

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

近年の化学療法の進展により、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：

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。

スフェア化に關与する 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、その形質獲得に關与が予測される 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關与するといわれる 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, Nakagawara 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

