

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の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

・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プロト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クセシ系を樹立し、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