

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からの iPC 化細胞の遺伝子プロファイルの変化を詳細に解析した。このリプログラミングされた iPC 化細胞では遺伝子発現レベルは大きく変動しており、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。また、次世代シーケンサーによるターゲットエクソシリケンシングを実施し、細胞増殖パスウェイに関わる一遺伝子の変異を同定した。iPC 化細胞ではこのパスウェイに含まれる遺伝子群の発現は有意に低下しており、難治性神経芽腫の治療法開発の標的的同定に本細胞システムが有用であることが示唆された。

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と、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、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ならびに iPC 化細胞の取得：

同一の神経芽腫細胞株から派生し、培養条件の違いによって神経分化タイプ

(N-type neuroblastic/ neuroendocrine precursors)、Schwannian タイプ(S-type Schwannian/melanoblastic precursors)、そして N-type、S-type 両方への分化能をもつ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 あるいは SH-SY5Y 由来のサブライン 2 種類(Ross RA et al, *Cancer Lett.* 197:35-9, 2003)について各サブライン間の分子プロファイル比較を行った。これまでにアレイ CGH 解析によるゲノム異常検索と遺伝子発現アレイを用いた mRNA ならびに miRNA の網羅的発現解析を行った。主任研究者らにより、上記 2 種類の細胞株の iPC 化株も取得され、これらについても合わせて解析を行った。

神経芽腫組織の収集と選択：

千葉県がんセンターがん組織バンクには、全国の小児がん治療施設において神経芽腫と診断を受けた症例のうち、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がなされた 2900 を超える腫瘍検体が保管されている。本研究では典型的な臨床経過を示した神経芽腫症例 48 例（予後良好群：19 例、予後不良群：13 例、中間予後群：16

例) の腫瘍検体の遺伝子発現解析を行った。

アレイ CGH によるゲノムコピー数異常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は Feature Extraction、マッピングとコピー数の増減の網羅的解析は Genomic Workbench CGH Module (アジレント社) 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 μ g を用いて蛍光標識を行い、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) へのハイブリダイゼーションを行った。また、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 の比較ならびに I-type 細胞株の iPC 化の前後の比較を行い、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。取得した遺伝子発現データは GeneSpringGX を用いて、データクオリティチェック、ノーマライズ、2 群間の比較統計解析、Gene Ontology ならびにパスウェイ解析を行った。

遺伝子変異解析：

I-type 細胞株由来のゲノム DNA 1 μ g を出発材料に次世代型シーケンサーによる DNA 配列解析を行った。48 種のがん関連遺伝子のエクソン部分約 200 カ所の既知

変異ホットスポットを対象に PCR 法により標的遺伝子領域を増幅し、アンプリコンシーケンシングを行った。

(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様細胞株ならびに iPC 化細胞株の基礎データの取得：

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 SK-N-BE 株、SH-SY5Y 株の2種類を対象に、各株の iPC 化の前後の細胞についてアレイ CGH 解析を行った。その結果、N-type から I-type への転換時に加わったゲノム異常は 1p 欠失、2p 欠失および増加など各染色体に散見されるが、獲得されたゲノム異常のパターンは共通しておらず、臨床検体の初発部位と再発部位で加わったゲノム異常のプロファイルと同様に散発的であった。本細胞株における幹細胞様形態への変化はゲノム異常獲得の効果より、遺伝子発現の変化によるものが大きいと予測された。

さらに、主任研究者において培養された SK-N-BE 株、SH-SY5Y 株の iPC 化によるリプログラミング前後におけるゲノム異常プロファイルの変化を検討したところ、特に顕著なゲノム異常の追加は見られなかった。そこで、次に iPC 化細胞株における遺伝子発現の変化の検討を行った。

2. 遺伝子発現解析：

昨年度までに mRNA 発現解析により N-type 特異的遺伝子群、I-type 特異的遺伝子群が 36 種類同定された。I-type 細

胞株で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 キナーゼ群などが含まれており、これらのプロファイルが I-type 細胞株の高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一部は臨床検体を用いた発現解析により進行神経芽腫において高発現していることが示されている。

本年度は幹細胞様神経芽腫細胞株とその iPC 化細胞の遺伝子プロファイルの変化を中心に詳細に解析した。このリプログラミングされた iPC 化細胞では遺伝子発現レベルは大きく変動しており、これまでに臨床検体の解析から明らかにした難治性神経芽腫に特徴的な遺伝子群の発現の低下、ならびに予後良好マーカーの上昇が顕著に見られた。合わせて、本細胞に対して次世代シーケンサーを用いた 48 がん関連遺伝子内の 212 アンプリコンを対象としたターゲットエクソンリシーケンシングを実施したところ、一遺伝子にヘテロな一塩基変化を見いだした。細胞増殖パスウェイに関わる本フォスファターゼ遺伝子は、神経芽腫においても頻度は低いが gain-of-function 変異が報告されており、また、iPC 化細胞ではこのパスウェイに含まれる遺伝子群の発現は複数有意に低下していた。

考察：

以上のように、神経芽腫由来 iPC 細胞と幹細胞様 I-type 神経芽腫細胞株の網羅的ゲノム・遺伝子発現解析を通して各細胞に特徴的な分子パスウェイが明らかになりつつあり、今後の難治性神経芽腫の治療法開発の標的同定に本細胞システムが有用であることを示唆していると考えられる。今後はひきつづきこれら細胞の各種抗がん剤に対する感受性等の形質とプライマリー腫瘍・転移巣・再発腫瘍の網羅的遺伝子変異解析を含めた分子プロファイルを追加、比較することにより、治療標的分子パスウェイの同定と創薬への応用を目指す。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*, in press.
- 2) 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 and Drosophila model system define three classes of ALK mutations in neuroblastoma. *Dis. Model Mech*. in press.
- 3) Shum CKY, Lau ST, Tsoi LLS, Chan LK, Yam JWP, Ohira M, Nakagawara A, Tam PKH, Ngan ESW. Kruppel-Like Factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage differentiation. *Oncogene* in press.
- 4) 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*. 331:115-21, 2013.
- 5) 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.
- 6) 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(1):66-72, 2012.

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

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

難治性神経芽腫の発がんを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

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

研究要旨

脱ユビキチン化酵素である USP7/HAUSP が、ポリコム群、Ink4a、p53、MDM2 など
を介した細胞増殖や細胞死を制御することが考えられている。このメカニズム
を解明するために、本年度は USP7/HAUSP と結合するタンパクである MBLR/Pcgf6
のコンディショナル KO-ES 細胞を樹立し、MBLR/Ring1B 複合体は H2A のモノユビ
キチン化を介して抑制的に機能しうることを示した。

A. 研究目的

ポリコム群複合体（PRC1）を精製したところ、そこにユビキチン特異的分解酵素 7（USP7/HAUSP）を見出した。USP7/HAUSP は、p53 と MDM2 を脱ユビキチン化し、それらを機能的にバランスさせて、がん細胞の増殖を制御する。一方、PRC1 と MBLR 複合体とをバランスさせることで、ホメオボックス遺伝子の転写抑制を制御することを我々は最近明らかにした。本研究では、USP7/HAUSP がどのようにがん抑制遺伝子である Ink4a に作用するかを明らかにする。これにより、USP7/HAUSP を介した制御が、Ink4a、p53、MDM2 をどのようにバランスさせ、正常細胞あるいはがん細胞の増殖や細胞死をバランスさせているのかを明らかにしうる。

B. 研究方法

USP7/HAUSP と複合体を構成する Ring1B と MBLR（Pcgf6）について薬剤依存的に欠損するマウスから、ES 細胞を樹立し、ES 細胞における、USP7/HAUSP を含むタンパク複合体の増殖への作用を解析する。

C. 研究結果

Ring1B と MBLR コンディショナル欠損マウスからそれぞれをタモキシフェン誘導的に欠損する ES 細胞、また、MBLR のホモログであり PRC1 の構成成分である Mel18（Pcgf2）と Bmi1（Pcgf4）の二重欠損 ES 細胞（Mel18/Bmi1-dKO）を作製した。それらを用いて、RNA-seq 解析、Ring1B、モノユビキチン化ヒストン H2A についての ChIP-seq 解析を行った。その結果、MBLR/Ring1B 複合体だけが結合しそれらが抑制的に機能する遺伝子群と、MBLR/Ring1B 複合体が PRC1 と共局在する遺伝子群とが

存在し、そこでは MBLR/Ring1B 複合体が PRC1 に対し制御的に作用することが示された。

D. 考察

PRC1 関連複合体である MBLR/Ring1B 複合体は、標的遺伝子座ごとにその機能が異なることが示された。MBLR/Ring1B 複合体が PRC1 と共局在しない遺伝子群では、それらは H2A のモノユビキチン化を介して抑制的に機能することが示された。一方、PRC1 と共局在する遺伝子では、PRC1 に対して制御的に機能し、それを介して転写制御に寄与することが示された。

E. 結論

MBLR/Ring1B 複合体の標的遺伝子群と機能発現メカニズムを明らかにした。

G. 研究発表

論文発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. Laphthanasupkul 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
7. 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
8. 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
 9. 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 leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. *Blood.* 120(5):1107-17
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
17. 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
18. 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
19. Koseki H. (2012) An interview with
Haruhiko Koseki. Interviewed by Eva
Amsen. *Development*. 139:3469-70

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に関する研究

研究分担者 岩間 厚志 千葉大学大学院医学研究院・細胞分子医学教授

研究要旨

ポリコーム群複合体が癌治療の標的分子として有用であることが、ポリコーム遺伝子欠損マウスとともにポリコーム阻害剤の解析から確認された。神経芽腫の癌幹細胞治療においてもポリコーム群複合体が良い分子標的となるものと期待される。

A. 研究目的

遺伝子異常に加えて、エピジェネティックな転写制御の異常が癌の悪性化に関わることが明らかになりつつある。難治性神経芽腫におけるエピジェネティック異常はまた解析されておらず、基盤となる情報が必要である。本研究では難治性神経芽腫におけるヒストン修飾異常の一端を明らかにするとともに、得られた知見をもとに、難治性神経芽腫の治療に有効なエピジェネティック治療の可能性を探る。

B. 研究方法

ポリコーム群蛋白 EZH2 の低分子化合物阻害剤 (DZNep) の効果を、肝細胞がん細胞株 Huh7 細胞で検証した。DZNep 添加による H3K27me3 レベルの測定と、Huh7 細胞のスフェア形成に対する効果とともに、免疫不全マウス皮下における Huh7 細胞の腫瘍形成に対する効果を検討した。また、マウス白血病モデルを用いて Ezh2 遺伝子欠損による白血病幹細胞の頻度ならびに白血病発症活性への影響を調べた。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

難治性神経芽腫における MYCN の標的遺伝子としてポリコーム群遺伝子の重要性が確認された (Ochiai et al, Oncogene 29:2681, 2010)。そこで、ポリコーム群蛋白 EZH2 の低

分子化合物阻害剤 (DZNep) の効果を、まず、肝細胞がん細胞株 Huh7 細胞で検証した。EZH2 はヒストン H3K27 のトリメチル化活性を有するが、DZNep 添加によりその活性が著明に抑制されることが確認された。また DZNep は Huh7 細胞のスフェア形成を有意に抑制するとともに免疫不全マウス皮下における Huh7 細胞の腫瘍形成を明らかに抑制した。また、マウス白血病モデルを用いて Ezh2 の白血病における機能を検証した。その結果、マウス骨髄性急性白血病成立後に Ezh2 を欠損させると、白血病幹細胞の減少と白血病細胞の分化が誘導され、白血病活性が著しく減弱することが確認された。

D. 考察

ポリコーム阻害剤は抗腫瘍剤として有用であることが確認された。難治性神経芽腫へも応用できる可能性があると考えられる。

E. 結論

ポリコーム阻害剤の抗腫瘍剤として有用性が確認された。難治性神経芽腫へも応用が期待される。神経芽腫の癌幹細胞におけるゲノムワイドなヒストン修飾、遺伝子発現制御を理解しながら、難治性神経芽腫に有効なエピジェネティクス治療として開発につなげていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, Koseki H, and Iwama A. Ezh2 augments leukemo-genecity byreinforcing differentiation block age in acute myeloid leukemia. **Blood** 120, 1107-1117, 2012.
2. 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..
3. 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.

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
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, <u>Ohira M, Nakagawara A.</u>	ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity.	Lung Cancer	75	66-72	2012
Yoshihara Y, Wu D, Kubo N, Sang M, <u>Nakagawara A, Ozaki T.</u>	Inhibitory role of E2F-1 in the regulation of tumor suppressor p53 during DNA damage response.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	2421	57-63	2012
<u>Kamijo T, Nakagawara A.</u>	Molecular and genetic bases of neuroblastoma.	Int. J. Clin. Oncol.	17	190-195	2012
Hossain S, Takatori A, Nakamura Y, Suenaga Y, <u>Kamijo T, Nakagawara A.</u>	NLRR1 Enhances EGFR-Mediated MYCN Induction in Neuroblastoma and Accelerates Tumor Growth In Vivo.	Cancer Res.	72	4587-4596	2012
Tonini GP, <u>Nakagawara A, Berthold F.</u>	Towards a turning point of neuroblastoma therapy.	Cancer Lett.	326	128-134	2012
Schleiermacher G, Mosseri V, London WB, Maris JM, Brodeur GM, Attiyeh E, Haber M, Khan J, <u>Nakagawara A, Speleman F, Noguera R, Tonini GP, Fischer M, Ambros I, Monclair T, Matthay KK, Ambros P, Cohn SL, Pearson AD.</u>	Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project.	Br. J. Cancer.	107	1418-1422	2012
Shum CK, Lau ST, Tsui LL, Chan LK, Yam JW, Ohira M, <u>Nakagawara A, Tam PK, Ngan ES.</u>	Krüppel-like factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage differentiation.	Oncogene		Epub ahead of print	2012
<u>Kamijo T.</u>	Role of stemness-related molecules in neuroblastoma.	Pediatric Res.	71	511-515	2012

Oonishi K, Cui X, Hirakawa H, Fujimori A, <u>Kamijo T</u> , Yamada S, Yokosuka O, Kamada T.	Different effects of carbon ion beams and X-rays on clonogenics survival and DNA repair in human pancreatic cancer stem-like cells.	Radiother. Oncol.	105	258-265	2012
<u>Kamijo T</u> .	Neuroblastoma: Role of MYCN/Bmi1 Pathway in Neuroblastoma.	Pediatric Cancer			2012
Hashizume O, Shimizu A, Yokota M, Sugiyama A, Nakada K, Miyoshi H, Itami M, <u>Ohira M</u> , Nagase H, Takenaga K, Hayashi J.	Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development.	Proc. Natl. Acad. Sci.	109	10528-10533	2012
Hisada K, Sanchez C, Endo TA, Endoh M, Roman-Trufero M, Sharif J, <u>Koseki H</u> , 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
T Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, <u>Koseki H</u> , 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
Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Motomura Y, Yasuda T, Sato R, Yoshida H, Kubo M, Kawamoto H, <u>Koseki H</u> , 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
Oguro H, Yuan J, Tanaka S, Miyagi S, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Yamazaki S, <u>Koseki H</u> , Nakauchi H, <u>Iwama A</u> .	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

Shinoda K, Tokoyoda K, Hanazawa A, Hayashizaki K, Zehentmeier S, Hosokawa H, Iwamura C, <u>Koseki H</u> , Tumes DJ, Radbruch A, Nakayama T.	Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory.	Proc. Natl. Acad. Sci.	109	7409-7414	2012
Lapthanasupkul P, Feng J, Mantesso A, Takada-Horisawa Y, Vidal M, <u>Koseki H</u> , Wang L, AnZ, Miletich I, Sharpe PT.	Ring1a/b polycomb proteins regulate the mesenchymal stem cell niche in continuously growing incisors.	Dev. Biol.	367	140-153	2012
Watarai H, Yamada D, Fujii S, Taniguchi M, <u>Koseki H</u> .	Induced pluripotency as a potential pathway towards iNKT cell-mediated cancer immunotherapy.	Int. J. Hematol.	95	624-631	2012
Nakamura S, Oshima M, Yuan J, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Yamazaki S, Osawa M, Nakauchi H, <u>Koseki H</u> , <u>Iwama A</u> .	Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells.	PLoS One.	7	e36209	2012
Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, <u>Koseki H</u> , <u>Iwama A</u> .	Ezh2 augments leukemogenesis by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia.	Blood	120	1107-1117	2012
Visconte V, Rogers HJ, Singh J, Barnard J, Bupathi M, Traina F, McMahan J, Makishima H, Szpurka H, Jankowska A, Jerez A, Sekeres MA, Sauntharajah Y, Advani AS, Copelan E, <u>Koseki H</u> , Isono K, Padgett RA, Osman S, Koide K, O'Keefe C, Maciejewski JP, Tiu R V.	SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes.	Blood	120	3173-3186	2012
Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T, Eskeland R, Bickmore WA, Vidal M, Bernstein BE, <u>Koseki H</u> .	Histone H2A Monoubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity.	PLoS Genet.	8	e1002774	2012

Onoguchi M, Hirabayashi Y, <u>Koseki H</u> , Gotoh Y.	A noncoding RNA regulates the neurogenic gene locus during mouse neocortical development.	Proc. Natl. Acad. Sci.	109	16939-16944	2012
Ku M, Jaffe JD, Kocher RP, Rheinbay E, Endoh M, <u>Koseki H</u> , CarrSA, Bernstein BE.	H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions.	Genome Biol.	13	R85	2012
Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, ToyodaT, <u>Koseki H</u> , NakauchiH, <u>Iwama A</u> .	Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells.	Blood	121	447-458	2012
Farcas AM, Blackledge NP, Sudbery I, Long HK, McGouran JF, RoseNR, Lee S, Sims D, Cerase A, Sheahan TW, <u>Koseki H</u> , Brockdorff N, Ponting CP, KesslerBM, Klose RJ.	KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands.	Elife.	1	e00205	2012
Sakai S, Nakaseko C, Takeuchi M, Ohwada C, Shimizu N, Tsukamoto S, Kawaguchi T, Jiang M, Sato Y, Ebinuma H, Yokote K, <u>Iwama A</u> , Fukamachi I, Schneider WJ, SaitoY, and Bujo H.	Circulating soluble LRR11/SorLA levels are highly increased and ameliorated by chemotherapy in acute leukemias.	Clinica. Chemica Acta.	413	1542-1548	2012
<u>Koseki H</u> .	An interview with Haruhiko Koseki.	Development	139	3469-3470	2012
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, <u>Iwama A</u> , Matsuda T, Kitanaka A and ShimodaK.	TET2 is essential for survival and hematopoietic stem cell homeostasis.	Leukemia	26	2216-2223	2012

Suzuki E, Chiba T, Zen Y, Miyagi S, Tada M, Kanai F, Imazeki F, Miyazaki M, <u>Iwama A</u> , and Yokosuka O.	Aldehyde dehydrogenase 1 is associated with recurrence-free survival but not stem cell-like properties in hepatocellular carcinoma.	Hepatol. Res.	42	1100-1111	2012
Ashinuma H, Takiguchi Y, Kitazono S, Kitazono Saitoh M, Kitamura A, Chiba T, Tada Y, Kurosu K, Sakaida E, Sekine I, Tanabe N, <u>Iwama A</u> , Yokosuka O, Tatsumi K.	Anti-proliferative action of metformin in human lung cancer cell lines.	Oncology Reports	28	8-14	2012
Chand D, Yamazaki Y, Ruuth K, Schönherr C, Martinsson T, Kogner P, Attiyeh EF, Maris J, Morozova O, Marra MA, <u>Ohira M</u> , <u>Nakagawara A</u> , Sandström PE, Palmer R, Hallberg B.	Cell and Drosophila model systems define three classes of ALK mutations in neuroblastoma.	Dis. Model Mech.		Epub ahead of print	2013
Wu D, Ozaki T, Yoshihara Y, Kubo N, <u>Nakagawara A</u> .	Runt-related Transcription Factor 1 (RUNX1) Stimulates Tumor Suppressor p53 Protein in Response to DNA Damage through Complex Formation and Acetylation.	J. Biol. Chem.	288	1353-1364	2013
Nozato M, Kaneko S, <u>Nakagawara A</u> , Komuro H.	Epithelial-mesenchymal transition-related gene expression as a new prognostic marker for neuroblastoma.	Int. J. Oncol.	42	134-140	2013
Kubo N, Wu D, Yoshihara Y, Sang M, <u>Nakagawara A</u> , 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
Sugimoto T, Gotoh T, Yagyu S, Kuroda H, Iehara T, Hosoi H, Ohtsuka S, <u>Ohira M</u> , <u>Nakagawara A</u> .	A MYCN-amplified cell line derived from a long-term event-free survivor among our sixteen established neuroblastoma cell lines.	Cancer Lett.		Epub ahead of print	2013

Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, <u>Ohira M</u> , <u>Kamijo T</u> , Kondo S, Fujii Y, <u>Nakagawara A</u> .	Shf, a novel adaptor protein, interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma.	Cancer Sci.		Epub ahead of print	2013
Yamaki T, Suenaga Y, Iuchi T, Alagu J, Takatori A, Itami M, Araki A, <u>Ohira M</u> , Inoue M, Kageyama H, Yokoi S, Saeki N, <u>Nakagawara A</u> .	Temozolomide suppresses MYC via activation of TAp63 to inhibit progression of human glioblastoma.	Sci Rep.		Epub ahead of print	2013
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, <u>Koseki H</u> , Nakanishi M, Eto K, Nakauchi H.	Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation.	Cell Stem Cell	12	114-126	2013
Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S, <u>Koseki H</u> , Kawamoto H.	Regeneration of Human Tumor Antigen-Specific T Cells from iPSCs Derived from Mature CD8(+) T Cells.	Cell Stem Cell	12	31-36	2013
Sharif J, Shinkai Y, <u>Koseki H</u> .	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	20110340	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Molecular and genetic bases of neuroblastoma

Takehiko Kamijo · Akira Nakagawara

Received: 11 April 2012 / Published online: 16 May 2012
© Japan Society of Clinical Oncology 2012

Abstract Neuroblastoma, which is derived from the sympathetic nervous system, is the second most common pediatric solid malignant tumor. This pediatric tumor has a heterogeneous course, ranging from spontaneous regression to inexorable progression and death, depending on the biological features of the tumor. Identification of risk groups on the basis of clinical and molecular prognostic variables has allowed tailor-made therapy to improve outcomes and minimize the risk of deleterious consequences of therapy. In Japan, current therapeutic stratification of patients with neuroblastoma is based on risk assessment according to combinations of age, tumor stage, *MYCN* status, DNA ploidy status, and histopathology; however, unfavorable neuroblastoma is still one of the most difficult tumors to cure, with only 40 % long-term survival despite intensive multimodal therapy. Further refined therapeutic stratification based on newly identified prognostic factors will be required to improve the outcome of patients with unfavorable neuroblastoma and reduce the side effects of therapies for patients with favorable neuroblastoma. In the present review, we describe recent topics on the molecular and genetic bases of neuroblastoma; we hope this review will be helpful for understanding the mechanism of neuroblastoma tumorigenesis and aggressiveness and for

developing a new therapeutic stratification and new protocols for neuroblastoma treatments.

Keywords Neuroblastoma · Molecular and genetic abnormality

Clinical and biological features of neuroblastoma

Neuroblastoma (NB) is one of the most common malignant solid tumors occurring in infancy and childhood and accounts for 10 % of all pediatric cancers [1–3]. NB is diagnosed at a median age of about 17 months and can arise anywhere along the sympathetic nervous system, with the majority of the tumors occurring in the adrenal medulla. NB tumors in the neck or upper chest can cause Horner's syndrome (ptosis, miosis, and anhidrosis). NB tumors along the spinal column can expand through the intra-foraminal spaces and cause cord compression, resulting in paralysis. Higher-stage NBs often infiltrate adjacent organs, surround critical nerves and vessels, and are largely unresectable at the time of diagnosis, although many lower-stage NBs are encapsulated and can be surgically excised. Advanced NBs typically metastasize to regional lymph nodes and to the bone marrow via the hematopoietic system. NB cells metastatic to marrow can infiltrate cortical bone. NBs can also metastasize to the liver, most notably in patients with stage 4S tumors, which occur in about 5 % of cases. These infants have small localized primary tumors with metastases to the liver, skin, or bone marrow that almost always spontaneously regress [4].

The overall prognosis of patients with NB has markedly improved, with 5-year survival rates increasing from 52 % from 1975 through 1977 to 74 % from 1999 through 2005,

T. Kamijo (✉)
Division of Biochemistry and Molecular Carcinogenesis,
Chiba Cancer Center Research Institute,
666-2 Nitona, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-8717, Japan
e-mail: tkamijo@chiba-cc.jp

A. Nakagawara (✉)
Division of Biochemistry and Innovative Cancer Therapeutics,
Chiba Cancer Center Research Institute,
666-2 Nitona, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-8717, Japan
e-mail: akiranak@chiba-cc.jp

according to the Surveillance, Epidemiology, and End Results databases (<http://www.seer.cancer.gov>). However, unlike the many childhood malignancies for which survival has been improved by recent therapies, high-risk NB is still one of the most difficult tumors to cure, with only 40 % long-term survival despite intensive multimodal therapy [1–3].

NBs are neuro-ectodermal tumors of embryonic neural crest-derived cells. The neural crest in normal development gives rise to nerve cells of the sympathetic nervous system. The fetal adrenal medulla consists of a mixture of chromaffin cells and clusters of mature ganglion cells; NBs most likely originate from a pluripotent precursor cell or from both these cell types, because NB tumors can contain cells with both neuronal and chromaffin cell phenotypes. NBs have various clinical outcomes, from spontaneous regression, caused by neuronal differentiation and/or apoptotic cell death, to malignant progression. The emerging patterns of multiple genetic abnormalities, such as aneuploidy, chromosomal gains and losses, and amplification of chromosomal material seem to mirror the different clinical entities and have led to better stratification of patients for therapy; however, despite many advances during the past three decades, NB has remained an enigmatic challenge to clinical and basic scientists.

Amplification of genomic DNA regions

MYCN oncogene

MYC, MYCN, and MYCL are helix-loop-helix/leucine zipper (HLH/LZ) proteins that form a heterodimer complex with MAX, which has high affinity for the consensus sequence CACGTG (E box MYC sites) and lower affinity for various non-canonical DNA sequences [5]. In the presence of growth factors, the expression of MYC family proteins has a positive role in cell-cycle progression [6]. However, normal cells with aberrant MYC expression are eliminated through apoptosis, although in cells having defects in the apoptosis machinery, deregulation of MYC may promote tumorigenesis.

Amplified *MYCN* in NBs is prototypic for the significance of proto-oncogene amplification in tumorigenesis [7, 8]. Amplified copies of *MYCN* can be present either extra-chromosomally as double minutes (DMs) or intra-chromosomally as homogeneously staining regions (HSRs). HSRs are generally located on different chromosomes, not at the resident site, 2p24, of *MYCN* [9]. Amplification values in NBs may range between 5- and more than 500-fold, and values of around 50- to 100-fold are usually seen in tumors. The complexity of amplified

DNA encompassing *MYCN* can range from 100 kb to more than 1 Mb. A core 100- to 200-kb domain encompassing *MYCN* has been found consistently without rearrangements. The size of the DNA surrounding *MYCN* raises the possibility that additional genes may be co-amplified [10].

MYCN amplification occurs in roughly 20 % of primary NBs and is strongly correlated with advanced-stage disease [11] and treatment failure [12]. In localized NBs, *MYCN* amplification is the major prognostic factor, identifying patients who do not require aggressive therapy [13].

Extra copies of 17q

Gain of a long segment of the q-arm of chromosome 17 is associated with a poor outcome in NB [14]. The independent predictive power of the gain of 17q status was established in tumors with 17q, but without *MYCN* amplification or allelic losses of 1p or 11q [15]. It seems that unbalanced 17q gain identifies a larger population at risk than any other clinical or cytogenetic factor. The mechanism(s) involved in an adverse prognosis could be either the fusion of a gene flanking the 17q breakpoint, or a dosage effect of one or more genes in the extra 17q region. However, the breakpoint region is highly variable, which makes it very unlikely that just a single gene at 17q is involved in tumorigenesis; therefore, it is commonly thought that a dosage effect of one or more genes or a class of genes in the region of unbalanced gain is responsible for the altered phenotypes. The most prominent candidates implicated as having a role in NB progression in the common region of gain are *NM23-H1*, *NM23-H2* [16], and *SURVIVIN* [17].

Loss of genomic DNA regions

Allelic loss at 1p

One of the most prominent regions of loss of heterozygosity (LOH) in NBs is 1p, commonly identified in 30–35 % of all tumors. These deletions correlate not only with *MYCN* amplification, but also with an advanced disease stage [18]. In tumors with amplification of *MYCN*, LOH of 1p usually affects large areas, often reaching 1p32 or even more proximal. In contrast, the shortest region of overlap for 1p deletions in *MYCN* single-copy tumors was found to be smaller, and was defined at 1p36.3 [19, 20]. Despite intensive investigation, the gene or genes within chromosome 1p involved in NB tumorigenesis and aggressiveness remain to be elucidated. Whether the LOH due to deletion of alleles from 1p is an independent indicator of prognosis remains controversial. The different

regions of deletion associated with different biological entities suggest the existence of more than one tumor suppressor gene at chromosome 1p. Previous reports indicated that at least three discrete regions at chromosome 1p might be commonly deleted in NB, which suggests that these regions harbor putative tumor-suppressor genes [21]. Recent evidence indicates that *miR-34a*, a micro RNA (miRNA) known to regulate MYCN expression [22, 23], *CHD5* (1p36.31), a chromatin remodeling gene [24], and *KIF1b β* (1p36.21), a pro-apoptotic gene [25], are candidate 1p36 NB tumor-suppressor genes.

Allelic loss of 11q

Allelic loss of 11q is present in 35–45 % of primary NBs [26, 27]. Notably, this genomic aberration is rarely seen in tumors with MYCN amplification, yet it remains highly associated with other high-risk features. Recently, loss of 11q has been reported to be highly correlated with adverse patient outcome [28], and has been proposed as a stratifying prognostic marker in the International Neuroblastoma Risk Group classification system [29], as well as in the upcoming clinical trial of the Children's Oncology Group. Previously, we performed array-comparative genomic hybridization (array-CGH) analysis for 236 primary NBs to search for genomic aberrations with high resolution. In our study, we have identified the shortest region of deletion overlap (10 Mb or less) at 11q23 [30]. Within this region, there exists a *TSLC1/IGSF4/CADMI* gene (tumor suppressor in lung cancer 1/immunoglobulin superfamily 4/cell adhesion molecule 1), and molecular and biological studies have suggested that TSLC1 acts as a candidate tumor suppressor gene for NB [31]. Recently, we have reported that MYCN induces polycomb BMI1, which suppresses 1p tumor suppressor KIF1b β and 11q tumor suppressor TSLC1 epigenetically [32]. First, we studied BMI1 expression by Western blotting and found that the expression of the PRC1 complex protein BMI1 correlated with MYCN protein expression in NB cell lines and primary NB tumors. BMI1 induction by MYCN was at the miRNA level in an MYCN-inducible NB cell line and several other NB cell lines. *BMI1* promoter analysis by luciferase vector experiments determined an MYCN-binding E-box sequence in the promoter region, and chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments confirmed direct binding of MYCN around the E-box region. Next, we transduced BMI1 in several NB cell lines by lentivirus vectors and found up-regulation of cell proliferation in vitro and in vivo. Consistent with this, *BMI1* knockdown using short hairpin (sh) RNAs produced by lentivirus vectors resulted in the induction of neurite elongation and the expression of the differentiation

markers GAP43 and NF68. To understand how BMI1 controls NB cell proliferation and differentiation, we tried to identify the BMI1 target genes, except for *p14ARF/p16INK4a*, as we could not observe significant changes in these well-known tumor suppressors. To identify BMI1 target genes, except for *p14ARF* and *p16INK4a*, we performed expression gene profiling using an appropriate NB complementary DNA (cDNA) microarray (named the CCC-NHR13000 chip) carrying 13440 cDNA spots. Intriguingly, the well-known TSGs in NB—*TSLC1* (NM_014333.3) and *KIF1b β* (AB017133)—are ranked as the first and second targets, respectively. We found that BMI1 expression considerably repressed *TSLC1* and *KIF1b β* transcription in NB cells; by quantitative ChIP experiments, we addressed whether BMI1 specifically bound to *KIF1b β* (ENSG0000054523) and *TSLC1* (ENSG00000105767) promoter regions in NB cells. These findings, taken together, indicated an intriguing MYCN/BMI1/tumor-suppressor pathway in NB cells. This pathway might have a marked impact on NB tumorigenesis and is considered to be a target for the development of molecular-targeted therapy for refractory NBs.

Specific gene abnormality in neuroblastoma

High expression of the high-affinity receptor TrkA is found in mature sympathetic ganglia as well as in NBs with favorable prognosis. High TrkA expression is associated with younger age, lower stage, and absence of MYCN amplification. In contrast, low TrkA expression is associated with a poor prognosis and MYCN amplification [33, 34]. In contrast to TrkA and p75NTR, high expression of TrkB is preferentially found in high-risk tumors, particularly in those with amplification of MYCN [35].

The overall loss of caspase 8 (CASP8) expression in NBs is estimated to be 25–35 %, predominantly in high-risk tumors, and this loss seems to be strongly associated with the presence of amplified MYCN [36, 37]. The lack of CASP8 expression was associated with hypermethylation of a 5'-flanking sequence. The biological relevance of the loss of CASP8 follows from its central position in the extrinsic apoptotic route. CASP8 acts as a tumor suppressor gene, and inactivation will result in tumor cell survival.

Allelic loss at the short arm of chromosome 3 is a common event in many different cancers, including NBs. The shortest region of overlap in NBs has been defined at 3p25.3–3p14.3 [38]. *RASSF1A* (Ras-association domain family 1) is within the chromosomal 3p21.3 region and is frequently inactivated by hypermethylation in NB cell lines and tumors [39]. Hypermethylation of *RASSF1A* in NBs was reported in 40–55 % of tumors and 86 % of cell lines.