

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く。
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 κ (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, Kamiichi 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