

201438006A

厚生労働科学研究費委託費  
革新的がん医療実用化研究事業

“なぜ遺伝子変異なしでがんができるか”  
その分子基盤解明と 標的探索

平成26年度

委託業務成果報告書

研究代表者 上條 岳彦

平成27（2015）年3月

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、埼玉県立がんセンターが実施した平成26年度「“なぜ遺伝子変異なしでがんができるか”：その分子基盤解明と標的探索」の成果をとりまとめたものです。

## 目 次

I. 総括研究報告	
“なぜ遺伝子変異なしでがんができるか”：その分子基盤解明と 標的探索に関する研究	1
上條岳彦	
II. 分担研究報告	
1. 神経芽腫がん幹細胞のTranscriptome・エピゲノム解析に 関する研究	5
上條岳彦	
2. INRGデータベースの追跡項目に合致した神経芽腫症例 データベースの整備	8
中川原 章、田尻達郎	
3. 神経芽腫腫瘍検体のproteome解析	14
堺 隆一	
4. ヒトおよびマウス神経芽腫がん幹細胞のエピゲノム解析	19
牛島俊和	
5. マウス神経芽腫がん幹細胞の新規培養法開発とエピゲノム 解析に関する研究	24
門松健治	
6. 神経芽腫におけるgenetic landscapeに関する研究	26
滝田順子	
7. 候補標的分子の分子生物学的解析	31
江成政人	
8. ヒトおよびマウス神経芽腫がん幹細胞のTranscriptome解析： 神経芽腫腫瘍検体のaCGHによるゲノム変異の網羅的解析	35
大平美紀	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV. 研究成果の刊行物	65

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
総括研究報告書

“なぜ遺伝子変異なしでがんができるか”：その分子基盤解明と標的探索  
に関する研究

主任研究者 上條 岳彦 埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所長

研究要旨

“遺伝子変異の無いがん”の一つと考えられる神経芽腫のエピゲノム・ゲノム解析によるがん幹細胞標的療法開発というきわめて独創性の高い研究であり、得られた成果は成人腫瘍においても重要なエピジェネティック異常経路を共有していることが推測され、がんの標的治療に新たなパラダイムを提供できる可能性があると考えられる。本年度の研究は、がん幹細胞性制御分子の網羅的解析によるスクリーニングを施行し、候補同定についての基盤となる結果が得られた。

研究分担者

上條 岳彦	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所 所長
中川原 章	佐賀県立医療センター 好生館 理事長
田尻 達郎	京都府立医科大学 外科学教室(小児外科学)教授
堺 隆一	国立がん研究センター研究所 転移浸潤シグナル研究分野 分野長
牛島 俊和	国立がん研究センター研究所 エピゲノム解析分野 分野長
門松 健治	名古屋大学大学院 医学系研究科生化学教室 教授
滝田 順子	東京大学医学系研究科・ 医学部小児科 准教授
江成 政人	国立がん研究センター研究所 難治がん研究分野ユニット長
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

A. 研究目的

神経芽腫におけるエピゲノム・トランスクリプトーム解析を中心に施行し、これにゲノム解析、プロテオーム解析を加えたマルチオミックス解析を行い、“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構を解明することを目的とする。このマテリアルとして、特に難治化に関わるがん幹細胞検体（腫瘍スフェア細胞）を主に用いる。これによって、難治神経芽腫症例のバイオマーカーと分子標的的同定を目指すものである。

B. 研究方法

（上條岳彦）既に同定した **Tumor Sphere** 形成因子については標的療法開発を行っていく（H26）。初代培養 **Tumor Sphere** において発現量の変化があり、神経芽腫患者の予後と相関する分子をさらに **RNA sequencing** 法で同定する（H26）。データ分取にはイルミナ **Miseq**

を用い、コード領域および non-coding の RNA における新規転写産物の検出を行う。データ解析は参照配列にマッピングされたリードを既存の遺伝子モデル毎に計量する。miRNA 解析はアジレント社の miRNA マイクロアレイ Human Rel.12.0 を用いて発現変化をスクリーニングする (H26)。

(中川原章、大平美紀) 神経芽腫におけるゲノム変化のパターンを、アレイ CGH を用いて網羅的に解析する。この際千葉県がんセンター研究所と協力して推進する。得られた候補分子の解析を分子生物学・遺伝学的手法で解析する (H26)。

(堺隆一) 複数の神経芽腫細胞・スフェアからカラムを用いた精製によりリン酸化 Tyr を含む蛋白質群を単離し、質量分析で新規 ALK 結合蛋白質を同定していく。公的データベースを用いて予後との相関を調べ、siRNA を用いて神経芽腫の増殖、運動能、浸潤能に対する影響を調べ、重要な分子を絞り込む (H26)。

(牛島俊和) 上條主任研究者及び門松分担者から供与される神経芽腫スフェア、神経芽腫細胞株、原発腫瘍等を用いる。DNA メチル化解析は、Infinium 450K beadarray を用いて行う。ヒストン修飾解析は、H3K27me3 修飾に対する ChIP-seq を行う。DNA メチル化及び H3K27me3 の両者について、転写開始点との位置関係、CpG アイランド構造の有無等を考慮しながら、スフェアに特徴的な変化を同定する。スフェアにおいて DNA メチル化や H3K27me3 により不活化される遺伝子の中から、幹細胞性に関与する可能性が高いものを抽出する

(H26)。

(滝田順子) 初発、転移、再発組織の凍結検体より切片を切り出し、レーザーマイクロディセクションにより単一細胞の抽出を行う。解析症例はそれぞれ 1、2 例とし、各腫瘍 20-50 個の単一腫瘍細胞を抽出する。単一細胞の全 DNA/RNA の増幅も行い、さらに単一細胞のエクソーム解析を行う (H26)。

(門松健治) 神経芽腫癌幹細胞の新規培養法ががん幹細胞の純化に適しているかを、分化能、自己増殖能、腫瘍形成能などを指標に判定し、最適化に務める。難治例・再発例のヒト腫瘍検体ならびにモデルマウスで得た癌および前癌組織を材料として用いる (H26)。

(江成政人) ALK 陽性神経芽腫で腫瘍スフェアを形成する(上條と協力)。ALK 阻害剤の感受性について検討し、阻害剤投与後に耐性となった検体を得る。この ALK 阻害剤で抵抗性となったスフェアと薬剤添加前のスフェアとの比較解析(マイクロアレイ等)を行い、抵抗性に関わる遺伝子を探索する (6-28)。

(田尻達郎) JNBSG の神経芽腫臨床データの解析と基礎研究者への提供を行う(中川原と協力)。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針(厚生労働省告示)」に従って実施する。

本研究計画遂行に当たっては「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、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学

省・厚生労働省・経済産業省共同告示第1号(平成16年12月28日全部改正)(平成17年6月29日一部改正)(平成20年12月1日一部改正)を遵守して実施する。また、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に該当する研究を包含する研究申請を行い、承認済みである。

### C. 研究結果

・ヒト神経芽腫がん幹細胞(スフェア細胞)におけるスクリーニングでは、細胞株での解析と初代細胞での解析において共通する分子としてWNTシグナル系分子の上昇がみられ、この高発現は不良な予後と一致していた。このノックダウンはスフェア形成の阻害をもたらすので、さらに解析を続けていく(上條、大平)。今後、コントロール細胞としてiPSまたはES由来神経堤細胞を用いてトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析によるスクリーニングを行い、更に標的を絞り込んでいく(上條、牛島、大平)。これまで神経芽腫がん幹細胞性制御分子として同定されたCDX1については、*in vitro*解析がほぼ終了し、*in vivo*解析を

**Knockin** マウスで施行する(上條)。

・マウス神経芽腫がん幹細胞(スフェア細胞)におけるスクリーニングでは、野生型とNBモデルMYCNTGマウスのスフェア形成細胞を用いてトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析が行われた。ゲノムコピー数の異常は見当たらず、MYCNTGでMYC-MAXのターゲット遺伝子群の増加、およびPRC2ターゲット遺伝子群の低下が見られた。さらに転それぞれ臨床因子と関連することが確認された(滝田)。

写開始地点から2kb以内のDNAメチル化を見るとTH-MYCNでメチル化の多いことが分かった(門松、牛島、大平)。

・神経芽腫症例フォローアップ研究：調査施設数内訳は、調査ファイル回収済み施設：88施設中81施設、調査ファイル回収済み症例数：2104例中1830例である。現在、転帰(イベント・生死の両方)が判明している1146例についてデータ解析を行っている(中川原、田尻、上條)。

・ALK結合タンパク質の解析をマスマスペクトロメトリーで網羅的に解析した。結合分子としてFLOT1を同定し、FLOT1はALKのエンドソーム局在を阻害し、ALK分解を促進することを明らかにした(堺)。SHP2を新たなALK結合分子として見出し、解析を行っている(堺)。ALK阻害剤とp53活性化剤の併用が、神経芽腫においても有効であることが示唆された。更に、がん幹細胞様形質を持つ神経芽腫のスフェアアッセイ系を樹立し、その際のALK阻害剤耐性についても、ALK阻害剤とp53活性化剤との併用が有効であることもわかった(江成)。

・神経芽腫の分子病態の全貌を把握するために、442例の大規模検体において、既知の神経芽腫関連遺伝子に関するtarget sequencing およびゲノムコピー数の網羅的解析を行い genetic landscape の作成を試みた。ゲノム異常により6つのサブグループ(A:ALK+MYCN、B:Other mutation、C:MYCN+1p LOH、D:11q LOH、E:Hyperploid、F:silent)が検出され、そ

### D. 考察

本年度の研究を受けて、次年度にはヒト神経芽腫がん幹細胞モデルとしての Sphere 形成神経芽腫細胞のエピゲノム・トランスクリプトーム解析を進めるために、コントロールとしてヒト iPS から樹立した神経堤細胞を用いて網羅的解析を行う必要がある。この結果を考慮して、神経芽腫がん幹細胞性制御因子のスクリーニングを継続する。現在マウスの神経芽腫がん幹細胞モデルとして、MYCN トランスジェニックマウス神経芽腫細胞でのエピゲノム・トランスクリプトーム解析を進めているが、この結果と比較してのターゲット絞り込みも検討していく。

また、1 細胞ゲノムシーケンス、1 細胞トランスクリプトーム解析技術も班内で開発中であり、神経芽腫検体でのソーティング・1 細胞マルチオミックス解析への応用を図り、上述のターゲット分子での解析を今後検討したい。

#### E. 結論

本研究は“遺伝子変異の無いがん”の一つと考えられる神経芽腫のエピゲノム・ゲノム解析によるがん幹細胞標的療法開発というきわめて独創性の高い研究であり、得られた成果は成人腫瘍においても重要なエピジェネティック異常経路を共有していることが推測され、がんの標的治療に新たなパラダイムを提供できる可能性があると考えられる。本研究においては、期間内に難治神経芽腫症例のバイオマーカーと分子標的の同定を行い、同定したバイオマーカーは臨床研究グループの治療プロトコール作成のリスク分類に反映させていく。また、標的分子のうち創薬シーズとなり得る分子

については知的財産権確立・新薬開発へと発展させていきたい。

#### F. 健康危険情報

特記なし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表：各自の分担研究に記載
2. 学会発表：各自の分担研究に記載

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

各自の分担研究に記載

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

神経芽腫がん幹細胞の Transcriptome・エピゲノム解析に関する研究

研究分担者 上條 岳彦 埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所長

研究要旨

神経芽腫におけるエピゲノム・トランスクリプトーム解析を中心に施行し、これにゲノム解析、プロテオーム解析を加えたマルチオミックス解析を行い、“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構を解明することを目的として研究を進めた。現時点では神経芽腫がん幹細胞のがん幹細胞性の制御に WNT シグナルが重要な役割を果たしていることが推測された。

A. 研究目的

神経芽腫におけるエピゲノム・トランスクリプトーム解析を中心に施行し、これにゲノム解析、プロテオーム解析を加えたマルチオミックス解析を行い、“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構を解明することを目的とする。このマテリアルとして、特に難治化に関わるがん幹細胞検体（腫瘍スフェア細胞）を主に用いる。これによって、難治神経芽腫症例のバイオマーカーと分子標的の同定を目指すものである。

B. 研究方法

1. 既に同定した **Tumor Sphere** 形成因子については標的療法開発を行っている。
2. これまで神経芽腫がん幹細胞性制御分子として同定された **CDX1** については、**in vitro** 解析がほぼ終了し、**in vivo** 解析を **Knockin** マウスで施行する。
3. 初代培養 **Tumor Sphere** において発現量の変化があり、神経芽腫患者の予後

と相関する分子をさらに **RNA sequencing** 法で同定する。データ分取にはイルミナ **Miseq** を用い、コード領域および **non-coding** の RNA における新規転写産物の検出を行う。データ解析は参照配列にマッピングされたリードを既存の遺伝子モデル毎に計量する。分担研究者 門松・牛島らのエピゲノムデータ、中川原・滝田らのゲノムデータを統合して今後解析する。

（倫理面への配慮）

本研究はヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省告示）」に従って実施する。本研究計画遂行に当たっては「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、「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）（平成20



年12月1日一部改正)」を遵守して実施する。また、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に該当する研究を包含する研究申請を行い、承認済みである。

#### C. 研究結果

1. ヒト神経芽腫がん幹細胞（スフェア細胞）におけるスクリーニングでは、細胞株での解析と初代細胞での解析において共通する分子として WNT シグナル系分子の上昇がみられ、この高発現は不良な予後と一致していた。このノックダウンはスフェア形成の阻害をもたらすので、さらに解析を続けていく。

2. CDX1 および CD133 の Knockin マウスについてはヘテロマウスを作出した。今後神経堤細胞リネージでの発現が可能な Cre マウスとの交配によって組織特異的 CDX1 または CD133 過剰発現マウスが作成できる基盤が構築された。

3. コントロール細胞として iPS または ES 由来神経堤細胞を用いてトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析によるスクリーニングを行い、更に標的を絞り込んでいく。

#### D. 考察

WNT シグナル経路は正常幹細胞の幹細胞性維持に重要な経路であり、今回の解析でもスフェア形成での上昇と、神経芽腫がん幹細胞に重要な転写因子による誘導が見られたことから注目されると考えられる。

#### E. 結論

ヒト神経芽腫がん幹細胞における高発

現遺伝子スクリーニングでは、細胞株での解析と初代細胞での解析において共通する分子として WNT シグナル系分子の上昇がみられた。この WNT シグナル系分子高発現は不良な予後と一致し、さらにこの分子のノックダウンはスフェア形成の阻害をもたらした。以上から神経芽腫がん幹細胞のがん幹細胞性の制御に WNT シグナルが重要な役割を果たしていることが推測された。

#### F. 健康危険情報

特記なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1-1. Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T(corresponding author).

Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway.

Eur J Cancer. 2014; 50:1555-65.

1-2. Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y. RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients.

Cancer Lett. 2014

1-3. Shimozato O, Waraya M,

Nakashima K, Souda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, Nakagawara A, Ozaki T, Kamijo T (corresponding author).

Receptor-type protein tyrosine phosphatase  $\kappa$  (PTPRK) directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation.

Oncogene. 2014 Jun 2. doi: 10.1038/onc.2014.141. [Epub ahead of print].

1-4. Sun Y, Furihata T, Ishii S, Nagai M, Harada M, Shimozato O, Kamijo T, Motohashi S, Yoshino I, Kamiuchi A, Kobayashi K, Chiba K.

Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers.

Clin Transl Med. 2014 Nov 18;3:37.

doi: 10.1186/s40169-014-0037-y.

eCollection 2014.

1-5. 上條岳彦、檜山英三、肝芽腫の診断と治療、「最新肝臓学」、日本臨牀社、2014

1-6. 上條岳彦、小児固形腫瘍のがん幹細胞 小児外科、47 巻第 2 号 123-128、2015

## 2. 学会発表

2-1. 「多診療科医師合同シンポジウム 難治性固形腫瘍を考える－基礎から臨床まで：神経芽腫」

神経芽腫の基礎生物学 Basic Biology

of Neuroblastoma. 第 56 回小児血液・がん学会 上條岳彦

2-2. Tumor sphere specific transcription factor CDX1 regulates stem cell-related gene expression and aggressiveness in

neuroblastoma. Advances of Neuroblastoma 2014. Hisanori Takenobu, Takehiko Kamijo 他

2-3. Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulates MYCN/ATM/p53 pathway. Advances of

Neuroblastoma 2014. Yohko Yamaguchi, Takehiko Kamijo 他

## H. 知的財産権の出願・登録状況

CDX1 測定による神経芽腫の悪性度の決定と予後判定。特願 2013-002842

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

INRGデータベースの追跡項目に合致した神経芽腫症例データベースの整備

担当責任者 田尻 達郎 京都府立医科大学大学院医学研究科 小児外科学 教授  
担当分担者 中川原 章 佐賀県医療センター 好生館 理事長

研究要旨

神経芽腫は、小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度が高く、年間150～200例が発生する。しかし、半数以上を占める高リスク群の治癒率は未だ生存率20～40%であり、その新規治療法開発が国際的にも喫緊の重要課題となっている。一方、低・中間リスク群では、治療の軽減、合併症回避を行いながら治療成績の向上を図ることが求められ、新規リスク因子や個別化治療法の開発が必要である。

JNBSG（日本神経芽腫スタディグループ）は、2006年に日本全体の神経芽腫を包括してその臨床情報の把握、及び、国際的に発信できる臨床試験の遂行を目的に設立された。また本邦の多くの神経芽腫検体の分子遺伝情報についてはJNBSG設立以前より千葉県がんセンターが中心となり解析を行いデータ管理を行ってきた。JNBSG設立以降のJNBSG施設の症例のデータについては管理の主体をJNBSGデータセンターへ移管しており、非JNBSG施設のデータは千葉県がんセンターで継続的にデータ管理がされている。この両者のデータを統合することが現時点では本邦の神経芽腫のほぼ全症例を網羅したデータベースとなることと考えられるため、2013年11月から、JNBSGデータセンターと千葉県がんセンターより各施設に詳細な臨床情報の再検索依頼を行い、2014年11月末まで各施設から回収を終了した。現在、データをクリーンアップ中であり、2014年度末から分子遺伝情報を併合したデータベースに対して解析を開始し、2015年度中の解析終了を目指している。

A. 研究目的

2006年に日本神経芽腫研究グループ(JNBSG)を設立し、データセンター、中央病理・分子診断、検体センター等の基盤整備を行い、わが国の全神経芽腫を対象に多施設臨床試験を行ってきた。神経芽腫の特徴はその生物学的多様性にある。高リスク群では予後改善のための新規治療戦略が求められ、低・中間リスク群ではリスク因子にもとづく治療軽減、合併症回避、そして治療成績の向上を図る必要がある。また、臨床試験（研究）に付随した腫瘍検体を用いて、わが国独自に開発した神経芽腫ゲノム・病理リスク分

類（INPC分類）による評価系の確立と次世代シーケンシングによる治療の有効性と抵抗性に関わる遺伝子の同定と分子標的治療薬の開発と臨床導入が必要である。

本邦の多くの神経芽腫検体の分子遺伝情報についてはJNBSG設立以前より千葉県がんセンターが中心となり解析を行い、データ管理を行ってきた。JNBSG設立以降のJNBSG施設の症例のデータについては管理の主体をJNBSGデータセンターへ移管しており、非JNBSG施設のデータは千葉県がんセンターで継続的にデータ管理がされている。この両者のデータを統合し、本邦全体の神経芽腫の臨床情報と分子遺

伝情報を併合したデータベースを作成し、解析することを目的とする。

## B. 研究方法

2013年度から、臨床情報検索項目フォームを作成し、11月から、順次、データセンターからJBBSG登録施設に再検索依頼を開始し、2014年11月末までに各施設から回収予定である。その後、データクリーンアップを行い、分子遺伝情報を併合したデータベースを作成して解析を行う。

(倫理面への配慮)

JNBSGにおける登録や臨床試験の実施、またこれに付随するすべての研究に関しJNBSG内部における倫理審査を実施し、また各参加施設においては倫理委員会または治験審査委員会の承認を必須条件とする。さらに必要な際には第三者機関による倫理審査を実施する。すなわちヘルシンキ宣言やわが国における各種倫理指針を遵守する。すべての患者において登録前に十分な説明を行い、理解に基づく自発的同意を本人または代諾者より文書で得る。

個々の臨床試験（研究）においては、JNBSGの各療法委員会により治療の質を管理し、効果・安全性評価委員会、研究審査委員会により安全性および倫理性を保証する。すなわち第三者機関による監視システム等により許容し得ない患者不利益や危険性を排除し、患者の人権擁護、個人情報保護、データベースの機密性等を保証する。またすべての患者由来の検体は、同意のもとに検体センターに保存し、二次利用のための管理を行う。

## C. 研究結果

2013年度から、臨床情報検索項目フォームを作成し、11月から、順次、JNBSGデータセンターからJBBSG登録施設に再検索依頼を開始し、2014年11月末までに

各施設から回収を終了した。88施設に調査ファイルを送付し、81施設から回収、対象症例2104例中、1830例が回収可能であった。平成27年2月現在、データクリーンアップ中である。平成26年度末までに千葉県がんセンターからJNBSG施設以外の施設に依頼し、回収した臨床情報とデータの統合を行い、解析を開始する予定である。

## D. 考察 E. 結論

JNBSGデータセンターから、JNBSG施設に調査を依頼し、回収した1830例のデータのデータクリーンアップにおいては、入力不備の部分もあり、一部のデータについては、再度の施設への調査も検討中である。千葉県がんセンターからJNBSG施設以外の施設に依頼し、回収した臨床情報検索項目フォームと早期の統合と、質の高いデータにするためのデータクリーンアップが急務である。JNBSGでは、INRGフォローアップ解析WGを平成27年1月に立ち上げ、具体的な解析手法について検討を開始した。平成27年度中の解析終了を目指している。

## F. 健康危険情報 該当事項なし

## G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Janette M, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K: Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma :BioMed Cancer

- 2014
- 2) 米倉竹夫、田尻達郎、伊勢一哉、小野 滋、大植孝治、佐藤智行、杉藤公信、菱木知郎、平井みさ子、文野誠久、本多昌平、風間理郎、杉山正彦、中田光政、仲谷健吾、脇坂宗親、近藤知史、上原秀一郎、鬼武美幸、木下義晶、日本小児外科学会悪性腫瘍委員会：小児の外科的悪性腫瘍，2012 年登録症例の全国集計結果の報告 日小外会誌 50;114-150, 2014
  - 3) Hirakawa M, Nishie A, Asayama Y, Fujita N, Ishigami K, Tajiri T, Taguchi T, Honda H: Efficacy of preoperative transcatheter arterial chemoembolization combined with systemic chemotherapy for treatment of unresectable hepatoblastoma in children: Jpn J Radiol 32:529-536, 2014.
  - 4) Sakai K, Kimura O, Furukawa T, Fumino S, Higuchi K, Wakao J, Kimura K, Aoi S, Masumoto K, Tajiri T: Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in a rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. : J Pediatr Surg 49:1749-1752, 2014.
  - 5) 竹内雄毅、樋口恒司、坂井宏平、文野誠久、青井重善、古川泰三、木村修、田尻達郎：腹部腫瘍により発見された Herlyn-Werner-Wunderlich 症候群の 1 例 日本小児外科学雑誌 第 50 卷 第 1 号 76-80, 2014
  - 6) 樋口恒司、木村修、古川泰三、文野誠久、青井重善、坂井宏平、土屋邦彦、家原知子、細井創、田尻達郎：胸壁悪性軟部肉腫に対する肋骨合併切除・胸郭再建術 小児外科 46 : 120-124 , 2014
  - 7) 文野誠久、金聖和、坂井宏平、樋口恒司、青井重善、古川泰三、木村修、田尻達郎：腸間膜リンパ管腫切除術 小児外科 46 : 143-147 , 2014
  - 8) 文野誠久、加藤久尚、樋口恒司、出口英一、田尻達郎：胆汁うっ滞 先天性胆道拡張症 周産期医学 44 : 1343-1346, 2014
  - 9) 文野誠久、坂井宏平、東真弓、青井重善、古川泰三、田尻達郎：膵・胆管合流異常の診断の最前線：膵・胆管合流異常における DIC-CT の診断意義 胆と膵 35 : 897-900, 2014
  - 10) 田尻達郎：第 11 節 小児固形悪性腫瘍における遺伝子解析による悪性度診断と遺伝子治療 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発 348-353, 2014
  - 11) 田尻達郎：QOL を重視した小児外科医療の進歩 相楽医報 第 151 号 : 18, 2014
  - 12) 田尻達郎：小児外科医療の進歩～QOL 向上を目指して～ 京都小児科医会会報 No. 58 19-23, 2014
  - 13) F, Nakazawa A, Osumi T, Shimojima N, Tanaka T, Nakagawara A, Shimada H. Two Cases of Neuroblastoma Comprising Two Distinct Clones. Pediatric Blood Cancer. ;61(4):760-762 2014
  - 14) Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, **Kaneko Y**. RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. Cancer Letters. 348:167-176, 2014.
  - 15) Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, **Takita J**, Ohira M,

- Nakagawara A et al. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res.* *Cancer Res.* 15:74:3790-801, 2014
- 16) Suenaga Y, Islam SMR, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shibta T, Nakamura Y, Ohira M, Haraguchi S, Takatori A, Nakagawara A. NCYM, a cis-antisense gene of MYCN, encodes a de novo evolved protein that inhibits GSK3b resulting in the stabilization of MYCN in human neuroblastoma. *PLoS Genet.* 10(1) , 2014
- 17) Yu F, Gao W, Yokochi T, Suenaga Y, Ando K, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A. RUNX3 interacts with MYCN and facilitates protein degradation in neuroblastoma. *Oncogene* 33:2601-2609, 2014
- 18) Nakamura Y, Suganami A, Fukuda M, Hasan MK, Yokochi T, Takatori A, Sato S, Hoshino T, Tamura Y, Nakagawara A. Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Med.* 3(1):25-35, 2014
- 19) Yamazaki F, Nakazawa A, Shimojima N, Tanaka T, Nakagawara A, Shimada H. Two cases of neuroblastoma comprising two distinct clones. *Pediatr. Blood Cancer.* 61:760-762, 2014
- 20) Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T. Novel lp tumor suppressor DMAP1 regulates MYCN/ATM/p53 pathway. *Eu. J. Cancer.* 50:1555-1565, 2014
- 21) Morgenstern DA, London WA, Stephens D, Volchenboum S, Hero B, Cataldo AD, Nakagawara A, Shimada H, Ambros P, Matthay KK, Cohn SL, Peason ADJ, Irwin MS. Metastatic neuroblastoma confined to distant lymph nodes (stage 4N) predicts outcome in patients with stage 4 disease: A study from the International Neuroblastoma Risk Group Database. *J. Clin. Oncol.* 32:1228-1235, 2014
- 22) Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y. RASSF1A methylation may have two biological roles on neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. *Cancer Letters.* 348:167-176, 2014
- 23) Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res.* 74:3790-3801, 2014
- 24) Shimozato O, Waraya M, Nakashima K, Soda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, Nakagawara A, Ozaki T, Kamijo T. Receptor-type protein tyrosine phosphatase  $\kappa$  directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene*, 2014[Epub ahead of print]
- 25) Meany HJ, London WB, Ambros PF, Matthay KK, Monclair T, Simon T, Garaventa A, Berthold F, Nakagawara

- A, Cohn SL, Peason ADJ, Park JR. Significance of clinical and biologic features in stage 3 neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Pediatr. Blood Cancer* .61:1932-1939, 2014
- 26) Vo KT, Matthay KK, Neuhaus J, London WB, Hero B, Ambros PF, Nakagawara A, Miniati D, Wheeler K, Pearson ADJ, Cohn SL, DuBois SG. Clinical, biological, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project. *J. Clin. Oncol* .32: 3169-3176, 2014
- 27) Oberthuer A, Juraeva D, Hero B, Volland R, Carolina S, Schmidt R, Faldum A, Kahlert Y, Engesser A, Asgharzadeh S, Seeger RC, Ohira M, Nakagawara A, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Benard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Grundy RG, Ortmann M, Shao C, Schwab M, Eils R, Simon T, Theissen J, Berthold F, Westermann F, Brors B, Fischer M. Revised risk estimation and treatment stratification of low- and intermediate-risk neuroblastoma patients by integrating clinical and molecular prognostic markers. *Clin. Cancer Res.* 2014 [Epub ahead of print]
- 28) Akter J, Takatori A, Islam MS, Nakazawa A, Ozaki T, Nagase H, Nakagawara A. Intracellular fragment of NLRR3 (NLRR3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 453(1):86-93, 2014
- 29) Tatsumi Y, Takano R, Islam MS, Yokochi T, Itami M, Nakamura Y, Nakagawara A. BMCC1, which is an interacting partner of BCL2, attenuates AKT activity, accompanied by apoptosis. *Cell Death and Disease* 22:1607, 2015.
- 30) Mosse YP, Deyell RJ, Berthold F, Nakagawara A, Ambros PF, Monclair T, Cohn SL, Pearson AD, London WB, Matthay KK. Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults. A report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Pediatr. Blood Cancer.* 61(4):627-35, 2014
2. 学会発表
- 1) S Fumino, T Furukawa, S Aoi, K Higuchi, K Sakai, T Iehara, H Hosoi, T Tajiri. Surgical Strategy for Mediastinal Neuroblastic Tumors in Children: a Single Institution Experience. *Advances in Neuroblastoma Research.* 2014 May 13-16 Koln, Germany.
- 2) K Sakai, O Kimura, T Furukawa, K Higuchi, J Wakao, K Kimura, S Fumino, S Aoi, K Masumoto, T Tajiri. Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in rat models of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. The 47th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons. 2014 May 24-29, Canada.

- 3) S Fumino, K Kimura, T Iehara, M Nishimura S Nakamura R Souzaki, A Nishie, T Taguchi, H Hosoi, Tatsuro Tajiri. Validity and reliability of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from 2 territorial centers in Japan 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology. 2014 Oct 21-26, Tront, Canada.
- 4) A Yoneda, M Nishikawa, M Inoue, H Soh, Y Tazuke, H Yamanaka, M Nomura, K Deguchi, R Matsuura, M Fukuzawa. T Tajiri, T Iehara, A Nakagawara. THE NEW GUIDELINE FROM THE INTERNATIONAL NEUROBLASTOMA RISK GROUP (INRG) PROJECT HAS PROFOUND EFFECTS ON CLINICAL TRIALS WHICH EMPLOYED IMAGE DEFINED RISK FACTORS. Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research 2014) May. 13-16
- 5) A Yoneda, T Tajiri, T Iehara, M Kitamura, A Nakazawa, H Takahashi, T Takimoto, A Nakagawara. CHARACTERISTICS OF IMAGE DEFINED RISK FACTORS (IDRFS) IN PATIENTS ENROLLED THE LOW RISK PROTOCOL (JNB-L-10) FROM THE JAPAN NEUROBLASTOMA STUDY GROUP (JNBSG) Toronto, Canada (SIOP (46th)) Oct/22-25. 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当事項なし。
2. 実用新案登録  
該当事項なし。
3. その他  
該当事項なし。



厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

神経芽腫腫瘍検体の proteome 解析

研究分担者 堺 隆一 国立がん研究センター研究所 難治進行がん研究分野 分野長

研究要旨

神経芽腫において野生型 ALK と結合する蛋白質と質量分析にて半網羅的に同定し、ALK シグナルの調節と神経芽腫の幹細胞特性や治療抵抗性との関わりを解析を行った。エンドサイトーシスに関わるラフト局在蛋白質 Flottillin-1 (FLOT1) は、ALK と結合しその細胞内への取り込みや分解に関わり、ヒト神経芽腫組織の解析においても FLOT1 の発現が低い群で有意に予後不良群であることが分かった。FLOT1 低下による受容体型チロシンキナーゼの活性化は ALK に選択的に認められ、この分子が特に ALK 阻害剤に対する腫瘍の感受性に関わることを明らかにした。また同じく ALK と結合することが明らかになった蛋白質チロシンホスファターゼの SHP2 の発現が ALK に依存した神経芽腫の悪性形質に関わることを示され、その作用機序について解析を進めている。

A. 研究目的

神経芽腫における ALK の活性化変異は全体の 7～8% 程度であるとみられ、遺伝子増幅と合わせても 10% 程度である。ALK が活性化した悪性リンパ腫や肺癌においては、ALK 阻害剤が臨床試験にまで進められていて著効を示す例があり、神経芽腫においても遺伝子増幅例では効果があるものの、頻度の高い F1174L など幾つかの変異については ALK 阻害剤の効果を示しにくいとの報告がある。一方これまでの解析で、ALK に遺伝子変異がなくても ALK の蛋白質量が増加している神経芽腫症例は予後が悪いというデータも得ており (Tomiyama A et al, Cancer Res 2014)、このようなケースで

は、ALK 阻害剤が効果を示す可能性がある。今後問題になると危惧される薬剤抵抗性などの問題を回避するためにも、神経芽腫で活性化した ALK がもたらすがん化シグナルの正確な理解は極めて重要な課題であると考え。複数の神経芽腫細胞・スフェアからリン酸化チロシンを含む蛋白質群をカラム精製し、新規 ALK 結合蛋白質などを中心に質量分析で同定して機能解析を行い ALK 結合分子群の腫瘍特性や治療抵抗性との関わりを包括的に理解することにより、ALK チロシンキナーゼが伝える特別ながん化シグナルの本態を解明し、治療抵抗性を克服する道筋を見出すことを目的とする。

## B. 研究方法

ALK 結合蛋白質を同定する最初の試みとして FLAG タグを付加した野生型 ALK を恒常的に発現する神経芽腫細胞株から M2-アガロースによって FLAG タグの着いた蛋白質をプルダウンして、コントロール親株 (TNB-1 細胞) と比較して導入した ALK に特異的に結合する蛋白質を質量分析にて半網羅的に解析してきた。その結果、約 30 の蛋白質が再現性よく同定された。このうち IRS1、SOS1、Grb2、ZO-1 など幾つかについては、ALK との結合がリンパ腫など他の系でも報告されており、この手法で ALK 結合蛋白質が確かに同定されていることが示唆された。Flotillin1 (FLOT1)、PTPN11 (SHP2)、SH2B1 など特異的抗体を入手でき、ALK との結合やリン酸化が確認できたものについて先行して抗体や siRNA を用いた機能解析を進めた。今回新規に見つかった他の分子についても特異的抗体を作成して同様な機能解析に進めつつある。具体的には以下のような解析を中心に、推定される分子特有の機能に対する解析も加える。

### ・神経芽腫の生物学的特性への影響

siRNAによる発現抑制で、増殖能、運動性、細胞増殖能、運動能、スフェア形成能、ソフトアガーコロニー形成能、ヌードマウスでの造腫瘍能などに与える影響を検討する。また、ALKの発現やリン酸化の程度、既知のAkt、Erk1/2などの下流分子の活性化などに与える影響について、それぞれリン酸化特異的抗体を用いて検

討する。

### ・阻害剤感受性への影響

ALK阻害剤TAE684の増殖抑制効果を濃度をふって検討し、各々のALK結合蛋白質の発現抑制がALK阻害剤に対する感受性に与える影響を検討する。

## C. 研究結果

神経芽腫でALKに結合するリン酸化蛋白質として同定したFlotillin1 (FLOT1) はその発現量の低いことが神経芽腫の予後不良と関わることから、ALK蛋白質の安定性などとの関わりで機能解析を進めた。その結果、ラフトに局在するFLOT1はALKと選択的に結合しエンドサイトーシスを介してALK蛋白質の分解に関わることが示された。また、神経芽腫で見られるF1174Lなど幾つかの変異に関して、変異型ALKとFLOT1との結合能が野生型に比べ著明に減少しているのが確認された。一方で神経芽腫でFLOT1の発現をノックダウンにより抑制すると、細胞運動能、足場非依存性増殖、ヌードマウスにおける造腫瘍能などが増加するという結果も得られた。以上のことからFLOT1の発現低下やFLOT1との結合能が低いALK変異によりALK蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強に関わる可能性が示唆された。この結果は、ALK蛋白質の発現量が遺伝子変異の有無にかかわらず神経芽腫の予後不良に関わるという解析結果とも整合性が有り、今後FLOT1低値の神経芽腫においてALK阻害剤が治療に

有効である可能性について動物モデルなどを用いて検証していく必要がある。

SHP2 (PTPN11) については、ALK自体またはSrcによりチロシンリン酸化を受け、神経芽腫細胞のアポトーシス抑制に関わることが示された。SH2B1については、ALKと結合すること、ALK阻害剤でチロシンリン酸化が落ちること、siRNAによるノックダウンで神経芽腫の運動能などの悪性形質が抑制されることは確認できている。SHP2とSH2B1がそれぞれ蛋白質ホスファターゼとシグナルアダプター分子として、どのようにALKシグナルの調整に関わっているのか現在詳細について解析を進めている。

#### D. 考察

今回、初めてALKに結合するリン酸化蛋白質として同定したFlotillin1 (FLOT1) は、ヒト神経芽腫組織の解析においても予後不良群の組織で発現は低下しており、FLOT1の発現低下やFLOT1との結合能が低いALK変異によりALK蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強と悪性化に関わり、このような細胞はcrizotinibなどALK阻害剤に感受性が高い可能性が示唆された。また同じくALKに結合する分子として新たに同定したチロシンホスファターゼSHP2 (PTPN11) は、ドッキング分子ShcCとともにALKと複合体を作り、ALKの活性化シグナルを下流のErkやAktに媒介して神経芽腫の進展を制御していると考えている。ALKのシグナル

を負と正に制御するこの2つのシステムのバランスが、神経芽腫の薬剤感受性、幹細胞性、転移能などの性質にどのように関わるかを、今後他の神経芽腫細胞や幹細胞スフェアなども用いて調べる必要がある。

#### E. 結論

ALKシグナルの活性化が神経芽腫の進行過程で重要な役割を果たすと考えているが、ALK結合蛋白質の解析で、以前から研究しているShcCや今回新たに見つかったSHP2のようにALKシグナルを正に制御する分子と、FLOT1のようにALKシグナルを負に制御する分子群があることが分かった。生理的にはALK活性がこれらの分子群の巧妙な調節によって制御されていると考えられるが、神経芽腫はそのバランスの破綻した状態と捉えることもできる。今後、神経芽腫の幹細胞性や自然消退において、既に解析した分子を含むALK結合分子群がどのように関与しているのかを明らかにすることによって、阻害剤抵抗性などの壁を乗り越えた新規治療法の開発につながると考える。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R, Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK

membrane association. *Cancer Res.* 74:3790-3801, 2014

Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K, Sakai R. Saracatinib impairs the peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells resistant to Met and FGFR inhibitors. *Cancer Sci.* 105:528-536, 2014

Yamaguchi H, Yoshida H, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M, Sakai R. Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PlosOne* 9(1):e85485, 2014

Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Iwakawa R, Narisawa-Saito M, Nakashima K, Tsuta K, Tsuda H, Kiyono T, Yokota J, Sakai R. Oncogenic Ras/ERK signaling activates CDCP1 to promote tumor invasion and metastasis. *Mol Cancer Res.* 12:1449-1459, 2014

## 2. 学会発表

Tomiyama A, Uekita T, Sakai R: Flotillin1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells through receptor endocytosis of anaplastic lymphoma kinase. *Advances in Neuroblastoma Research* 2014, 2014, Toronto Canada.

山口英樹, 堺隆一: 間質線維芽細胞との相互作用を標的としたスキルス胃癌治療薬の探索. 第23回日本がん転移学会学術集会・総会, 2014, 金沢

白木原琢哉, 堺隆一: スキルス胃癌の浸潤・腹膜播種へのFGFシグナルの関与. 第23回日本がん転移学会学術集会・総会, 2014, 金沢

上北尚正, 堺隆一: 小細胞がんにおける足場非依存性増殖シグナルの解析. 第23回日本がん転移学会学術集会・総会, 2014, 金沢

上北尚正, 堺隆一: Ras-ERKシグナルによるCDCP1発現誘導を介した癌の浸潤・転移機構. 第73回日本癌学会学術総会, 2014, 横浜

中島克彦, 上北尚正, 黒澤仁, 堺隆一: 転移関連タンパク質CDCP1の切断による分泌とその機能. 第73回日本癌学会学術総会, 2014, 横浜

富山新太, 上北尚正, 山口英樹, 上野英明, 滝田順子, 佐々木一樹, 中川原章, 森健太郎, 堺隆一: 新規ALK結合蛋白質であるFlotillin1は、ALKの細胞膜結合の調節を介してALKシグナルを制御する. 第73回日本癌学会学術総会, 2014, 横浜

白木原卓哉, 堺隆一: スキルス胃癌の