono-Saitoh M, Kitamura A, Chiba T, Tada Y, Kurosu K, Sakaida E, Sekine I, Tanabe N, Iwama A, Yokosuka O, Tatsumi K. Anti-proliferative action of metformin in human lung cancer cell lines. *Oncology Reports* 28, 8-14, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

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24年度 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 これまでに得られた神経芽腫の網羅的ゲノム解析による情報に基づき、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解明から、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、以下の知見を得た。

(1) *MYCN*の*cis*-antisense large non-coding RNAである*NCYM*が実は蛋白質に翻訳され、*de novo* evolved gene productであることを明らかにした。*MYCN*と*NCYM*のダブルトランスジェニックマウスに発生した神経芽腫は、より強い転移性を有し、よりヒト神経芽腫に近いマウスモデルを創出した。(2) 治療用抗体の候補として、新規膜蛋白質*NLRR1*に対する増殖抑制性単クローン抗体を作製した。

(3) *in silico* screeningにより見いだした*TrkB*阻害剤候補低分子化合物は、*in vivo*で抗腫瘍効果を示し、さらに新薬開発へ近づいた。以上のように、神経芽腫発がんに関わる恒常性維持の破綻機構の解明と共に、神経芽腫のゲノム情報から創薬等実用化への展開が現実味を帯びてきた。

A. 研究目的

神経芽腫の網羅的ゲノム解析情報に基づき、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、それに基づく標的分子を対象として治療法を開発することを目的とした。これまでに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 NCYM/MYCN を中心に解析を行う。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, LMO3, NLRR 等の中から特に NLRR1 に特化して解析する。さらに、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 *NLRR1* を選択し、モデルマウスの作製も試みる。

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 細胞等を用いて遺伝子の 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利用した。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* construct を用いて行った。

NLRR1 の解析はノックアウトマウスを作製し、治療用抗体の探索には細胞外ドメインを標的とした単クローン抗体を作製した。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)を十分に理解したうえで、「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) NCYM, a *de novo* evolved gene product: 当初 large non-coding RNA と考えられていた MYCN のシス・アンチセンス遺伝子である NCYM は *de novo* evolved gene であり、ヒトとチンパンジーへの進化に伴って新しくでき、蛋白質をコードする遺伝子であることを明らかにした。NCYM 発現は予後の悪さと相関した。また、NCYM 蛋白質は GSK3b と結合し、MYCN の安定化を促進した。さらに、NCYM-Tg マウスでは腫瘍形成は無いものの、MYCN-Tg/NCYM-Tg マウスでは、明らかに神経芽腫の転移促進と抗がん剤抵抗性獲得を示した。したがって、NCYM はヒト神経芽腫特異的に発がんを促進し、MYCN-Tg/NCYM-Tg マウスに発生する神経芽腫がよりヒトに近いモデルマウスと思われた。

(2) NLRR1 の解析と治療用抗体の開発: MYCN の転写標的である NLRR1 は、がん細胞膜の lipid raft を介して、増殖シグナルを

送るチロシンキナーゼ受容体のみを選択的に活性化した。事実、NLRR1 KO マウスは成長抑制を示した。また、同定した抗腫瘍性抗 NLRR1 単クローン抗体のエピトープマッピングにより結合部位を確定した。

(3) 抗腫瘍性低分子化合物の同定: 300万個の低分子化合物ライブラリーから *in silico* screening によって7個の TrkB 阻害剤、8個の ALK/ShcC 阻害薬候補を同定し、解析を行なった。前者は、ヒト神経芽腫移植マウスにおいても抗腫瘍効果を示した。

(4) 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。マウスを用いて奇形腫形成能を検索したが、奇形腫はできなかった。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 発現プロファイルは分担研究者の大平の方で解析し、興味ある結果を得た。

D. 考察

神経芽腫発がんにおける MYCN の役割は益々重要になってきており、とくに、増幅している MYCN と 100% 共増幅している遺伝子の探索は過去約 30 年にわたって行なわれて来た。しかし、蛋白質をコードしている遺伝子で 100% 共増幅している遺伝子は見つからず、そのような遺伝子はないとされていた。しかし、われわれは、MYCN の cis-antisense gene である NCYM が長年信じられていた large non-coding RNA ではなく、蛋白質に翻訳されていることを明らかにし、さらにその機能が GSK3b を介した MYCN の安定化であることを、MYCN/NCYM double transgenic mouse 作製による *in vivo* のデータで証明した。したがって、この double transgenic mouse はヒト神経が腫の臨床病態に近く、これからの抗がん剤スクリーニングに極めて有用である。

一方、難治性神経芽腫に対する創薬とし

て行なって来た in silico screening による TrkB 阻害剤 (低分子化合物) の同定は、マウスゼノグラフトを用いた in vivo 有効性試験により有意な効果が認められたことから、今後の新薬開発への方向性が期待される。また、我々が得た抗 NLRR1 単クローン抗体も、将来の診断および治療薬候補として有望と思われた。

さらに、神経芽腫 I-type 細胞の iPS 化に成功し、神経芽腫細胞の plasticity と reprogramming の分子機構を知るための発現解析に進むことができた。

これらの結果は、神経芽腫の発がんをそれらに担う重要な分子が創薬の標的にもなることを示すという意味で、極めて重要な成果と思われた。

E. 結論

神経芽腫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ている。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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.* 2421:57-63. 2012

3. Kamijo T, Nakagawara A. Molecular and genetic bases of neuroblastoma. *Int. J. Clin. Oncol.* 17:190-195. 2012
4. Hossain S, Takatori A, Nakamura Y, Suenaga Y, Kamijo T, Nakagawara A. NLRR1 Enhances EGF-Mediated MYCN Induction in Neuroblastoma and Accelerates Tumor Growth In Vivo. *Cancer Res.* 72:4587-4596. 2012
5. Tonini GP, Nakagawara A, Berthold F. Towards a turning point of neuroblastoma therapy. *Cancer Lett.* 326:128-134. 2012
6. Schleiermacher G, Mosseri V, London WB, Maris JM, Brodeur GM, Attiyeh E, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Speleman F, Noguera R, Tonini GP, Fischer M, Ambros I, Monclair T, Matthay KK, Ambros P, Cohn SL, Pearson AD. Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Br J Cancer.* 107:1418-1422. 2012
7. Shum CK, Lau ST, Tsoi LL, Chan LK, Yam JW, Ohira M, Nakagawara A, Tam PK, Ngan ES. Krüppel-like factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage differentiation. *Oncogene*. 2012 Oct 8. doi: 10.1038/onc.2012.437. [Epub ahead of print]
8. Chand D, Yamazaki Y, Ruuth K, Schönherr C, Martinsson T, Kogner P, Attiyeh EF, Maris J, Morozova O, Marra MA, Ohira M, Nakagawara A, Sandström PE, Palmer R, Hallberg B. Cell culture and Drosophila model systems define three classes of anaplastic lymphoma kinase mutations in neuroblastoma. *Dis Model Mech.* 6:373-382, 2013

9. Nozato M, Kaneko S, Nakagawara A, Komuro H. Epithelial-mesenchymal transition-related gene expression as a new prognostic marker for neuroblastoma. *Int J Oncol.* 42:134-140. 2013
10. Wu D, Ozaki T, Yoshihara Y, Kubo N, Nakagawara A. Runt-related Transcription Factor 1 (RUNX1) Stimulates Tumor Suppressor p53 in Response to DNA Damage Through Complex Formation and Acetylation. *J Biol Chem.* 288:1353-1364. 2013
11. Kubo N, Wu D, Yoshihara Y, Sang M, Nakagawara A, Ozaki T. Co-chaperon DnaJC7/TPR2 enhances p53 stability and activity through blocking the complex formation between p53 and MDM2. *Biochem Biophys Res Commun.* 430: 1034-1039. 2013
12. Sugimoto T, Gotoh T, Yagyu S, Kuroda H, Iehara T, Hosoi H, Ohta S, Ohira M, Nakagawara A. A MYCN-amplified cell line derived from a long-term event-free survivor among our sixteen established neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 331:115-121, 2013
13. Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, Ohira M, Kamijo T, Kondo S, Fujii Y, Nakagawara A. Shf, a novel adaptor protein, interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 2013 Jan 30. doi: 10.1111/cas.12115. [Epub ahead of print] PMID: 23360421 [PubMed - as supplied by publisher] Related citations
14. Yamaki T, Suenaga Y, Iuchi T, Alagu J, Takatori A, Itami M, Araki A, Ohira M, Inoue M, Kageyama H, Yokoi S, Saeki N, Nakagawara A. Temozolomide suppresses MYC via activation of TAp63 to inhibit progression of human glioblastoma. *Sci Rep.* 2013;3:1160. doi: 10.1038/srep01160. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23362460 [PubMed - in process] Free PMC Article Related citations
- 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24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いないが、Neurosphere細胞がTumor Initiating Cellsであることは判明している。我々は、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、さらにCD133発現は神経芽腫細胞のNeurosphere形成を促進することを明らかにした。このNeurosphereにおけるCD133の発現制御機構を解析し、制御するプロモーター部位と制御因子について解析を行い、候補転写因子TFX1を同定した。また、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、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た。その結果、CD133のC末を脱リン酸化するフォスファターゼPTPRKが同定された。

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。

神経系腫瘍におけるNeurosphere形成とはがん細胞の初代培養を無血清DMEM:F12培地にEGF, FGFなどを添加した培養系で行う。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機能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、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。昨年度は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Yeast-2-hybrid法で行った。

今年度本研究では、Yeast-2-hybrid法で同定したCD133結合蛋白の機能解析を行い、さらに神経芽腫NeurosphereにおけるCD133の発現制御機構を解析することを目的とした。

B. 研究方法

1. 細胞株に対する遺伝子導入および遺伝子ノックダウン：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 (1x, Gibco); EGF (20 ng/ml, Sigma); bFGF (20 ng/ml, Sigma)を用いて培養した。

3. CD133の機能解析のためにCD133C末端結合分子を同定する：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。

4. FACS解析
遺伝子の機能解析のために、遺伝子導入後の細胞を用いて、蛍光標識抗体を反応させ、その後FACSCaliverを用いて蛋白発現を解析する。

5. ルシフェラーゼアッセイ

プロモーター活性の定量のためにpGL4.17ベクターにプロモーター候補のゲノムフラグメントをクローニングし、プロメガ Dual-Luciferase® Reporter Assay Systemで解析を行った。

(倫理面への配慮)

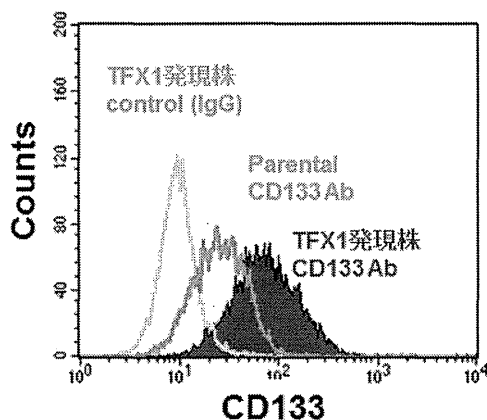
本研究計画は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が定めるB群試料等に相当する腫瘍組織を用いるため、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」(科学技術

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プロモーター2.5kbを正常細胞ゲノムからクローニングし、ルシフェラーゼアッセイを行って、最も活性の高い0.4kbを同定した。これを転写因子結合予測ソフトを用いて解析し、結合転写因子を10分子見出し、複数のSphereで発現が更新した分子を候補分子TFX1とした。TFX1は0.4kbプロモーターのルシフェラーゼ活性を約14倍に増加させ、このプロモーター部位に結合することがChIPアッセイで明らかになった。さらにTFX1を神経芽腫細胞にレンチウイルスで導入すると、CD133がmRNAおよびタンパク質レベル(下図)で誘導されることが示された。



TFX1の高発現は神経芽腫患者の不良な予後と一致することが複数のデータベース解析で示された。

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。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14分子を同定した。この中でCD133C末に存在するTyr残基のリン酸化に関わる分子としてPTPRKを選出した。PTPRKとCD133を細胞株に共発現させると、CD133C末Tyr残基リン酸化は著減した。PTPRKとCD133は培養細胞内で結合することが示された。さらに、CD133とPTPRKを細胞株に共発現させると、CD133によるアポトーシス抑制をキャンセルすることが判明した。

D. 考察

今後は、さらにTFX1の機能解析を神経芽腫細胞株および初代培養細胞で行い、神経芽腫の発がん・進展に関わる役割を明らかにしていくことが必要と考えられた。

CD133 C末細胞内ドメインに結合する候補分子としてPTPRKが同定された。がん細胞のバイオロジー、CD133のがん細胞における生物学的な機能におけるPTPRKの役割を今後検討していくことが必要と考えられた。

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、Neurosphere形成促進の分子機構を検討した。CD133の

Neurosphere特異的発現調節機構を明らかにした。

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、候補分子PTPRKが同定された。PTPRKはCD133C末Tyr残基リン酸化の脱リン酸化とCD133の機能に関わることが示された。

F. 健康危険情報 (特記なし)

G. 研究発表

1. 論文発表(2012年度)

1. Kamijo T(corresponding author). Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatric Res.* 2012 Apr;71(4 Pt 2):511-5. doi: 10.1038/pr.2011.54. Epub 2012 Feb 1. PMID:22430387

2. Kamijo T(corresponding author), Nakagawara A. Molecular and genetic bases of neuroblastoma. *Int J Clin Oncol.* 2012 Jun;17(3):190-5. Epub 2012 May 16 PMID:22588778

3. Hossain S, Takatori A, Nakamura Y, Suenaga Y, Kamijo T, Nakagawara A. NLRR1 Enhances EGF-Mediated MYCN Induction in Neuroblastoma and Accelerates Tumor Growth In Vivo. *Cancer Res.* 2012 Sep 1;72(17):4587-96. Epub 2012 Jul 19.

4. Oonishi K, Cui X, Hirakawa H, Fujimori A, Kamijo T, Yamada S, Yokosuka O, Kamada T. Different effects of carbon ion beams and X-rays on clonogenic survival and DNA repair in human pancreatic cancer stem-like cells. *Radiother Oncol.* 2012 Sep 24. doi:pii: S0167-8140(12)00360-X.

10.1016/j.radonc.2012.08.009.

2. 書籍 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特許出願中1件
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし