

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 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://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っており、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 (±200bp) 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 を門松分担任から供与を受け、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を明らかにする。

## 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