

浸潤・腹膜播種へのFGFシグナルの関与.
第73回日本癌学会学術総会, 2014, 横
浜

Sakai R:Regulation of oncogenic signaling
in neuroblastoma through binding partners
of anaplastic lymphoma kinase. 第11回
プロテインホスファターゼ国際カンファ
レンス, 2014, 仙台

H. 知的所有権の出願・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

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

研究分担者 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

研究要旨

神経芽細胞腫において、エピゲノム異常が特に重要であることが近年の研究で示されている。神経芽細胞腫の発がん分子基盤解明には、神経芽細胞腫におけるエピゲノム異常の全体像を把握する必要がある。本研究では、神経芽細胞腫とその発生母地の DNA メチル化異常のプロファイリングを行うことを目的とした。本年度は、ヒト神経芽細胞腫の細胞株、および、マウス神経堤細胞由来 sphere のゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った。その結果、ヒト神経芽細胞腫細胞株は、他のがん種の細胞株とは異なる CpG メチル化プロファイルを示すこと、*MYCN* を導入した胎児期のマウス神経堤細胞では、分化に関連する遺伝子が特異的に高メチル化を示すことが明らかとなった。今後は、ヒト iPS 細胞由来の神経堤細胞やマウス神経芽細胞腫の解析を加えることで、神経芽細胞腫の腫瘍細胞に特異的な異常 DNA メチル化を明らかにしていく予定である。

A. 研究目的

神経芽細胞腫は遺伝子変異が少ないことが知られており、その一部は自然退縮というゲノム異常では説明できない現象を示す。我々は CpG island methylator phenotype(CIMP)陽性の神経芽細胞腫は *MYCN* 増幅が陰性であったとしても有意に予後が不良であることを示してきた。これらは、神経芽細胞腫において、エピゲノム異常が特に重要であることを強く示唆しているものである。

神経芽細胞腫の発がん分子基盤解明には、神経芽細胞腫におけるエピゲノム異常の全体像を把握する必要がある。本研

究では、神経芽細胞腫とその発生母地の DNA メチル化異常のプロファイリングを行うことを目的とした。神経堤由来の細胞が神経芽細胞腫の発生母地と考えられるが、ヒト神経堤細胞の入手は非常に困難である。そこで考えられるアプローチとしては、(1)ヒト iPS 細胞から作製した神経堤細胞を用いる、(2)マウスモデルを用いることが考えられる。

本年度は、そのアプローチの途中段階として、ヒト神経芽細胞腫の細胞株、および、マウス神経堤細胞由来 sphere のゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った。

B. 研究方法

1. ヒトおよびマウスゲノム DNA サンプル

ヒト細胞株は、ATCC から購入または JCRB から分与を受け、フェノーラル・クロロホルム法によりゲノム DNA を抽出した。胎児期 (E13.5) の野生型及びヒト MYCN を導入した (MYCN-Tg)マウスの神経堤細胞から培養した sphere のゲノム DNA は、門松分担者から供与を受けた。

2. ゲノム網羅的 DNA メチル化解析

ヒトゲノム DNA の網羅的メチル化解析には、Infinium Human Methylation450 beadchip(Illumina)を用いた。重亜硫酸 処理したゲノム DNA を増幅し、482,421 CpG 部位および 3,091 non-CpG 部位が解析可能な BeadChip にハイブリダイズして、プライマー伸長反応後、iSCAN (Illumina) スキャナを用いてデータを取得した。完全メチル化を 1, 完全非メチル化を 0 とする β 値を用いてメチル化の程度を判定した。

マウスゲノム DNA の網羅的メチル化解析については、MBD-seq 法を用いた。断片化した二重鎖ゲノム DN と MBD2 が結合した磁気ビーズを混合することにより、メチル化 DNA を選択的に回収した。それらの配列を Ion Proton (Life technologies)を用いて約 2,000 万リード分取得し、Torrent Suite を用いてマウスゲノムにマップした。

Strand NGS software (Agilent)に搭載されている MACS 法を用いて、メチル化 DNA が Input に対して有意に濃縮されている領域を算出することにより、メチル化領域を特定した。

3. DNA メチル化の生物情報学的解析

DNA メチル化プロファイルの階層的クラスター解析は、R package の Heatplus ライブラリを用いて行った。Gene ontology 解析は DAVID 6.7 ([http:// http://david.abcc.ncifcrf.gov/](http://http://david.abcc.ncifcrf.gov/))を用いて行った。

(倫理面への配慮)

今回は無し

C. 研究結果

1. ヒト神経芽細胞腫細胞株の DNA メチル化プロファイル

ヒト神経芽細胞腫細胞株の DNA メチル化プロファイルを明らかにするため、神経芽細胞腫細胞株(N = 10) について、HumanMethylation450 を用いてゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った。別の研究で解析した胃がん細胞株(N = 29)、大腸がん細胞株(N = 3)、乳がん細胞株(N = 17)、正常細胞株(胃、大腸、乳腺、各 N = 1, 1, 2)、副腎髄質(N = 1)、末梢血 (N = 1)の結果を併せて DNA メチル化プロファイルの階層的クラスター解析を行った。

ゲノム全体の CpG を用いた解析では、全ての神経芽細胞腫細胞株は一つ

のクラスターに分類された。CpG アイランド(CGI)に限定した解析でも、全ての神経芽細胞腫細胞株は一つのクラスターに分類されていた。また、神経芽細胞腫細胞株は、他のがん種の CIMP 陽性細胞株とは大きく異なり、他のがん種の CIMP 陰性細胞株の群に近い傾向を示した。この傾向は、転写開始点近傍の CGI (TSS200 CGI)の解析において、より顕著であった。

さらに、神経芽細胞腫細胞株は、シナプス伝達関連遺伝子群等のプロモーターの CpG メチル化プロファイルにより、二つのグループに分割された。加えて、一部の神経芽細胞腫細胞株においては、non-CpG のメチル化が検出された。

2. マウス神経堤細胞由来 sphere のゲノム網羅的メチル化解析

胎児期 (E13.5) の野生型及び MYCN-Tg マウスの神経堤細胞から培養した sphere のゲノム網羅的メチル化解析を MDB-seq 法を用いて行った (各 N=4, N=5) 結果、遺伝子転写開始点近傍 ($\pm 200\text{bp}$) で野生型特異的に高メチル化を示した遺伝子 7 個、MYCN-Tg 特異的に高メチル化を示した遺伝子 35 個を同定した。

Gene ontology 解析の結果、MYCN-Tg 特異的に高メチル化を示した遺伝子には、分化関連遺伝子が有意に高頻度に含まれていることが示された。その中には、神経堤細胞の分化の方向性決

定に重要であることがよく知られる Sox10 が含まれていた。野生型で特異的に高メチル化を示した遺伝子については数が少数のため、Gene ontology 解析が不可能であった。

D. 考察

1. ヒト神経芽細胞腫の DNA メチル化プロファイル

ヒト神経芽細胞腫細胞株は、他のがん種の細胞株とは異なる DNA メチル化プロファイルを示すことが明らかになった。特に、他のがん種の CIMP 陽性細胞株のメチル化プロファイルとは大きく異なり、メチル化されている CGI の数も少なかったことから、神経芽細胞腫で認められる CIMP は他のがん種の CIMP とは異なるメカニズムに基づくことが示唆された。さらに、神経芽細胞腫細胞株は、シナプス伝達関連遺伝子群等のプロモーターの CpG メチル化プロファイルにより、二つのグループに分けられることが示された。

正常なヒト神経堤細胞の入手が極めて困難であるため、今年度は、がん細胞に特異的な DNA メチル化異常の解析ができなかった。今後は、京都大学戸口田教授が開発したヒト iPS 細胞由来の神経堤細胞を標準試料として解析することで、がん細胞に特異的な DNA メチル化異常のプロファイリングを進める予定である。

2. マウス神経堤細胞由来 sphere のゲノム網羅的メチル化解析

胎児期の野生型及び MYCN-Tg マウスの神経堤細胞から培養した sphere のゲノム網羅的メチル化解析の結果、MYCN-Tg 特異的に高メチル化を示した遺伝子には分化に関連する遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。マウス神経堤細胞において、MYCN の導入が分化関連遺伝子への DNA メチル化異常を誘発したと考えられる。これらの分化異常に関わる DNA メチル化が、MYCN-Tg における神経芽細胞腫の発がんに関わっている可能性がある。

今後、MYCN-Tg マウスに発生する神経芽細胞腫原発巣およびその sphere のゲノム DNA を門松分担員から供与を受け、その DNA メチル化状態を解析する予定である。これにより、MYCN-Tg マウス特異的なメチル化が腫瘍細胞に存在するかどうかは明らかになる。

E. 結論

ヒト神経芽細胞腫細胞株は、他のがん種の細胞株とは異なる CpG メチル化プロファイルを示すことを明らかにした。MYCN を導入した胎児期のマウス神経堤細胞では分化に関連する遺伝子が特異的に高メチル化を示すことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの
該当無し

本研究費に密接に関係するもの

Takeshima H, Wakabayashi M, Hattori N, Yamashita S and Ushijima T.

Identification of co-existence of DNA methylation and H3K27me3 specifically in cancer cells as a promising target for epigenetic therapy. *Carcinogenesis*, 36: 192-201, 2015.

Hattori N and Ushijima T. Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer. *Biochem biophys Res Commun*, 455: 3-9, 2014.

Ushijima T. Cancer epigenetics: Now harvesting fruit and seeding for common diseases. *Biochem Biophys Res Commun*, 455: 1-2, 2014.

2. 学会発表

Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation by chronic inflammation, and its application to cancer risk diagnosis and prevention. *Epigenetics in Development and Diseases Conference 9th Asian Epigenomics Meeting*. Singapore, August, 2014. (invited)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

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

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

研究分担者 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

研究要旨

胎児期 E13.5 交感神経節を対象に sphere 培養を確立した。この sphere は既に腫瘍形成能を獲得していた。そのゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームの網羅的な解析により、いくつかの特徴的変化が起きていることが判明した。

A. 研究目的

マウス神経芽腫がん幹細胞の新規培養法開発とゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム解析をおこなう。“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構の解明と治療のための分子標的同一性の基盤を確立する。

B. 研究方法

*TH-MYCN*マウスの胎児期E13.5交感神経節を対象にsphere培養を行う。交感神経節とsphereについて組織学的に同等であるかを解析する。これらsphereの分化能、自己増殖能、腫瘍形成能を比較する。また、E13.5 sphereについて、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームの解析を行う。特にエピゲノム変化が重要と予想されるので、これを中心にmRNA、miRNA、lncRNAとの関連を解析する。

（倫理面への配慮）

学内の遺伝子組み換え研究計画書及び実験動物計画書の承認を受け、研究倫理を順守して研究を行った。

C. 研究結果

*TH-MYCN*マウスおよび胎児期（E13.5）の野生型マウスの腹腔交換神経節からのSphere培養を樹立した。まず、E13.5 *TH-MYCN*マウスのSphereは既に腫瘍形成能を獲得していることが判明した。そこで、野生型及びMYCN-TgマウスのSphereの差別化がどのようにして起こるのかを明確にするために、ゲノム網羅的メチル化解析をMDB-seq法を用いて行った。加えてmRNA、lncRNA、miRNAの発現解析をマイクロアレイを用いて、ゲノム解析をarray CGHを用いて行った。この結果、*TH-MYCN*マウスでは、ゲノムコピー数の異状はE13.5で起きていること、遺伝子発現の特徴としてMYCN下流遺伝子の発現誘導などが起きていること、DNAメチル化に差別化が起きていることなどが明らかになった。

E. 結論

E13.5 sphereは既に腫瘍形成能を獲得していた。そのゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームの網羅的な解析により、いくつかの特徴的変化が起きている

ることが判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies. *Expert Opin Drug Discov.* 10(1):53-62, 2015.

Nakaguro M, Kiyonari S, Kishida S, Cao D, Murakami-Tonami Y, Ichikawa H, Takeuchi I, Nakamura S, Kadomatsu K. The nucleolar protein PES1 is a marker of neuroblastoma outcome and is associated with neuroblastoma differentiation. *Cancer Sci.* 2014.

Murakami-Tonami Y, Kishida S, Takeuchi I, Katou Y, Maris JM, Ichikawa H, Kondo Y, Sekido Y, Shirahige K, Murakami H, Kadomatsu K. Inactivation of SMC2 shows a synergistic lethal response in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Cell Cycle.* 13(7):1115-31, 2014.

Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, Kadomatsu K. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One.* 9(1):e86813, 2014.

Kishida S, Kadomatsu K. Involvement of midkine in neuroblastoma tumorigenesis. *Br J Pharmacol.* 171(4):896-904, 2014.

Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine: an emerging target of drug deve-

lopment for treatment of multiple diseases. *Br J Pharmacol.* 171(4):811-3, 2014.

Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P. Therapeutic potential of midkine in cardiovascular disease. *Br J Pharmacol.* 171(4):936-44, 2014.

2. 学会発表

Kishida S, Kadomatsu K. The RNA aptamer Against Midkine Suppresses neuroblastoma Xenograft Growth by Attenuating Midkine-Notch2 Pathway (口頭), ANR2014

Tubota S, Kishida S, Kadomatsu K. Elucidation of mechanisms underlying fate determination of neuroblastoma in MYCN-Tg mice. (ポスター), ANR2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

神経芽腫におけるgenetic landscapeに関する研究

研究分担者 滝田 順子 東京大学大学院医学系研究科小児科准教授

研究要旨

神経芽腫における分子病態の全体像を把握するために、大規模検体において、genetic landscape の作成を試みた。その結果、MYCN、ALK および 1p LOH、11q LOH は協調して予後不良に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

神経芽腫における遺伝子変異とゲノム異常の相互関連を明らかにし、分子病態の全体像を把握するために、日本神経芽腫研究グループの登録症例を含む442例の大規模検体において、既知の神経芽腫関連遺伝子のtarget sequencingおよびゲノムコピー数の網羅的解析を行い、genetic landscapeの作成を試みる。

B. 研究方法

まず次世代シーケンサーを用いて、Deep sequencingを行ったが、ターゲット遺伝子として、ALK、ATRX、RAS関連遺伝子PHOX2B、ARID1A/Bの計10個を抽出した。次に、SNPアレイを用いて、網羅的ゲノムコピー数の解を行った。データ解析にはCNAG/AsCNARを用いた。

（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、東京大学の倫理審査委員会で審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（2003年3月）」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

C. 研究結果

366人では何らかのゲノム異常が検出され、このうち91例においては、いずれかの遺伝子変異が認められた。最も頻度の高い遺伝子変異はALK変異であり、約9%であった。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:Hyperploidy、F:silent)が検出された。グループA、C、Dにはstage 4が有意に多く、またグループD は年長児が、グループEには年少児が多く含まれた。

D. 考察

MYCN、ALKおよび1pLOH、11q LOHは協調して予後不良に関与している可能性が示され、他の遺伝子異常は予後や腫瘍の進展に影響しないことが判明した。

E. 結論

大規模検体によるgenetic landscape の作成は、分子病態を理解する上で有用であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hoshino A, Nomura K, Hamashima T, Isobe T, Seki M, Hiwatari M, Yoshida K, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Kanegane H. Aggressive transformation of anaplastic large cell lymphoma with increased number of ALK-translocated chromosomes. *Int J Hematol.* 101:198-202,2015

2) Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J, Yabe H, Goto H, Adachi S, Hayakawa A, Takeshita Y, Sawada A, Atsuta Y, Kato K. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for infant acute lymphoblastic leukaemia with KMT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the paediatric acute lymphoblastic leukaemia working group of the Japan Society for Haematopoietic Cell Transplantation. *Br J Haematol.* 168:564-70, 2015

3) Koh K, Tomizawa D, Moriya Saito A, Watanabe T, Miyamura T, Hirayama M, Takahashi Y, Ogawa A, Kato K, Sugita K, Sato T, Deguchi T, Hayashi Y, Takita J, Takeshita Y, Tsurusawa M, Horibe K, Mizutani S, Ishii E. Early use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with MLL gene-rearrangement-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 29:290-6, 2015

4) Yasudo H, Ando T, Takeuchi M, Nakano H, Itonaga T, Takehara H, Isojima T, Miura K, Harita Y, Takita

- a J, Oka A. Systemic lupus erythematosus complicated with liver cirrhosis in a patient with Papillon-Lefèvre syndrome. *Lupus*. 23:1523-7, 2014
- 5) Shiozawa Y, Takita J, Kato M, Sotomatsu M, Koh K, Ida K, Hayashi Y. Prognostic significance of leukopenia in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett*. 7:1169-1174, 2014
- 6) Hangai M, Watanabe K, Shiozawa R, Hiwatari M, Ida K, Takita J. Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia with Unusual Multiple Bone Invasions: A case report. *Oncol Lett*. 7:991-993, 2014
- 7) 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*. 15:74:3790-801, 2014
- 8) Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, Kato M, Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma. *Cancer Res*. 74:2742-9, 2014
- 9) Fujishiro J, Sugiyama M, Ishimaru T, Uotani C, Tsuchida S, Takahashi N, Shiozawa R, Takita J, Iwanaka T. Cyclic fluctuation of blood pressure in neonatal neuroblastoma. *Pediatr Int*. 56:934-7, 2014
- 10) Kawashima-Goto S, Imamura T, Seki M, Kato M, Yoshida K, Sugimoto A, Kaneda D, Fujiki A, Miyachi M, Nakatani T, Osone S, Ishida H, Taki T, Takita J, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Hosoi H. Identification of a homozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapsed early T-cell precursor ALL patient. *Int J Hematol*. 2014 Nov 28. [Epub ahead of print]
- 11) Takita J, Chen Y, Kato M, Ohki K, Sato Y, Ohta S, Sugita K, Nishimura R, Hoshino N, Seki M, Sanada M, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S. Genome-wide approach to identify second gene targets for malignant rhabdoid tumors using high-density oligonucleotide microarrays. *Cancer Sci*. 105:258-64, 2014
- 12) Sekine T, Komoda F, Miura K, Takita J, Shimadzu M, Matsuyama T, Ashida A, Igarashi T. Japanese Dent disease has a wider clinical spectrum than Dent disease in Europe/USA: genetic and clinical studies of 86 unrelated patients with low-molecular-weight proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 29:376-84, 2014
- 13) Kato M, Shiozawa R, Koh K, Nagatoshi Y, Takita J, Ida K, Kikuchi A, Hanada R. The effect of the order of total body irradiation and chemotherapy on graft-versus-host disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 36:e9-12, 2014
- 14) Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S. Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth. *J Pediatr Hematol Oncol*. 36:166-8, 2014
- 15) 滝田 順子 : 【ビジュアル小児外科疾患のフォローアップ・プログラム-手術直後から遠隔期の問題点まで】 神経芽腫(解説/特集). 小児外科 (0385-6313)46 巻 11 号 Page1159-63(2014.11)
- 16) 滝田 順子 : 小児の臨床検査 小児の遺伝子・染色体検査(解説). 検査と技術 (0301-2611)43 巻 1 号 Page58-62(2015.01)
- 17) 渡邊 健太郎, 加藤 元博, 田中 淳, 中井 まりえ, 関 正史, 林 泰佑, 塩澤 亮輔, 樋渡 光輝, 吉田 健一, 小川 誠司, 松坂 恵介, 深山 正久, 滝田 順子, 岡明. 高用量シクロフォスファミドによるHLA一致同胞間骨髓幹細胞移植後に致死的心毒性をきたした一例(原著論文/症例報告) 日本造血細胞移植学会雑誌3巻4号 Page120-3(2014.10)
- 18) 滝田 順子: 次世代シーケンサーによる小児血液・腫瘍疾患における研究の進展 小児固形腫瘍における治療標的の探索(解説) 日本小児血液・がん学会雑誌 (2187-011X)51 巻 3 号 Page278-84(2014.09)
- 19) 滝田 順子. 【小児の治療指針】 血液・腫瘍 悪性リンパ腫(解説/特集). 小児科診療 (0386-9806)77巻増刊 Page486-8(2014.04)

20) 滝田 順子: 【急性リンパ性白血病(ALL)】 小児 ALL の予後因子と治療(解説/特集) 血液内科 (2185-582X)68 巻 2号 Page203-9(2014.02)

21) 滝田 順子: 急性リンパ性白血病に対するゲノム解析の成果. 血液内科. 69:713-9, 2014

22) 滝田 順子: 急性リンパ性白血病(ALL). 血液フロンティア 24:55-63, 2014

23) 滝田 順子: 神経芽腫の次世代シーケンサーによる解析. 小児外科 47:145-9, 2015

2. 学会発表 (海外)

1) Seki M, Kato M, Oyama R, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Arakawa Y, Kishimoto H, Miyano S, Oka A, Hanada R, Ogawa S, Koh K, Takita J. Genome-wide analysis of T cell acute lymphoblastic leukemia with subsequent development of Langerhans cell histiocytosis. International Society of Paediatric Oncol. (9th Biennial Childhood Leuk Sympo), April 28-29, 2014

2) Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kato M, Hiwatari M, Sanada M, Hanada R, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Genetic Landscapes of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Pediatric Academic Societies and Aisan Society for Pediatric Research (2014), May 3-6, 2014

3) Hiwatari M, Seki M, Kato M, Yoshida K, Ogawa S, Takita J. Analysis for Neuroblastoma Tumors to Reveal Novel Target Using Next-Generation RNA Sequencing, Advances in Neuroblastoma Research (2014), May 13-16, 2014

4) Isobe T, Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Sato Y, Kato M, Hama A, Tanaka Y, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Oka A, Takita J. Genome-wide approach to identify gene targets of pancreatoblastoma. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncol. October 22-25, 2014

5) Hoshino N, Seki M, Yoshida K, Kato M, Nishimura R, Miyano S, Hayashi Y, Oka A, Iwanaka T, Ogawa S, Takita J. Integrated analyses of epigenetic regulatory genes in neuroblastoma. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, October 22-25, 2014

6) Seki M, Shimamura T, Yoshida K, Sato Y, Nishimura R, Kato M, Nagae G, Oka A, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Genome-wide epigenetic and copy number analyses in rhabdomyosarcoma. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, October 22-25, 2014

7) Kato M, Hasegawa D, Koh K, Inagaki J, Kato K, Goto H, Takita J, Yabe H, Sawada A, Atsuta Y, Kato K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective study from the pediatric all working group of the JSHCT. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, October 22-25, 2014

8) Soejima T, Sato I, Takita J, Koh K, Maeda M, Ida K, Kamibeppu K. The influences of school reentry support on relationships that adolescents with cancer share with peers and teachers. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, October 22-25, 2014

(国内)

1) 眞下秀明, 塩澤亮輔, 渡邊健太郎, 加藤元博, 樋渡光輝, 藤代準, 滝田順子, 岩中督. APC遺伝子異常を有する肝芽腫再発の1例. 関東甲信越地区小児がん登録研究会, 2014年3月21日, 東京

2) 関正史, 西村力, 吉田健一, 加藤元博, 樋渡光輝, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子, 岡明. RNAシーケンス解析による横紋筋肉腫における新規転座の検索. 第117回日本小児科学会, 平成26年4月11日~13日

3) 西村力, 吉田健一, 白石友一, 関正史, 眞田昌, 岡明, 林泰秀, 宮野悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いた横紋筋肉腫の遺伝子変異全体図. 第117回日本小児科学会, 平成26年4月11日~13日

4) 星野論子, 西村力, 関正史, 加藤元博, 吉田健一, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 岡明, 滝田順子. 全エクソーム解析を用

いた肝芽腫における網羅的ゲノム解析.
第117回日本小児科学会, 平成26年4月11日~13日

5) 吉田美沙, 関正史, 星野論子, 樋渡光輝, 加藤元博, 吉田健一, 小川誠司, 林泰秀, 滝田順子, 岡 明. 次世代シーケンサーを用いた神経芽腫における11q領域の責任遺伝子探索. 第117回日本小児科学会, 平成26年4月11日~13日

6) 瓜生久美子, 関正史, 加藤元博, 星野論子, 樋渡光輝, 中川原章, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子, 岡 明. 神経芽腫120検体におけるゲノム異常と予後解析. 第117回日本小児科学会, 平成26年4月11日~13日

7) 塩澤亮輔, 渡邊健太郎, 樋渡光輝, 加藤元博, 滝田順子, 岡 明. 当院でのテイコプラニン標準投与における血中濃度解析. 第117回日本小児科学会, 平成26年4月11日~13日

8) 樋渡光輝, 渡邊健太郎, 塩澤亮輔, 加藤元博, 滝田順子, 岡 明. 再発を繰り返すランゲルハンス組織球症の1例. 第117回日本小児科学会, 平成26年4月11日~13日

9) 塩澤亮輔, 関正史, 星野論子, 吉田健一, 吉田美沙, 瓜生久美子, 加藤元博, 小川誠司, 滝田順子, 岡 明. 次世代シーケンサーによる小児胚細胞腫瘍の変異解析. 第73回日本癌学会学術総会, 平成26年9月25日~27日

10) 瓜生久美子, 西村力, 吉田健一, 関正史, 星野論子, 吉田美沙, 加藤元博, 樋渡光輝, 林泰秀, 田尻達郎, 中川原章, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫大規模検体におけるgenetic landscapeと予後解析. 第73回日本癌学会学術総会, 平成26年9月25日~27日

11) 吉田美沙, 関正史, 加藤元博, 瓜生久美子, 星野論子, 西村力, 樋渡光輝, 吉田健一, 岡 明, 小川誠司, 林泰秀, 滝田順子. 神経芽腫における11q領域に関連した責任遺伝子探索. 第73回日本癌学会学術総会, 平成26年9月25日~27日

12) 星野論子, 関正史, 吉田健一, 加藤元博, 白石友一, 佐藤悠佑, 千葉健一, 宮野悟, 林泰秀, 岩中督, 岡明, 小川誠司, 滝田順子. エクソーム解析とトランスクリプトーム解析を用いた肝芽腫における統合解析. 第73回日本癌学会学術総会, 平成26年9月25日~27日

13) 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Flotillin-1は、ALKの細胞膜結合の調整節を介してALKシグナルを制御する. 第73回日本癌学会学術総会,

平成26年9月25日~27日

14) 関正史, 吉田健一, 白石友一, 佐藤悠佑, 島村徹平, 千葉健一, 田中洋子, 花田良二, 岡 明, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 胸膜肺芽腫におけるDICER 1 RNase IIIB ドメイン変異のmiRNA産生への影響. 第73回日本癌学会学術総会, 平成26年9月25日~27日

15) Hiwatari M, Seki M, Shiozawa R, Kato M, Yoshida K, Ogawa S, Takita J. Transcriptome profiling of neuroblastoma by RNA-Seq. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

16) Hoshino N, Seki M, Yoshida K, Kato M, Sato Y, Kasahara M, Nakazawa A, Miyano S, Hayashi Y, Oka A, Iwanaka T, Takita J. Integrated analysis of clonal evolution in hepatoblastoma with familial adenomatous polyposis. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

17) Shiozawa R, Seki M, Hoshino N, Yoshida K, Yoshida M, Uryu K, Hiwatari M, Kato M, Ogawa S, Oka A, Takita J. Landscape of genomic alteration of pediatric germ cell tumors. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

18) Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraishi Y, Sato Y, Hoshino N, Nagae G, Okuno Y, Hosoi H, Tanaka Y, Okita H, Taguchi T, Hanada R, Oka A, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular clusters in rhabdomyosarcoma. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

19) Hoshino N, Seki M, Yoshida K, Kato M, Nishimura R, Sato Y, Miyano S, Nagae G, Hayashi Y, Oka A, Aburatani H, Iwanaka T, Ogawa S, Takita J. The role of epigenetic dysregulation in neuroblastoma. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

20) 渡邊健太郎, 加藤元博, 張田豊, 関口昌央, 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 滝田順子, 岡 明. 中心静脈カテーテル関連血流感染 (CRBSI) の予防に対する試みとその効果. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

21) 磯部知弥, 関正史, 吉田健一, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 佐藤悠佑, 加藤元博, 井口晶裕, 濱麻人, 田中祐吉,

宮野悟, 小川誠司, 岡 明, 滝田順子. 再発芽腫のマルチサンプリングによる腫瘍内不均一およびクローン進化の考察. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

22) 関口昌央, 加藤元博, 渡邊健太郎, 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 林泰佑, 平田陽一郎, 滝田順子, 岡 明. 重篤な慢性心不全を合併した21トリソミー児のAMKLに対する緩和的化学療法. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

23) 瓜生久美子, 西村力, 吉田健一, 関正史, 星野論子, 吉田美沙, 加藤元博, 樋渡光輝, 岡 明, 林泰秀, 田尻達郎, 中川原章, 滝田順子. 神経芽腫におけるターゲット遺伝子の深々度シーケンス. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

24) 吉田美沙, 関正史, 加藤元博, 瓜生久美子, 星野論子, 西村力, 樋渡光輝, 吉田健一, 岡 明, 小川誠司, 林泰秀, 滝田順子. 神経芽腫におけるATM pathway 関連遺伝子の異常. 第56回日本小児血液・

25) 物井綾香, 関正史, 吉田健一, 佐藤悠佑, 加藤元博, 樋渡光輝, 星野論子, 竹谷健, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 宮野悟, 岡 明, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫再発2例に対する網羅的ゲノム解析. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

26) 木本豪, 加藤元博, 関口昌央, 渡邊健太郎, 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 阿部浩幸, 田中麻理子, 武笠晃丈, 滝田順子, 岡 明. 先天性高悪性脳腫瘍の1例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

27) 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 加藤元博, 田中淳, 滝田順子, 岡 明. 慢性活動性EBV感染症の1倍検例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

28) 松野良介, 大貫裕太, 藤田祥央, 花村麻衣子, 塚田大樹, 秋山康介, 外山大輔, 池田祐一, 関正史, 加藤元博, 樋渡光輝, 滝田順子, 磯山恵一. ALK陽性思春期神経芽腫に対するクリゾチニブの治療経験. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

29) 清水啓道, 本多秀俊, 大野能之, 長瀬幸恵, 加藤元博, 樋渡光輝, 滝田順子, 岡 明, 鈴木洋史. 小児がん化学療法に対する病棟薬剤師の取り組み. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

30) 星野顕宏, 野村恵子, 関正史, 樋渡光輝, 吉田健一, 小川誠司, 滝田順子, 金兼弘和. 未分化大細胞型リンパ腫におけるALK転座染色体の過剰を伴った急性転化. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

31) 藤代準, 杉山正彦, 新井真理, 石丸哲也, 吉田真理子, 魚谷千都恵, 宮川亨平, 加藤元博, 滝田順子, 土田晋也, 高橋尚人, 岩中督. 腎静脈浸潤を認めた先天性間葉芽腎腫の1例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

32) 柚津晋平, 合井久美子, 渡邊敦, 犬飼岳史, 蓮田憲夫, 高野邦夫, 近藤哲夫, 中澤温子, 宮地充, 細井創, 滝田順子, 後藤裕明, 杉田莞爾. FGFR-1増幅を伴う治療抵抗性未分化肉腫の1例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

33) 宮川亨平, 藤代準, 高見尚平, 加藤怜子, 出家亨一, 魚谷千都絵, 吉田真理子, 石丸哲也, 新井真理, 杉山正彦, 岩中督, 加藤元博, 渡邊健太郎, 滝田順子, 柴原順二. Congenital and childhood plexiform (multinodular) cellular schwannoma の1乳児例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

34) 岩崎美和, 割田陽子, 滝田順子, 加藤元博, 樋渡光輝, 大友英子, 宮里由香里. 小児造血細胞移植後フォローアップ外来の取り組みと課題. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 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

候補標的分子の分子生物学的解析

研究分担者 江成 政人 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

神経芽腫の約10%程度において、ALK 遺伝子の遺伝子増幅や変異活性化が起こっていることが知られており、ALK 阻害剤が ALK 陽性神経芽腫の分子標的薬候補として考えられている。また、神経芽腫において、p53 遺伝子の変異はほとんどないことが知られている。そこで、本研究では、ALK 遺伝子の遺伝子増幅や活性化変異を持つ神経芽腫において p53 経路の活性化が ALK 阻害剤耐性を減弱させるか調べた。その結果、ALK 阻害剤や p53 活性化剤単独に比べ、併用処理が ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。更に、特殊な細胞培養用の培地を用いて、がん幹細胞様の細胞をスフェア形成させ、その際の ALK 阻害剤耐性についても調べたところ、ALK 阻害剤と p53 活性化剤との併用が有効であることが分かった。

A. 研究目的

ALK 遺伝子は神経芽腫の約10%程度で遺伝子増幅や変異活性化が見られるがん遺伝子で、ALK 阻害剤が ALK 陽性神経芽腫の分子標的薬候補として考えられている。しかしながら、多くの場合 ALK 阻害剤に対する治療抵抗性が問題となるが、その基本的な分子メカニズムやがん幹細胞様性質との関連性など、不明な点が多い。また、ほとんどの神経芽腫において、p53 遺伝子の変異はなくどのようなメカニズムで p53 経路が不活性化されているのか詳細にわかっていない。以前の私達の研究から、ALK 融合を持つリンパ腫や肺腺がんにおいて、p53 遺伝子の変異がほとんどなく ALK による p53

のリン酸化が p53 経路を不活化すること、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が、ALK 融合陽性リンパ腫に対して非常に有効であることを見出した。

そのような背景のもと、本研究では、ALK の遺伝子増幅あるいは活性化変異を持つ神経芽腫において、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が、神経芽腫のがん幹細胞様性質を持つ細胞の増殖を効果的に抑制するか検討するとともに、ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性メカニズムを解明することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト神経芽腫 NB39-nu 細胞及び SHSY-5Y 細胞は10%牛胎児血清 (FBS)

と抗生物質ペニシリン及びソトレプトマイシンを含む PRMI-1640 培地で、37℃、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。スフェア形成能のアッセイ系には、20 ng/ml 上皮成長因子 (EGF)、10 ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 及び B27 添加物を含む DMEM/F-12 培地を用い、NB39-nu 細胞及び SHSY-5Y 細胞を低細胞結合プレート中で培養した。ALK 阻害剤には、Crizotinib、CH5424802 及び TAE684 を用い、様々な濃度で神経芽腫由来の細胞を処理した。一方、p53 活性化剤には、Nutlin-3a を用い、単剤あるいは ALK 阻害剤と併用で細胞を処理した。細胞生存率の測定には、WST-8 をベースとした Cell counting kit を用いた。

(倫理面への配慮)

臨床由来の検体を使用しておらず、該当しない。

C. 研究結果

ALK 遺伝子の遺伝子増幅を持つ神経芽腫 NB39-nu 細胞において、p53 活性化剤 Nutlin-3a が ALK 阻害剤に対する薬剤耐性を軽減させるか調べた。その結果、ALK 阻害剤や p53 活性化剤単剤と比較して、併用処理が NB39-nu 細胞の ALK 阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。また、ALK 遺伝子の活性化変異を持つ神経芽腫 SHSY-5Y 細胞においても、同様な結果を得た。次に、がん幹細胞様形質の特徴としてスフェア形成能の有無が用いられている。そこで、上記神経芽

腫由来の細胞におけるスフェア形成能の実験系の構築を試みた。様々な培養条件を用いて検討したところ、20 ng/ml 上皮成長因子 (EGF)、10 ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、及び B27 添加物の存在下、NB39-nu 細胞及び SHSY-5Y 細胞共にスフェア形成能を示した。そのスフェア形成のアッセイ系を用いて、がん幹細胞様形質を持つ細胞塊を形成させ、ALK 阻害剤耐性における p53 活性化剤の影響について調べた。2次元平面培養の時と同様、この実験系を用いた解析からも p53 活性化剤が ALK 阻害剤耐性を軽減させるのに有効であることがわかった。

D. 考察

本研究において、p53 活性化剤である Nutlin-3a が ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を軽減させることがわかった。特にがん幹細胞様性質を持つ神経芽腫に対しても ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が相乗効果を示し、ALK 陽性神経芽腫に対してきわめて有効であることが示唆された。しかしながら、ALK 陽性神経芽腫において p53 経路がどのようにして不活化しているのか、併用処理がなぜ有効なのかについての分子メカニズムや神経芽腫における ALK 阻害剤耐性の分子メカニズム等理解に乏しく、今後の解析が必要であろう。

E. 結論

以上の結果、p53 活性化は、がん幹細胞様性質を持つ ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を軽減させ、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が ALK 陽性神経芽腫に対し、きわめて有効的な治療法になり得ることが期待できる結果を導き出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ryo otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Matsushima-Hibiya, Makoto Miyazaki, Fumio Tashiro, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Takahiro Ohiya, Uun Yokota, Hitoshi Nakagawa, Yoichi Taya, and Masato Enari: TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, 18691-18696, 2014

2) Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Koh Furuta, Yoko Shimada, Hideaki Ogiwara, Shunichi Watanabe, Hiroshi Nokihara, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nanno, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Curtis C. Harris, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida and Takashi Kohno: Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung

Adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**. 20, 3087-3093, 2014

3) Chihiro Otsubo, Ryo Otomo, Makoto Miyazaki, Yuko Matsushima-Hibiya, Takashi Kohno, Reika Iwakawa, Fumitaka Takeshita, Hirokazu Okayama, Hitoshi Ichikawa, Hideyuki Saya, Tohru Kiyono, Takahiro Ochiya, Fumio Tashiro, Hitoshi Nakagama, Jun Yokota, and Masato Enari: TSPAN2 is Involved in cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression. **Cell Reports**, 7, 527-538, 2014

2. 学会発表

1) TSPAN2 is a factor responsible for promotion of invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. Makoto Miyazaki, Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014年11月25日

2) TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Makoto Miyazaki, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014年11月25日

3) CD74-NRG1 はがん幹細胞性を促進する可能性のある腫瘍性タンパク質である。Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu

Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、

2014年11月25日

4) Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. Takashi Nakaoku, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Hideaki Ogiwara, Hiroshi Nokihara, Hirokazu Okayama, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida, Takashi Kohno. 第73回日本癌学会学術総会、口頭発表、横浜、2014年9月26日

5) CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties. Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第73回日本癌学会学術総会、ポスター発表、横浜 2014年9月27日

6) INACTIVATION OF P53 PATHWAY IN ALK FUSION-POSITIVE TUMORS THROUGH DIRECT TYROSINE PHOSPHORYLATION OF P53: Masato Enari. the 16th International p53 Workshop, ポスター発表、sweden, 2014年6月16日

H. 知的所有権の出願・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

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

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

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

本分担研究では、神経芽腫の進行例に対する新たな治療法開発を目的とした発がん分子機構の解明のために、研究班各グループから候補遺伝子のスクリーニング用に作製された神経芽腫細胞株やスフェア化細胞を対象として、マイクロアレイを用いたアレイ CGH 法によるゲノム変化の網羅的解析と遺伝子発現プロファイルを担当する。H26 年度は 3 種類の神経芽腫細胞株を対象に、スフェア化前後の遺伝子発現プロファイルの変化を 8x60K 遺伝子発現アレイを用いて解析した。GSEA 遺伝子アノテーション解析、パスウェイ解析から、スフェア化時に発現が上昇するものとして、神経分化マーカー遺伝子群や神経特異的チロシンキナーゼレセプター遺伝子等が、発現が抑制されるものとして TP53 により転写制御を受けるアポトーシス関連遺伝子群やヘッジホッグファミリー遺伝子等が抽出された。今後は神経堤細胞へ分化させた iPS 細胞等を対象とした解析を予定している。

A. 研究目的

近年の化学療法進展により、小児がんの予後は飛躍的に向上したものの、一部の小児がんについては依然として予後不良であり、早期層別化と新たな治療法の開発が望まれる。代表的な難治性小児がんの一つ、神経芽腫の進行例では、*MYCN* がん遺伝子の増幅や *ALK* チロシンキナーゼ遺伝子の異常などのゲノム異常が知られているが、次世代シーケンサーによる解析から見いだされる遺伝子変異の数は、成人がんに比べると非常に少ないことがわかってきた。そこで、このような“遺伝子変異を伴わないがん”のサブセットの神経芽腫について、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、その発がん分子機構を解明することを目的とする。本分担研究では、これまでに取

得した神経芽腫臨床検体における遺伝子発現やゲノム異常等の分子プロファイルのデータをもとに、遺伝子変異を伴わないタイプの神経芽腫の特徴を抽出するとともに、研究班各グループからの候補遺伝子のスクリーニング用に作製された神経芽腫細胞株やスフェア化細胞を対象として、マイクロアレイを用いたアレイ CGH 法によるゲノム変化の網羅的解析と遺伝子発現プロファイルを行い、過去の神経芽腫症例のプロファイルデータベースと比較することにより、治療標的となる候補遺伝子や特異的マーカーの検索を行う。

B. 研究方法

1. 解析対象：

- ①神経芽腫細胞株のスフェア化時に特異的な発現を示す遺伝子の抽出：
MYCN 増幅を伴う 3 種類の神経芽腫細胞

株 IMR32、NGP、SMS-SAN について、専用培地を用いてスフェア化し、スフェア化前後の細胞株から抽出された RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

②スフェア化に関与する CDX1 遺伝子によって発現が誘導される遺伝子群の検索：スフェア化神経芽腫細胞株で有意に発現レベルが上昇し、その形質獲得に関与が予測される CDX1 遺伝子を 2 種類の神経芽腫細胞株 SH-SY5Y、SK-N-BE に過剰発現させ、細胞より抽出された RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

2. 網羅的遺伝子発現解析：

上記細胞株由来の total RNA 200ng を出発材料に、ヒト遺伝子発現解析アレイ（アジレント社 Human Genome oligo DNA microarray、8x60k フォーマット）を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。Feature Extraction によりハイブリダイゼーション後の数値化を行った後、GeneSpring ソフトウェアを用いて各遺伝子の相対発現量の算出とスフェア化前後、あるいは CDX1 過剰発現時の遺伝子発現レベルの比較を行った。

（倫理面への配慮）

本年度は細胞株を用いた遺伝子発現解析のみを行い、臨床検体を用いた実験ならびに臨床データを用いた解析は行っていない。来年度以降で臨床検体を用いた実験を行う場合は、関連法規ならびに指針を遵守し、事前に倫理審査委員会ならびに実施機関長の承認を得た上で、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する。

C. 研究結果

1. 神経芽腫細胞株のスフェア化時に特異的な発現を示す遺伝子の抽出：

神経芽腫がん幹細胞の遺伝子発現の

特徴を把握する目的で、*MYCN* 増幅を伴う 3 種類の神経芽腫細胞株 IMR32、NGP、SMS-SAN を、専用培地を用いてスフェア化し、8x60k アジレント社ヒト遺伝子発現解析用アレイを用いてスフェア化前後の遺伝子発現プロファイルの比較を行った。 $p < 0.001$ 、Fold change > 2 の絞り込み条件とした統計解析により、約 1080 遺伝子が抽出された。GSEA 遺伝子アノテーション解析、パスウェイ解析から、スフェア化時に共通して発現レベルが上昇するものとして、神経分化マーカー遺伝子群や神経特異的チロシンキナーゼレセプター遺伝子等が、発現レベルが抑制されるものとして *TP53* により転写制御を受けるアポトーシス関連遺伝子群やヘッジホッグファミリー遺伝子等が抽出された。

2. CDX1 遺伝子によって発現が誘導される遺伝子群の検索：

CDX1 遺伝子は、主任研究者（上條）らのグループによりスフェア化神経芽腫細胞特異的な転写因子として同定された分子である。上記スフェア化細胞 IMR32、NGP、SMS-SAN においても、スフェア化前に比較して、約 160 倍、25 倍、14 倍の発現レベルの増加が確認されている。本研究では、2 種類の神経芽腫細胞株 SH-SY5Y (*MYCN* 増幅なし)、SK-N-BE (*MYCN* 増幅あり) に CDX1 を過剰発現させた際に発現レベルが変化する遺伝子群の抽出を行った。2 種類の細胞株の間で共通に発現レベルに有意な変化があった遺伝子は約 320 種類であった。CDX1 発現レベルと強い正の相関を示す遺伝子群には、幹細胞性ならびに浸潤に関与するといわれる Wnt シグナルファミリー遺伝子の一つが含まれていた。これらについては、今後神経芽腫のスフェア化細胞における意義について検証を進めたい。

D. 考察

今回抽出した遺伝子群の中から特に重要なものを絞り込むため、さらに細胞の種類を加えた解析と、臨床検体の遺伝子発現プロファイルデータベースと患者の転帰情報等の比較解析を進める予定である。

E. 結論

H26年度は基礎的データの取得を目的に3種類のスフェア化細胞株における遺伝子発現プロファイルの特徴を取得した。今後は神経堤細胞へ分化させたiPS細胞等を対象とした解析を予定している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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(14):3790-801, 2014.

2) Oberthuer A, Juraeva D, Hero B, Volland R, Sterz C, Schmidt R, Faldum A, Kahlert Y, Engesser A, Asgharzadeh S, Seeger R, Ohira M, Nakagawara A, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Bénard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Grundy RG, Orthmann 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.* in press.

2. 学会発表

1) Ohira M, Kamijo T, Nakamura Y, Takimoto T, Nakagawa A, Takita J, Iehara T, Takahashi H, Tajiri T, Nakagawara A: Japan Neuroblastoma Study Group. Genome-based sub-classification of neuroblastoma: A retrospective study by using 573 neuroblastoma samples obtained in Japan. *Advances in Neuroblastoma Research Congress 2014 (ANR2014)*, Cologne. 5月13日-16日, 2014.

2) 大平美紀、辰野健二、堤 修一、山本尚吾、中村洋子、上條岳彦、油谷浩幸、中川原 章. 神経芽腫難治性サブタイプの網羅的ゲノム解析による予後関連ゲノム異常の検索. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山, 11月28日-30日, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し