

201438064A

委託業務成果報告書

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

小児固形腫瘍とリプログラミングの破綻：
発がん機構解明から臨床応用へに関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 中川原 章

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、地方独立行政法人 佐賀県医療センター好生館が実施した平成26年度「小児固形腫瘍とリプログラミングの破綻：発がん機構解明から臨床応用へ」の成果を取りまとめたものです。

委託業務成果報告書

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

小児固形腫瘍とリプログラミングの破綻：
発がん機構解明から臨床応用へに関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 中川原 章

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、地方独立行政法人 佐賀県医療センター好生館が実施した平成26年度「小児固形腫瘍とリプログラミングの破綻：発がん機構解明から臨床応用へ」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

小児固形腫瘍とリプログラミングの破綻： 発がん機構解明から臨床応用へに関する研究 中川原 章	----- 1
--	---------

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 神経芽腫発生のエピジェネティクス異常とNCYMの役割に関する研究 中川原 章	----- 5
2. 小児がん発生と細胞初期化に関する研究 山田 泰広	----- 8
3. 腎芽腫の発生や進展を制御する標的分子の同定に関する研究 金子 安比古	-----10
4. 胞巣型横紋筋肉腫細胞における筋最終分化の誘導と治療法の開発に関する研究 細井 創	-----13
5. 肝芽腫の発生、進展に関わるリプログラミング因子の同定に関する研究 檜山 英三	-----15
6. ユーイング肉腫におけるリプログラミング関連因子の同定に関する研究 大喜多 肇	-----20

III. 学会等発表実績

-----23

IV. 研究成果の刊行物・別刷

-----29

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括・業務項目）

研究開発課題名：小児固形腫瘍とリプログラミングの破綻：発がん機構解明から臨床応用へ

業務主任者：中川原 章 佐賀県医療センター好生館 理事長

研究要旨：

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）作製の過程においてリプログラミングに失敗した細胞から小児がんに類似したがんが発生する事実をマウスで発見し、ヒト小児芽腫発生における細胞初期化の網羅的遺伝子発現について、班員間での共同研究を開始することが可能となった。神経芽腫では、遺伝子進化によって出来たヒト特異的な NCYM 蛋白が、MYCN のみならずリプログラミング因子である OCT4 を誘導し、それらが positive feedback loop を形成して、ヒト神経芽腫の転移促進に関与していることが明らかになった。胞巣型横紋筋肉腫においては、PAX3-FOXO1A キメラ遺伝子ノックダウンによる分化誘導系を用い、ゲノムメチル化とヒストン修飾について解析し、腫瘍発生の意義及び分化誘導療法の開発を目指す方向性が見えた。腎芽腫では、臨床検体のゲノム解析から5つのタイプに分類でき、3つのタイプにエピジェネティックな変化が関与していると思われた。肝芽種においては、ゲノム解析からリプログラミングに係る遺伝子候補を抽出し、エピジェネティックな変化が悪性度の上昇に関与することを明らかにした。ユーイング肉腫では、EWSR1-FLI1 による腫瘍発生過程に DNA メチル化も関連することが示唆された。

分担研究者：

中川原 章・佐賀県医療センター好生館・理事長
山田泰治・京都大学iPS細胞研究所・教授
金子安比古・埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所腫瘍遺伝学・統括参与
細井 肇・京都府立医科大学大学院医学研究科・小児発達学・小児腫瘍学・教授
檜山英三・広島大学自然科学研究支援開発センター/広島大学病院小児外科・小児腫瘍学・教授
大喜多 肇・慶應義塾大学医学部病理学教室病理学・准教授

A. 研究目的

わが国における小児がんは治癒率が向上しているが、難治性のもも多く、その臨床像は多岐にわたる。また、成人がんと異なり、小児がんは環境因子による影響は少なく、一部の遺伝性小児がんを除き、その発症メカニズムは不明である。近年、小児がんにおいては遺伝子変異が著しく少なく、エピジェネティックな異常の関与が示唆されるようになったが、具体的なエピデンスは得られていない。

しかし最近、いくつかの重要な発見がわが国においてなされ、iPS 細胞作製の過程においてリプログラミングに失敗した細胞から腎芽腫等の小児がんが発生する事実がマウスで見いだされた（Cell, 2014）。また、神経芽腫において、MYCN がん遺伝子から cis-antisense に読まれた *de novo* evolved gene NCYM が見いだされた（PLoS Genetics, 2014）。さらに、

エピジェネティックな異常が起き、組織発生のプログラム及びリプログラムに異常を来した結果、小児がんが発生し、悪性度まで規定していることが示唆された。

そこで、我々は本研究において、組織発生過程のプログラミングあるいはリプログラミングの破綻がヒト小児がん発生にどのように関わるかを明らかにし、日本小児がん研究グループ（JCCG）と共同して、未知の標的分子やパスウェイを同定し、新しい診断法や治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

ヒト小児がんにおいても、完全初期化が可能であるかを検討した。Wilms 腫瘍、神経芽腫、ラブドイド腫瘍細胞株に piggyBac トランスポゾンを用いて、ドキシサイクリン誘導性初期化遺伝子を導入した。各細胞株にドキシサイクリン処理により初期化因子を誘導した後に、細胞形態の変化を観察するとともに、細胞初期化マーカー遺伝子の発現を調べることで、小児がん細胞株の初期化を検討した。細胞レベルにおける各種遺伝子の機能解析には、標準的な分子生物学的実験手法を用いた。

遺伝子の発現抑制には siRNA を用い、蛋白質の細胞内局在は免疫蛍光法によった。腫瘍組織内の蛋白質発現および局在の検索は免疫組織化学によった。遺伝子発現量の測定は定量的 RT-PCR によった。NCYM の DNA 結合能に関しては、クロマチン免疫沈降法を用いて調べた。転写活性化能については、Luciferase reporter assay を用いた。

腎芽種検体に関しては、SNP アレイ CGH 解析による 11p uniparental disomy (UPD) と染色体異常の解析、WT1 遺伝子変異解析、H19-DMR の COBRA 解析による IGF2-H19 領域のメチル化状態の解析を実施した。

テロメラーゼ活性は TRAP (telomeric repeat amplification protocol) 法にて測定し、ヒトテロメラーゼの触媒部分である TERT (telomerase reverse transcriptase) の発現レベルを RT-PCT で測定した。

Doxycycline (DOX) 存在下に EWSR1/FLI1 の発現を誘導できる細胞 UET13-TR-EWSR1/FLI1 細胞を DOX 添加培地、あるいは無添加培地にて培養した。

GenomStudio を用いて階層的クラスタリング等の解析を行い、さらに DOX 誘導下に高メチル化あるいは低メチル化が誘導される遺伝子を抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (2001 年 3 月)」に則って行い、患者および患者家族に不利益が生じないよう万全の対策を講じ、必要な研究は倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. ヒト多能性幹細胞とヒト小児がん細胞の初期化
多能性幹細胞の転写ネットワークにおける 3 つの異なる転写モジュールを用いて、ヒト肝芽腫とヒト多能性幹細胞を比較検討した。肝芽腫では多能性幹細胞における Myc モジュールが活性化していることが分かった。また、多能性維持に関わる Core モジュールも一部で活性化していることが示唆された。肝芽腫と多能性幹細胞の類似性が明らかとなった。Wilms 腫瘍、神経芽腫、ラブドイド腫瘍細胞株に、初期化因子誘導可能遺伝子を導入したところ、初期化因子発現誘導により、がん細胞株は形態を変化させ、細胞初期化の早期マーカー PODXL の発現誘導が確認された。しかしながら、初期化因子は約 1 週間後にはサイレンシングされ、持続的な遺伝子誘導が不可能であり、完全ながん細胞株の初期化は不可能であった。

2. NCYM-OCT4-MYCN の positive feedback loop
臨床検体の MYCN 増幅例においてのみ、OCT4 の高発現が神経芽腫の予後の悪さと有意に相関していた。また、NCYM mRNA 発現レベルは OCT4、NANOG の発現と正に相関し、KLF4 の発現とは負に相関した。NCYM を神経芽腫細胞に過剰発現したところ、OCT4、NANOG、LIN28、SOX2 が発現誘導され、luciferase reporter assay を行ったところ、OCT4 は MYCN の E-box に結合し、直接転写誘導していた。

神経芽腫細胞 BE (2) -C I-type cells を all-trans retinoic acid (ATRA) で分化させた際に、MYCN のみならず NCYM、OCT4、SOX2 の蛋白質レベルでの発現低下が見られた。

3. ARMS 細胞における筋最終分化

PAX3-FOXO1 かつ siCDK4/6 ノックダウン ARMS 細胞が筋最終分化 (多核化、Myosin heavy chain 染色陽性) することを確認した。また、PAX3-FOXO1 ノックダウン ARMS 細胞に CDK4/6 活性阻害剤である PD 0332991 を投与すると、筋最終分化が誘導された。さらに、shPAX3-FOXO1 発現レンチウイルスを PAX3-FOXO1 陽性ヒト ARMS 細胞株 Rh30 に感染させることで、PAX3-FOXO1 安定ノックダウン株の作成に成功した。

4. 腎芽腫の WT1 及び IGF2 インプリントによる層別化

WT1 異常の有無により、WT1 変異腫瘍 43 例 (S2 群)、WT1 野生型腫瘍 81 例に分類した。次に、81 例を染色体異常の有無により、異常のない 14 例 (S1 群) と異常ありの 67 例に分類した。この 67 例を IGF2 のインプリント状態により、インプリント正常群 (S3 群、ROI) 13 例、IGF2-UPD 群 (S4 群) 26 例、インプリント消失群 (S5 群、LOI) 28 例に分類した。患者年齢は S1 群が 14 カ月で最年少、S5 群が 57 カ月で最年長、S2、S3、S4 群は 23-29 カ月で両群の間であった。

5. 肝芽種の網羅的遺伝子解析

肝芽種の遺伝子発現検索では、層別化クラスタリングにて予後良好例と予後不良症例を層別化する遺伝子が 344 遺伝子抽出された。また、テロメラーゼ活性レベルが予後と関連した。しかし、興味あることに、TERT 発現レベルは、Wnt/ β -カテニン遺伝子異常のない腫瘍で活性化が顕著であった。

6. ユーイング肉腫のメチル化解析

UET13-TR-EWSR1-FLI1 の網羅的メチル化解析を Infinium DNA メチル化アッセイを用いて行い、階層的クラスタリングを行った。その結果、UET13-TR-EWSR1-FLI1 の DOX (+) および DOX (-) とユーイング肉腫細胞がそれぞれクラスターを形成し、それぞれの細胞に特徴的なメチル化パターンの存在が示唆され、EWSR1-FLI1 発現のみでは、UET13 細胞の DNA メチル化パターンを全面的にユーイング肉腫様に変化させるには至らないことが示唆された。

D. 考察

ヒト Wilms 腫瘍検体と同様にしてヒト肝芽腫においても網羅的遺伝子発現パターンが、ヒト多能性幹細胞と部分的に類似することが明らかとなった。今回は一般に公開されている遺伝子発現データを利用したが、今後は JCCG に登録された小児がん検体を、他の班員と共同で解析予定である。小児がん細胞に初期化因子を誘導することで、部分的な細胞の初期化が誘導されることが明らかとなった。しかし、一方で、完全な細胞初期化は困難であった。

本研究によって、OCT4 が MYCN/NCYM と positive feedback loop を形成し、神経芽腫細胞の幹細胞性の

維持に関与していることが示唆された。また、OCT4の発現レベルがMYCN増幅した神経芽腫においてのみ予後因子となっていた。OCT4とMYCN/NCYMのpositive feedback loopのメカニズムは、NCYMがMYCNを安定化することによりOCT4を発現誘導し、OCT4がMYCNを転写誘導することによってNCYMの発現を高めることによるものと思われた。ATRAによる神経芽腫細胞の分化誘導は、このpositive feedback loopが壊れることによってもたらされた可能性がある。したがって、NCYMがMYCN増幅した神経芽腫の悪性化に貢献している理由として、OCT4による神経芽腫のがん幹細胞性の維持に関与していることが示唆された。

横紋筋肉腫においては、ARMS腫瘍発生後にエピジェネティックな制御により分化が抑制されており、さらにこの制御を調節することで再び分化が誘導できた。実際、今回のモデル(PAX3-FOXO1およびRbの活性阻害)では、筋最終分化が誘導できた。今後、このモデルを用い、ARMSの分化制御をエピゲノムの点から解明していきたいと考えている。

腎芽腫では、S1群は患者年齢が最も若く、ゲノム異常を認めないので、山田等のマウスモデルと同様に、部分初期化により腎芽腫が発生した可能性がある。今後、網羅的発現・メチル化解析を実施する。S5群のDNAメチル化制御遺伝子群とPolycomb遺伝子群はエピジェネティック異常に関与しているため、両群の遺伝子異常をもつ腫瘍は、同じエピジェネティック異常の原因となるmiRNA異常をもっている群と一致すると予想した。

肝芽腫の発症には、胎内でのエピジェネティックな変化と一部ゲノムレベルでのジェネティックな変化に関与していることが示唆された。中でもWnt/ β -cateninシグナルの異常によって癌化し肝芽腫が発症し、さらに、TERTやc-mycの活性化が悪性度の上昇に関与している可能性が示唆された。

ユーイング肉腫では、EWSR1-FLI1により生じるメチル化異常は、骨髄間葉系幹細胞とユーイング肉腫細胞のメチル化の差異と比較するとかなり小さいものの、少数のCpGサイトの高メチル化を引き起こすと考えられた。一方で、クラスター解析の結果からは、実験的なEWSR1-FLI1発現だけでは、UET13からユーイング肉腫細胞のメチル化パターンは変化を惹起するには不十分で、もともとの細胞のメチル化パターンの影響やDNAメチル化の変化にはより時間が必要という可能性も考えられた。

E. 結論

ヒトWilms腫瘍検体と同様にしてヒト肝芽腫においても、一部で多能性幹細胞との類似性が認められることが明らかとなった。神経芽腫では、NCYM蛋白質が、

MYCN蛋白質を安定化し、リプログラミング因子であるOCT4とpositive feedback loopを形成して神経芽腫の悪性化に寄与していることが明らかになった。腎芽腫の発生に強く関与することが分かっているWT1およびIGF2遺伝子の解析とSNPアレイCGH解析を行い、5群に分類した。S1群は部分初期化腎芽腫発生マウスモデルと、S5群はmiRNA生合成遺伝子異常腎芽腫と類似した特徴を示した。肝芽腫の発症と進展にはWnt/ β -カテニン標的遺伝子群の発現レベルの変化が関与し、TERTによるこれらの標的遺伝子群の活性化機序が示唆された。また、これらには、胎内でのエピジェネティックな遺伝子調節機構の変化が関連していることが示唆された。ユーイング肉腫においては、EWSR1-FLI1による腫瘍発生とDNAメチル化との関連が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (中川原)

Suenaga Y, Islam SMR, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shitba T, Nakamura Y, Ohira M, Haraguchi S, Takatori A, **Nakagawara A**. NCYM, a cis-antisense gene of MYCN, encodes a de novo evolved protein that inhibits GSK3b resulting in the stabilization of MYCN in human neuroblastoma. *PLoS Genet.* 2014 Jan;10(1):e1003996 doi:10.1371/journal.pgen.1003996

Yu F, Gao W, Yokochi T, Suenaga Y, Ando K, Ohira M, Nakamura Y, **Nakagawara A**. RUNX3 interacts with MYCN and facilitates protein degradation in neuroblastoma. *Oncogene* 33:2601-2609, 2014

Nakamura Y, Suganami A, Fukuda M, Hasan MK, Yokochi T, Takatori A, Sato S, Hoshino T, Tamura Y, **Nakagawara A**. Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Med.* 2014 Feb;3(1):25-35. Doi: 10.1002/cam4.175

Yamazaki F, Nakazawa A, Shimojima N, Tanaka T, **Nakagawara A**, Shimada H. Two cases of neuroblastoma comprising two distinct clones. *Pediatr. Blood Cancer* 61:760-762, 2014

Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimojima O, Iwama A, **Nakagawara A**, Kamijo T. Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulates MYCN/ATM/p53 pathway. *Eu. J. Cancer* 50:1555-1565, 2014

Morgenstern DA, London WA, Stephens D, Volchenboum S, Hero B, Cataldo AD, **Nakagawara A**, Shimada H, Ambros P, Matthay KK, Cohn SL, Peason ADJ, Irwin MS. Metastatic neuroblastoma confined to distant lymph nodes (stage 4N) predicts outcome in patients with stage 4 disease: A study from the International Neuroblastoma Risk Group Database. *J. Clin. Oncol.* 32:1228-1235, 2014

Haruta M, Kamijo T, **Nakagawara A**, Kaneko Y. RASSF1A methylation may have two biological roles on neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients.

Cancer Letters 348:167-176, 2014

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.* 74:3790-3801, 2014

Shimozato O, Waraya M, Nakashima K, Soda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, **Nakagawara A**, Ozaki T, Kamijo T. Receptor-type protein tyrosine phosphatase κ directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene* Jun 2. Doi: 10.1038/onc2014.141

Meany HJ, London WB, Ambros PF, Matthay KK, Monclair T, Simon T, Garaventa A, Berthold F, **Nakagawara A**, Cohn SL, Pearson ADJ, Park JR. Significance of clinical and biologic features in stage 3 neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Pediatr. Blood Cancer* 61:1932-1939, 2014

Vo KT, Matthay KK, Neuhaus J, London WB, Hero B, Ambros PF, **Nakagawara A**, Miniati D, Wheeler K, Pearson ADJ, Cohn SL, DuBois SG. Clinical, biological, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project. *J. Clin. Oncol.* 32: 3169-3176, 2014

Oberthuer A, Juraeva D, Hero B, Volland R, Carolina S, Schmidt R, Faldum A, Kahlert Y, Engesser A, Asgharzadeh S, Seeger RC, Ohira M, **Nakagawara A**, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Benard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Grundy RG, Ortman 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.* 2014 Sep 17. pii: clincanres.0817.2014

Akter J, Takatori A, Islam MS, Nakazawa A, Ozaki T, Nagase H, **Nakagawara A**. Intracellular fragment of NLRR3 (NLRR3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 453:86-93, 2014

Tatsumi Y, Takano R, Islam MS, Yokochi T, Itami M, Nakamura Y, **Nakagawara A**. BMCC1, which is an interacting partner of BCL2, attenuates AKT activity, accompanied by apoptosis. *Cell Death and Disease*, 2014 (Accepted).

Pinto N, Applebaum MA, Volchenboum SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, **Nakagawara A**, Berthold F, Schleiermacher G, Park JR, Valteau-Couanet D, Pearson ADJ, Cohn SL. Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.*, 2014 (Accepted).

(山田)

Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, **Yamada Y***. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell.* 2014 156(4):663-77.

Yamada Y, Haga H, **Yamada Y***. Concise Review: Dedifferentiation Meets Cancer Development: Proof of Concept for Epigenetic Cancer. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Oct;3(10):1182-7.

Matsuda Y, Semi K, **Yamada Y***. Application of iPS cell technology to cancer epigenome study: Uncovering the mechanism of cell status conversion for drug resistance in tumor. *Pathol Int.* 2014 Jul;64(7):299-308.

Ohnishi K, Semi K, **Yamada Y***. Epigenetic regulation leading to induced pluripotency drives cancer development in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Dec 5;455(1-2):10-15.

(金子)

Kumon K, **Kaneko Y**. Social and biological factors influencing the outcomes of children with Wilms tumors in Kenya and other Sub-Saharan countries. *Transl Pediatr.* 3:42-46, 2014.

Oue T, Koshinaga T, Okita H, **Kaneko Y**, Hinotsu S, Fukuzawa M. Bilateral Wilms tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol. *Pediatr Blood Cancer.* 61:1184-1189, 2014.

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 Letters.* 348:167-176, 2014.

Izumi H, **Kaneko Y**. Trim32 facilitates degradation of MYCN on spindle poles and induces asymmetric cell division in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 74:5620-5630, 2014

Izumi H, **Kaneko Y**. Symmetry breaking in human neuroblastoma cells. *Mol Cell Oncol.* 1, e968510, 2014.

Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Tanaka Y, Horie H, Hinotsu S, Koshinaga T, Yoneda A, Ohtsuka Y, Taguchi T, Fukuzawa M. A high incidence of WT1 abnormality in bilateral Wilms tumors in Japan, and the penetrance rates in children with WT1 germline mutation. *Brit J Cancer*, 2015 Feb 17 ahead of print

(檜山)

Hiyama E. Pediatric Hepatoblastoma: diagnosis and treatment. *Translational Pediatrics*, in press

Czauderna P, Lopez-Terrada D, **Hiyama E**, Häberle B, Malogolowkin MH, Meyers RL. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Curr Opin Pediatr.* 2014 26:19-28. doi: 10.1097/MOP.0000000000000046.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

厚生労働科学研究委託費
委託業務成果報告（分担研究報告書）

研究開発課題名：小児固形腫瘍とリプログラミングの破綻：発がん機構解明から臨床応用へ
研究開発分担者 所属：佐賀県医療センター医学研究所
研究開発分担者 役職・氏名：理事長 中川原 章
分担研究開発課題名：神経芽腫発生のエピジェネティクス異常と NCYM の役割

研究要旨：

我々は、MYCNがん遺伝子から *cis*-antisense に読まれた *de novo* evolved gene product である NCYM 蛋白質を見だし、MYCN/NCYM ダブルトランスジェニックマウスに発生する神経芽腫がヒト腫瘍と同様に高頻度に転移を起こすことを報告した (PLoS Genetics, 2014)。しかし、NCYM 蛋白質の細胞内における機能は不明であった。本研究では、NCYM が神経芽腫細胞の中でリプログラミング因子のひとつである OCT4 を発現誘導し、誘導された OCT4 がさらに NCYM 及び MYCN を発現誘導することを見いだした。NCYM 蛋白質には DNA 結合能はないが、MYCN 蛋白質を安定化した。したがって、OCT4 と NCYM/MYCN の間には positive feedback loop が形成されていることを明らかにした。神経芽腫臨床検体を用いた解析から、OCT4 と NCYM 発現レベルは有意に相関し、両者とも予後不良神経芽腫において高発現していたことから、この破綻が新しい治療法の開発に繋がる可能性を示した。

A. 研究目的

申請者は、進行神経芽腫において最も高頻度に増幅されている MYCN がん遺伝子から *cis*-antisense に読まれる *de novo* evolved gene が、ヒトとチンパンジーのみで蛋白質にコードされている NCYM 蛋白質を見いだした (PLoS Genetics, 2014)。さらに、MYCN/NCYM ダブルトランスジェニックマウスに発生する神経芽腫がヒト腫瘍と同様に高頻度に転移を起こすことを報告した (PLoS Genetics, 2014)。NCYM 蛋白質は GSK3b による MYCN 蛋白質のリン酸化を抑制し、そのユビキチン化による分解を抑制することによって、MYCN の安定化をもたらすことを明らかにしたが、その生理学的意義については不明であった。本研究においては、種特異的に存在する NCYM 蛋白質が、神経芽腫の幹細胞性及びリプログラミングにおいて果たす役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

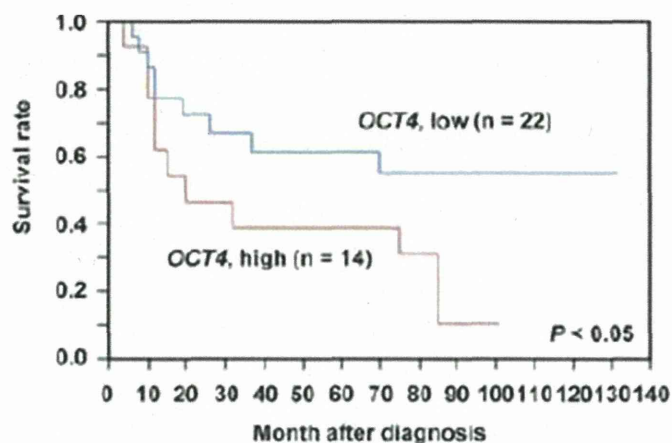
細胞レベルにおける各種遺伝子の機能解析には、標準的な分子生物学的実験手法を用いた。また、主に神経芽腫細胞株および U2OS, Hela 細胞を用いて遺伝子の transfection を行った。遺伝子の発現抑制には siRNA を使い、蛋白質の細胞内局在は免疫蛍光法によった。腫瘍組織内の蛋白質発現および局在の検索は免疫組織化学によった。遺伝子発現量の測定は定量的 RT-PCR によった。NCYM の DNA 結合能に関しては、クロマチン免疫沈降法を用いて調べた。転写活性化能については、Luciferase reporter assay を用いた。また、特定遺伝子の細胞内 knockdown には shRNA を用いた。さらに、統計解析には、student's t-test, Logrank test, Cox regression analysis を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (2001 年 3 月)」に則って行い、患者および患者家族に不利益が生じないよう万全の対策を講じ、必要な研究は千葉県がんセンターの倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

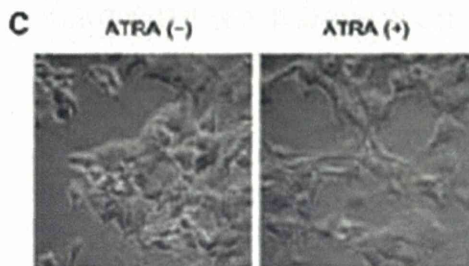
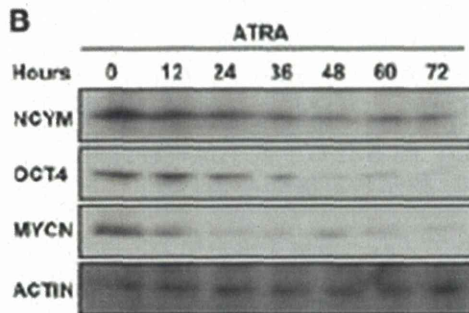
1. 神経芽腫臨床サンプルでの OCT4 発現
神経芽腫の MYCN 増幅 36 症例と非増幅 67 例において OCT4 mRNA の発現レベルを検索した。その結果、MYCN 増幅例においてのみ OCT4 の高発現が神経芽腫の予後の悪さと有意に相関していた。



2. NCYM による MYCN 発現の誘導
神経芽腫サンプルにおいて、NCYM mRNA 発現レベルは OCT4, NANOG の発現と正に相関し、KLF4 の発現とは負に相関した。そこで、NCYM を神経芽腫細胞に過剰発現したところ、OCT4, NANOG, LIN28, SOX2 が発現誘導され、c-MYC, KLF4 は誘導されなかった。次に luciferase reporter assay を行ったとこ

る、OCT4はMYCNのE-boxに結合し、直接転写誘導していた。しかし、OCT4によるNCYMの発現誘導は直接的なものではないと思われた。したがって、NCYMはOCT4を介してMYCNの発現を誘導しているものと考えられた。

3. 神経芽腫細胞の分化に伴うOCT4/NCYMの低下
 神経芽腫細胞 BE(2)-C I-type cells を all-trans retinoic acid (ATRA) で処理すると分化するが、その際にMYCNのみならずNCYM, OCT4, SOX2の蛋白質レベルでの発現低下が見られた。



D. 考察

本研究によって、OCT4がMYCN/NCYMとpositive feedback loopを形成し、神経芽腫細胞の幹細胞性の維持に関与していることが示唆された。また、OCT4の発現レベルがMYCN増幅した神経芽腫においてのみ予後因子となっていたことは興味深かった。OCT4とMYCN/NCYMのpositive feedback loopのメカニズムは、NCYMがMYCNを安定化することによりOCT4を発現誘導し、OCT4がMYCNを転写誘導することによってNCYMの発現を高めることによるものと思われた。ATRAによる神経芽腫細胞の分化誘導は、このpositive feedback loopが壊れることによってもたらされた可能性がある。したがって、NCYMがMYCN増幅した神経芽腫の悪性化に貢献している理由として、OCT4による神経芽腫のがん幹細胞性の維持が関与していることが示唆された。ATRA処理のように、このOCT4-MYCN/NCYMネットワークを壊すことが悪性度の高い神経芽腫の新しい治療法開発に繋がる可能性がある。このように、神経芽腫においては、NCYMによるリプログラミング因子の制御が悪性度に寄与していることが示唆された。

E. 結論

ヒトとチンパンジーにしか存在しないNCYM蛋白質が、MYCN蛋白質を安定化し、リプログラミング因子であるOCT4とpositive feedback loopを形成して神経芽腫の悪性化に寄与していることが明らかになった。この機構を破綻させることにより、神経芽腫の新しい治療法開発が可能になることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suenaga Y, Islam SMR, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shibata T, Nakamura Y, Ohira M, Haraguchi S, Takatori A, **Nakagawara A**. NCYM, a cis-antisense gene of MYCN, encodes a de novo evolved protein that inhibits GSK3 β resulting in the stabilization of MYCN in human neuroblastoma. *PLoS Genet.* 2014 Jan;10(1):e1003996 doi:n10.1371/journal.pgen.1003996

Yu F, Gao W, Yokochi T, Suenaga Y, Ando K, Ohira M, Nakamura Y, **Nakagawara A**. RUNX3 interacts with MYCN and facilitates protein degradation in neuroblastoma. *Oncogene* 33:2601-2609, 2014

Nakamura Y, Suganami A, Fukuda M, Hasan MK, Yokochi T, Takatori A, Sato S, Hoshino T, Tamura Y, **Nakagawara A**. Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Med.* 2014 Feb;3(1):25-35. Doi: 10.1002/cam4.175

Yamazaki F, Nakazawa A, Shimojima N, Tanaka T, **Nakagawara A**, Shimada H. Two cases of neuroblastoma comprising two distinct clones. *Pediatr. Blood Cancer* 61:760-762, 2014

Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, **Nakagawara A**, Kamijo T. Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulates MYCN/ATM/p53 pathway. *Eu. J. Cancer* 50:1555-1565, 2014

Morgenstern DA, London WA, Stephens D, Volchenboum S, Hero B, Cataldo AD, **Nakagawara A**, Shimada H, Ambros P, Matthay KK, Cohn SL, Pearson ADJ, Irwin MS. Metastatic neuroblastoma confined to distant lymph nodes (stage 4N) predicts outcome in patients with stage 4 disease: A study from the International Neuroblastoma Risk Group Database. *J. Clin. Oncol.* 32:1228-1235, 2014

Haruta M, Kamijo T, **Nakagawara A**, Kaneko Y. RASSF1A methylation may have two biological roles on neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. *Cancer Letters* 348:167-176, 2014

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.* 74:3790-3801, 2014

Shimozato O, Waraya M, Nakashima K, Soda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, **Nakagawara A**, Ozaki T, Kamijo T. Receptor-type

protein tyrosine phosphatase κ directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene* Jun 2. Doi: 10.1038/onc2014.141

Meany HJ, London WB, Ambros PF, Matthay KK, Monclair T, Simon T, Garaventa A, Berthold F, **Nakagawara A**, Cohn SL, Pearson ADJ, Park JR. Significance of clinical and biologic features in stage 3 neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Pediatr. Blood Cancer* 61:1932-1939, 2014

Vo KT, Matthay KK, Neuhaus J, London WB, Hero B, Ambros PF, **Nakagawara A**, Miniati D, Wheeler K, Pearson ADJ, Cohn SL, DuBois SG. Clinical, biological, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project. *J. Clin. Oncol.* 32: 3169-3176, 2014

Oberthuer A, Juraeva D, Hero B, Volland R, Carolina S, Schmidt R, Faldum A, Kahlert Y, Engesser A, Asgharzadeh S, Seeger RC, Ohira M, **Nakagawara A**, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Benard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Grundy RG, Ortmann 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.* 2014 Sep 17.pil:clincanres.0817.2014

Akter J, Takatori A, Islam MS, Nakazawa A, Ozaki T, Nagase H, **Nakagawara A**. Intracellular fragment of NLRP3 (NLRP3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 453:86-93, 2014

Tatsumi Y, Takano R, Islam MS, Yokochi T, Itami M, Nakamura Y, **Nakagawara A**. BMCC1, which is an interacting partner of BCL2, attenuates AKT activity, accompanied by apoptosis. *Cell Death and Disease*, 2014 (Accepted).

Pinto N, Applebaum MA, Volchenboum SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, **Nakagawara A**, Berthold F, Schleiermacher G, Park JR, Valteau-Couanet D, Pearson ADJ, Cohn SL. Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.*, 2014 (Accepted).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

厚生労働科学研究委託費
委託業務成果報告（分担・業務項目）

研究開発課題名：小児固形腫瘍とリプログラミングの破綻：発がん機構解明から臨床応用へ
研究開発分担者 所属：京都大学iPS細胞研究所・初期化機構研究部門
研究開発分担者 役職・氏名：教授 山田 泰広
分担研究開発課題名：小児がん発生と細胞初期化に関する研究

研究要旨：

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）作製の過程においてリプログラミングに失敗した細胞から小児がん
に類似したがんが発生する事実をマウスで発見した（Cell, 2014）。本研究では、この知見をもと
に、ヒト小児芽腫発生における細胞初期化の関与について検討する。ヒト小児芽腫の網羅的遺伝子
発現をヒト多能性幹細胞の遺伝子発現パターンと比較することで、小児芽腫と多能性幹細胞との類
似性を調べるとともに、初期化失敗マウス腫瘍との比較を行い、小児芽腫発生における細胞初期化
の関連についての検討を行う。またヒト小児がん細胞株を用いて初期化因子を導入することで、小
児がん細胞の性質変化の誘導を試みるとともに、治療応用への可能性を検討する。

A. 研究目的

申請者は、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）作製の過程
においてリプログラミングに失敗した細胞から小児
芽腫に類似するがんが発生する事実をマウスで発見
した（Cell, 2014）。不完全な細胞初期化により生じ
た腎臓、肝臓、膵臓は、それぞれ腎芽腫、肝芽腫、膵
芽腫に類似していた。小児がん発生における細胞初期
化の関与が示唆された。本研究では、ヒト小児がん検
体を用いて、多能性関連因子の発現やエピジェネティ
クス修飾状態を解析し、多能性幹細胞との類似性を明
らかにすることで、小児がん発生における細胞初期化
の関与を検討する。さらに、ヒト小児がん細胞株に初
期化因子を導入することで、小児がん細胞の性質変化
の誘導を試みるとともに、治療応用への可能性を検
討する。

本研究班における研究目的を以下の通り設定した。

- リプログラミングという観点から小児発がんメカニズムの解明を目指す。
- 細胞分化制御による小児がん治療の可能性を検討する。

B. 研究方法

1. ヒト小児がん検体における、多能性幹細胞との類似性の検討

ヒト Wilms 腫瘍検体の網羅的遺伝子発現パターンに
おいて、ヒト多能性幹細胞との類似性が認められてい
る（Cell, 2014）。本年度は、公開されているヒト肝
芽腫の網羅的遺伝子発現データを用いて、ヒト肝芽腫
とヒト多能性幹細胞の類似性を検討した。

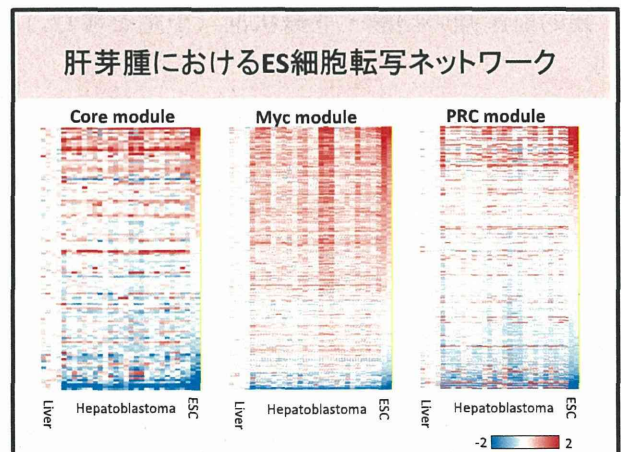
2. ヒト小児がん細胞株への細胞初期化因子の導入

ヒト小児がんにおいても、完全初期化が可能であるか
を検討した。Wilms 腫瘍、神経芽腫、ラブドイド腫瘍
細胞株に piggyBac トランスポゾンを用いて、ドキシ

サイクリン誘導性初期化遺伝子を導入した。各細胞株
にドキシサイクリン処理により初期化因子を誘導し
た後に、細胞形態の変化を観察するとともに、細胞初
期化マーカー遺伝子の発現を調べることで、小児がん
細胞株の初期化を検討した。早期細胞初期化マーカー
として PODXL の発現を検討した。

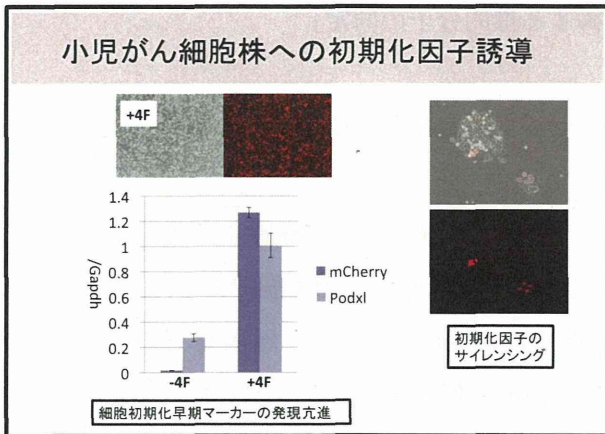
C. 研究結果

1. ヒト肝芽腫およびヒト多能性幹細胞の網羅的遺伝
子発現データを用いて、肝芽腫と多能性幹細胞の類似
性を検討した。多能性幹細胞の転写ネットワークにお
ける3つの異なる転写モジュールを用いて、2者を比
較検討した。肝芽腫では多能性幹細胞における Myc
モジュールが活性化していることが分かった。また、
多能性維持に関わる Core モジュールも一部で活性化
していることが示唆された。肝芽腫と多能性幹細胞の
類似性が明らかとなった（下図）。



2. 不完全な細胞初期化によるマウスがん細胞は、完
全初期化により非腫瘍性の体細胞に分化可能である
ことが示されている。Wilms 腫瘍、神経芽腫、ラブド

イド腫瘍細胞株に、初期化因子誘導可能遺伝子を導入した。初期化因子発現誘導により、がん細胞株は形態を変化させ、細胞初期化の早期マーカーPODXLの発現誘導が確認された。しかしながら、初期化因子は約1週間後にはサイレンシングされ、持続的な遺伝子誘導が不可能であり、完全ながん細胞株の初期化は不可能であった(下図;ラブドイド腫瘍株における初期化因子誘導)。



D. 考察

ヒト Wilms 腫瘍検体と同様にしてヒト肝芽腫においても網羅的遺伝子発現パターンが、ヒト多能性幹細胞と部分的に類似することが明らかとなった。今回は一般に公開されている遺伝子発現データを利用したが、今後は JCCG に登録された小児がん検体を、他の班員と共同で解析予定である。特に網羅的な遺伝子発現パターンについて、肝芽腫(檜山先生)および Wilms 腫瘍(金子先生、大喜多先生)における多能性幹細胞との類似性を比較検討したい。得られた結果は JCCG 臨床情報との関連を検討し、小児発がんメカニズムの解明や予後予測等への発展を目指す。

小児がん細胞に初期化因子を誘導することで、部分的な細胞の初期化が誘導されることが明らかとなった。一方で、完全な細胞初期化は困難であった。今後は、初期化されたヒト小児がん細胞株の性質変化を検討する。

E. 結論

ヒト Wilms 腫瘍検体と同様にしてヒト肝芽腫においても、一部で多能性幹細胞との類似性が認められることが明らかとなった。また、小児がん細胞株は初期化因子誘導によって部分的に初期化されることが確認された。更なる解析によって、ヒト小児芽腫発生における細胞初期化の関与について検討するとともに、小児がん細胞の分化制御を試み、治療応用への可能性を検討したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, **Yamada Y***. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*. 2014 156(4):663-77.

Yamada Y, Haga H, **Yamada Y***. Concise Review: Dedifferentiation Meets Cancer Development: Proof of Concept for Epigenetic Cancer. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Oct;3(10):1182-7.

Matsuda Y, Semi K, **Yamada Y***. Application of iPS cell technology to cancer epigenome study: Uncovering the mechanism of cell status conversion for drug resistance in tumor. *Pathol Int*. 2014 Jul;64(7):299-308.

Ohnishi K, Semi K, **Yamada Y***. Epigenetic regulation leading to induced pluripotency drives cancer development in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 5;455(1-2):10-15.

2. 学会発表

Yamada Y. Nature Conference, Nuclear Reprogramming and the Cancer Genome 2014, Guangzhou, China, October 31-November 2, 2014

Yamada Y. ADVANCES IN NEUROBLASTOMA RESEARCH, Colonge, Germany, May 13-16, 2014

Yamada Y. 8th International Cell Therapy Conference, Seoul, Korea, October 23, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

分担研究報告書

分担研究「腎芽腫の発生や進展を制御する標的分子の同定」

分担研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 参与

研究要旨 腎芽腫は生物学的に不均一な疾患である。JWiTS に登録された腎芽腫 124 例を対象にして、SNP アレイ CGH, WT1, IGF2 異常を解析した。その結果、5 群に分類可能であった。WT1 野生型 CGH 正常型 S1 群は部分初期化腎芽腫マウスモデルと、WT1 野生型 CGH 異常型 IGF2-L01 群 (S5) は miRNA 生合成遺伝子異常型腎芽腫と類似していると仮説をたて、それぞれの関係を実証する研究の基盤を作った。

A. 研究目的

これまで腎芽腫の発生機構について、WT1 と IGF2 遺伝子を中心に解明が進められてきた。1) 最近、miRNA 生合成に関する遺伝子変異が腎芽腫に報告されたので、その異常を解析し、従来解明された機構との関係を明らかにする。2) 部分初期化によりマウスに腎芽腫を発生可能という現象が、ヒト腎芽腫に当てはまるかどうか、発現・メチル化解析により検討する。3) 腎芽腫細胞株を用いて部分初期化と腫瘍悪性化との関係を明らかにする。以上の 3 点を解明することにより、腎芽腫の発生や進展を制御する標的分子を同定し、予後予測や治療の標的になるバイオマーカーを確立する。

B. 研究方法

日本腎芽腫スタディーグループ (JWiTS) で収集した腎芽腫検体 124 例を対象にして、SNP アレイ CGH 解析による 11p uniparental disomy (UPD) と染色体異常の解析、WT1 遺伝子変異解析、H19-DMR の COBRA 解析による IGF2-H19 領域のメチル化状態の解析を実施した。

(倫理面への配慮) 検体を研究に使用することについて、親から文書で同意を得た。

C. 研究結果

WT1 異常の有無により、WT1 変異腫瘍 43 例 (S2 群)、WT1 野生型腫瘍 81 例に分類した。次に、81 例を染色体異常の有無により、異常のない 14 例 (S1 群) と異常ありの 67 例に分類した。この 67 例を IGF2 のインプリント状態により、インプリント正常群 (S3

群、ROI) 13 例、IGF2-UPD 群 (S4 群) 26 例、インプリント消失群 (S5 群、LOI) 28 例に分類した。患者年齢は S1 群が 14 カ月で最年少、S5 群が 57 カ月で最年長、S2, S3, S4 群は 23-29 カ月で両群の間であった。

D. 考察

S1 群は患者年齢が最も若く、ゲノム異常を認めないので、山田等のマウスモデルと同様に、部分初期化により腎芽腫が発生した可能性がある。今後、網羅的発現・メチル化解析を実施する。S5 群の腫瘍 CGH パターンを分析すると、miRNA 生合成経路に関わる LET7A2, LET7C, DIS3L2 などの遺伝子部位に一致して染色体欠失を示す腫瘍がみられた。DNA メチル化制御遺伝子群と Polycomb 遺伝子群はエピジェネティック異常に関与しているため、両群の遺伝子異常をもつ腫瘍は、同じエピジェネティック異常の原因となる miRNA 異常をもっている群と一致すると予想した。そこで、S5 群を対象にしてターゲットキャプチャー法により、DNA メチル化制御遺伝子群と Polycomb 遺伝子群について変異解析を実施し、両者の関係を明らかにする予定である。

E. 結論

腎芽腫は生物学的に不均一な疾患である。腎芽腫の発生に強く関与することが分かっている WT1 および IGF2 遺伝子の解析と SNP アレイ CGH 解析を行い、5 群に分類した。S1 群は部分初期化腎芽腫発生マウスモデルと、S5 群は miRNA 生合成遺伝子異常腎芽腫

と類似した特徴を示したので、次年度以降、それぞれ対になるとの仮説をたて、実証する研究を行う。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumon K, Kaneko Y. Social and biological factors influencing the outcomes of children with Wilms tumors in Kenya and other Sub-Saharan countries. *Transl Pediatr.* 3:42-46, 2014.
2. Oue T, Koshinaga T, Okita H, Kaneko Y, Hinotsu S, Fukuzawa M. Bilateral Wilms tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol. *Pediatr Blood Cancer.* 61:1184-1189, 2014.
3. Haruta M, Kamiyo 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 Letters.* 348:167-176, 2014.
4. Izumi H, Kaneko Y. Trim32 facilitates degradation of MYCN on spindle poles and induces asymmetric cell division in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 74:5620-5630, 2014
5. Izumi H, Kaneko Y. Symmetry breaking in human neuroblastoma cells. *Mol Cell*

Oncol. 1, e968510, 2014.

6. Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Tanaka Y, Horie H, Hinotsu S, Koshinaga T, Yoneda A, Ohtsuka Y, Taguchi T, Fukuzawa M. A high incidence of WT1 abnormality in bilateral Wilms tumors in Japan, and the penetrance rates in children with WT1 germline mutation. Brit J Cancer, 2015 Feb 17 ahead of print

2. 学会発表

1. Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Koshinaga T, and Fujiwara Y. Parental Inheritance and WT1 abnormality types may affect the penetrance rate of hereditary Wilms tumor. Am Soc Hum Genet 64th Ann Meet Oct 2014 San Diego, CA, USA
2. 金子安比古、大喜多肇、春田雅之、新井康仁、大植孝治、越永従道、福澤正洋：WT1 遺伝子異常タイプとその親由来が遺伝性

Wilms 腫瘍の浸透率に影響する。日本人類遺伝学会第 59 回大会。2014. 11. 東京都

3. Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Koshinaga T, Yoneda A, Ohtsuka Y, Fukuzawa M. Parental inheritance and WT1 abnormality types may affect the penetrance rate of hereditary Wilms tumor. 第 56 回日本小児血液・がん学会。2014. 11. 岡山市

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

3. その他 なし

厚生労働科学研究委託費
委託業務成果報告 (分担・業務項目)

研究開発課題名：小児固形腫瘍とリプログラミングの破綻：発がん機構解明から臨床応用へ
研究開発分担者 所属：京都府立医科大学大学院医学研究科/小児発達医学・小児腫瘍学
研究開発分担者 役職・氏名：教授 細井 創
分担研究開発課題名：胞巣型横紋筋肉腫細胞における筋最終分化の誘導と治療法の開発

研究要旨：

胞巣型横紋筋肉腫 (ARMS) に発現しているPAX3-FOXO1Aキメラ遺伝子ノックダウンによって、ARMS細胞の分化を誘導できることを見いだしており (細井ら、未発表)、この系におけるゲノムのメチル化解析とヒストン修飾解析を行い、腫瘍発生の意義を探索するとともに、分化誘導療法の開発を目指す。

A. 研究目的

横紋筋肉腫 (RMS) は小児で最も多い軟部肉腫であり、二大組織亜型の一つである胞巣型横紋筋肉腫 (ARMS)、特にその特異的キメラ遺伝子 PAX3-FOXO1 の発現を認めるものの予後は依然不良である。すでに我々は PAX3-FOXO1 が ARMS 発生に重要な働きを持つことをマウスモデルを用い示してきた。また、発生後の腫瘍細胞においても、PAX3-FOXO1 が腫瘍悪性度の維持に必要であることを示してきた。しかし興味深いことに、PAX3-FOXO1 ノックダウンのみでは最終筋分化を誘導することができず、腫瘍発生後に何らかのエピジェネティックな変化が起きていることが示唆される。我々はすでに、ARMS 細胞株 3 例/5 例で H19 DMR にメチレーション異常があることを確認している (未発表データ)。また、PAX3-FOXO1 ノックダウンした細胞の CDK4/6 を阻害すると筋最終分化が誘導できることを確認している (未発表データ)。今回の研究の目的は PAX3-FOXO1 が腫瘍の分化抑制にどのように働いているかを、リプログラミング、エピジェネティックな制御、特に CDK4/6-Rb pathway のエピゲノムな制御に注目し ARMS の筋最終分化誘導の機序を解明することである。今回我々は、PAX3-FOXO1 ノックダウンと CDK4/6 活性阻害を組み合わせることによって ARMS 細胞の筋最終分化を誘導できることを予備実験で発見した。この分化モデルは ARMS の病態解明に用いることができるのみならず、RMS 初の分化誘導療法の研究に大変有用であると考えられる。

B. 研究方法

ARMS 細胞における筋最終分化の確認

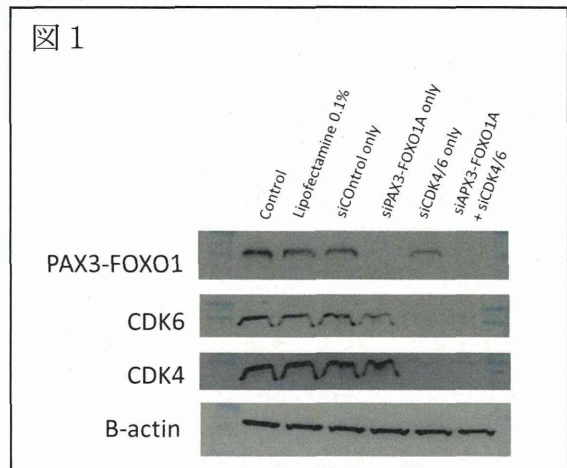
1. PAX3-FOXO1A ノックダウン ARMS 細胞に CDK4/6 活性阻害剤である PD 0332991 を投与、または CDK4/6 siRNA をトランスフェクションし、倒立顕微鏡での形態変化、western blot での MRFs 蛋白の変化、蛍光免疫染色法での Myosin heavy chain 染色の変化を確認する。
2. shPAX3-FOXO1 レンチウイルスベクターを用い

PAX3-FOXO1A 安定ノックダウン株を作成する。

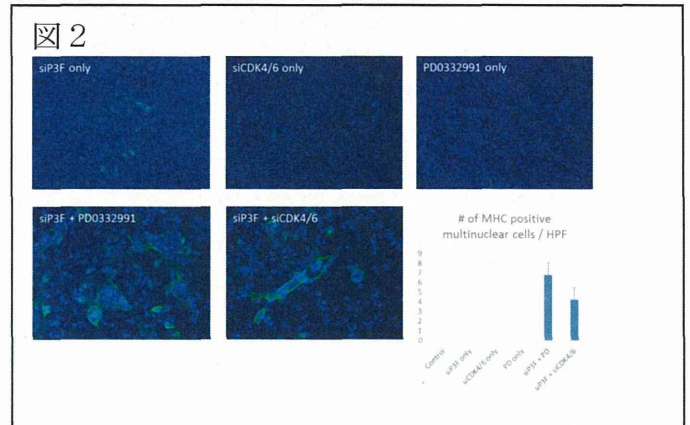
C. 研究結果

ARMS 細胞における筋最終分化の確認

1. PAX3-FOXO1 陽性ヒト ARMS 細胞株 Rh30 に siPAX3-FOXO1 または siCDK4/6 をトランスフェクト、ウエスタンブロットで効率的、特異的にそれぞれの蛋白がノックダウンされていることを確認した (図 1)。



2. PAX3-FOXO1 かつ siCDK4/6 ノックダウン ARMS 細胞が筋最終分化 (多核化、Myosin heavy chain 染色陽性) することを確認した (図 2)。

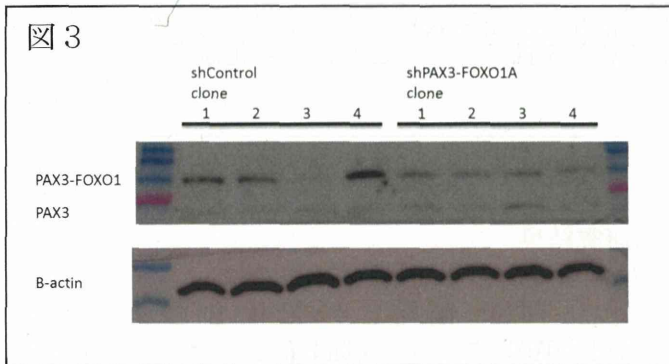


3. PAX3-FOXO1 ノックダウン ARMS 細胞に CDK4/6 活性阻害剤である PD 0332991 を投与することで筋最終分化（多核化、Myosin heavy chain 染色陽性）することを確認した（図2）。

4. shPAX3-FOXO1 発現レンチウイルスを PAX3-FOXO1 陽性ヒト ARMS 細胞株 Rh30 に感染させることで、PAX3-FOXO1 安定ノックダウン株の作成に成功した（図3）。

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし



D. 考察

我々は、すでに ARMS が筋芽細胞から発生できること、PAX3-FOXO1 の発現がエピジェネティックな制御を受けていることが示唆される結果を報告している。また、Rb 蛋白の発現量が筋芽細胞に比べて少ないことを報告している。これらの結果は、ARMS 腫瘍発生後にエピジェネティックな制御により分化が抑制されており、さらにこの制御を調節することで再び分化が誘導できることを示唆していると考えられる。実際、今回のモデル（PAX3-FOXO1 および Rb の活性阻害）では筋最終分化が誘導できた。今後、このモデルを用い、ARMS の分化制御をエピゲノムの点から解明していきたいと考えている。また、さらに臨床応用のために、薬剤のみによる分化誘導の検索、マウス xenograft モデルを用いた抗腫瘍効果の検討につなげていきたい。

E. 結論

本助成金を得て行う研究は、化学療法や集学的治療の進歩にもかかわらず、ここ 30 年来治療成績の改善をみない難治性小児がんの新しい治療薬・治療方法の開発に飛躍的な成果をもたらすものと期待できる。また、本研究により開発された新しい治療薬や治療方法は、近年、本申請者らが協力して、インフラ整備と体制確立がなされた本邦の当該小児がんグループスタディ（JRSG）の臨書試験において、将来、臨床的にその有効性と安全性を検証し、本邦の当該がん患児の診断・治療の向上に貢献できるものとする。

F. 健康危険情報

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

肝芽腫の発生、進展に関わるリプログラミング因子の同定

広島大学自然科学研究支援開発センター教授 檜山英三

要旨

日本小児肝がんスタディグループ（JPLT）の統一プロトコール JPLT2 で治療し登録された肝芽腫症例の保存臨床検体を用いて、小児特有のがんである肝芽腫の発生と進展にかかわる因子を検証した。具体的には、網羅的 RNA 発現解析、及び SNP アレイあるいは次世代エクソーム解析結果から、各リスク分類毎に、発現が上昇しているリプログラミングに係る遺伝子候補を抽出した。その結果、胎生期の遺伝子変異に加え、Wnt/ β カテニンシグナル標的遺伝子発現調節に対するエピゲネティックな変化が悪性度の上昇に関与しており、今回の検討では TERT の活性化から BRG1 (also called SMARCA4), a SWI/SNF-related chromatin remodeling protein を介して β -catenin-TCF 複合体を活性化している経路の関与が示唆された。

A. 研究目的

わが国の小児がん全体の治癒率が著しく上昇したとは言え、進行神経芽腫や腎芽腫、肝芽腫、横紋筋肉腫など小児固形がんの一部は、現在もなお予後不良である。これには、環境因子がほとんど関与しない小児がんの発がんの多様性と、発生過程における正常プログラムの破綻が関係していることが示唆されていたが、具体的な証明は得られていなかった。このような中、iPS技術を用いて作成した細胞初期化による小児芽腫発がんマウスモデルの研究結果（Cell, 2014）は、エピゲネティクス異常によって小児がんが発症することを示したという意味で、極めて重要な知見となっている。なかでも、肝芽腫は、神経芽腫や腎芽腫とともに小児の中でも乳幼児期に好発し、そのほとんどが4歳までに発症する。さらに、近年、低出生体重児に肝芽腫が好発することも知られている。そこで、小児肝がん研究グループ

（JPLT）で2000年ころから蓄積してきた腫瘍と正常のペア検体を持ちいて、以下の検討をおこなった。また、すでにメチル化の異常が知られている腎芽腫や、PAX3-FOXO1Aキメラ遺伝子が腫瘍の発生・進展に関わる蜂巣型横紋筋肉腫に対し、肝芽腫ではその発生進展に関わるものとして Wnt/ β -catenin シグナル系の異常があり、当科でもそれらの検討をおこなってきた。そこで、本研究班では、肝芽腫では、Wntシグナルの異常とリプログラミングの破綻との関係を細胞株と臨床検体を用いて解析し、バイオマーカーの探索も行った。

B. 研究方法

JPLT2 プロトコールにて治療した 300 例以上の症例のうち、治療前に、正常組織と腫瘍組織が同意を得て保存されている症例 109 例を対象とした。PRETEXT 分類では I: 12, II: 33, III: 41,