

IV: 24 で、肝外因子である P2, V3, E, H, N 因子一つ以上を 37 例に認め、遠隔転移を 35 例に認めていた。

これらを対象に以下の検討を行った。

1) 遺伝子変異検索：正常組織（正常肝組織または血液細胞）由来の DNA と治療前腫瘍組織の DNA を用いて、マイクロアレイ（Affymetrix SNP6..0）を用いて、各遺伝子変化について検討した。データ解析には解析用ソフト（Genespring, Partek）を用いた。上記の症例のうち Wnt シグナル系の異常を検索する目的で、CTNNB1 (β -catenin)に加え、APC, Axin1, Axin2 の変異を検索した。

2) 遺伝子発現検索：さらに、腫瘍からの十分量かつ質の高い RNA が抽出できた 34 例について発現解析用マイクロアレイ（Gene array）にて、腫瘍の遺伝子発現を網羅的に検討した。Wnt シグナル系の標的遺伝子として、MYC, cyclin D1, Axin, survivin, MMP7 について検討し、さらにリアルタイム PCR 法にてこれらの発現レベルを定量化した。

3) テロメアバイオロジーの検討：

テロメラーゼは、細胞の不死化に関与する酵素であり、この酵素の活性化とともにこの酵素の触媒部分である TERT (human telomerase reverse transcriptase) の発現上昇が肝芽腫予後因子としての有用であることを以前より示してきた。そこで、今回は腫瘍と正常組織の由来 DNA を制限酵素 Hinf I 処理して、テロメアプローブ (TTAGGG)₄ のサザンブロット法で得られるシグナルの長さ TRF (terminal restriction fragment) 長を測定した。また、TRAP (telomeric repeat amplification protocol)法にてテロメラーゼ活性を測定するとともに、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。以前に、Wnt/ β -カテニンシグナルとの関連を検討した結果、TERT が BRG1 (also called SMARCA4), a SWI/SNF-related chromatin remodeling protein を介して β -catenin-TCF 複合体を活性化することで、Wnt/ β カテニンシグナル依存性蛋白の発現を亢進させていることが明らかになっている。そこで、TERT と β catenin の間の存在し β catenin 調節を行っている BRG-1 (SMARCA4) 遺伝子発現を同様に RT-PCR 法にて検討した。

上記の結果から、肝芽腫のリプログラミングの関連する因子の存在について検討した。

C. 研究結果

1) 遺伝子変異検索：

SNP アレイの結果から、肝芽腫検体では様々な変化が見出されたが、染色体の増減からみると

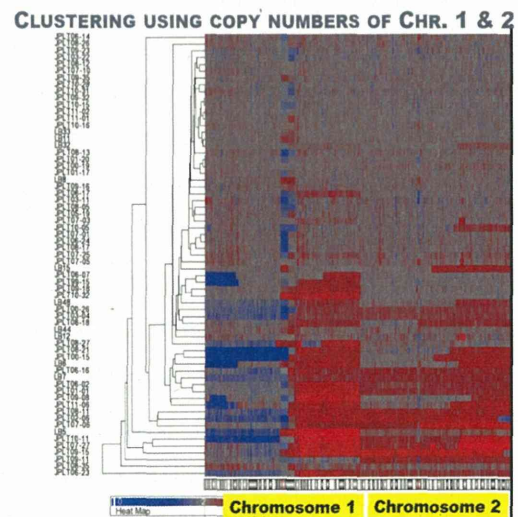


図1：SNP array データからの染色体1番、2番異常のクラスタリング：

1番及び2番染色体異常が数多くみいだされた。1番及び2番染色体異常が数多くみいだされ、特に予後不良例に染色体異常が多くみられた(図

1)。こうした、染色体異常部位に存在する遺伝子の機能を検索すると（図2）、細胞増殖、がん化、再生に関わる遺伝子が多く存在していた。

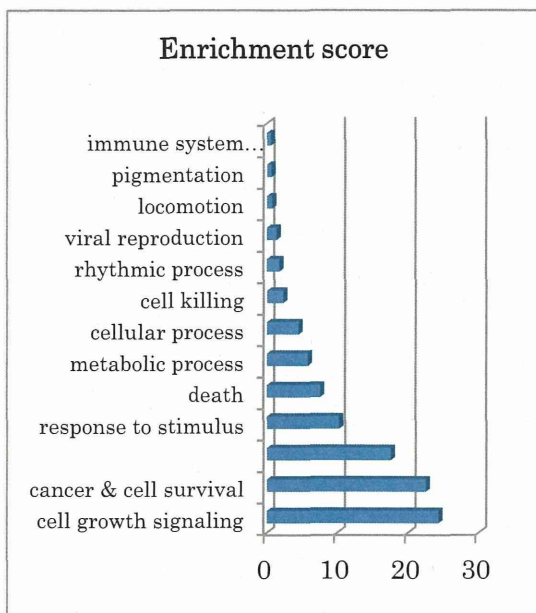


図2：染色体1番2番欠失部位での遺伝異常条例のクラスタリング解析：

細胞増殖、がん化、再生に関わる遺伝子が多く存在していた。

2) 遺伝子発現検索：

層別化クラスタリングにて、遺伝子発現量の差で予後良好例と予後不良症例を層別しうる遺伝子が344遺伝子抽出された。これらの遺伝子の詳細までは検討するに至らなかったがWntシグナル系の遺伝子やAFPなどは含まれていた(図3)。一部の解析から、アミノ酸の代謝経路に関わる遺伝子群、胎児発生おける転写後調節に関わる遺伝子群が見出された。

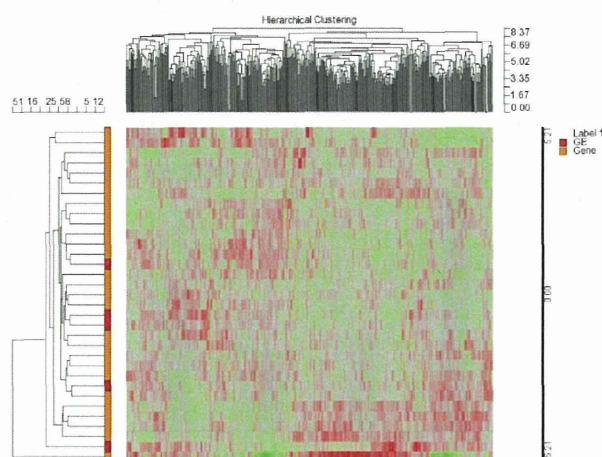


図3；遺伝子異常からみた344遺伝子によるクラスタリング解析。遺伝子発現パターンからいくつかのクラスターに分類可能。下方の方が予後不良例となった。

3) テロメアバイオロジーの検討：

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。そこで、*TERT* 高発現腫瘍とそれ以外の腫瘍で、Wntシグナルターゲット遺伝子の発現レベルを比較検討した。その結果、検索した6遺伝子ともに*TERT* 高発現腫瘍の方が高値であり、3遺伝子(*MYC*, *CCND1*, *ABCSB1*)は有意に高値であった。(P < 0.05)

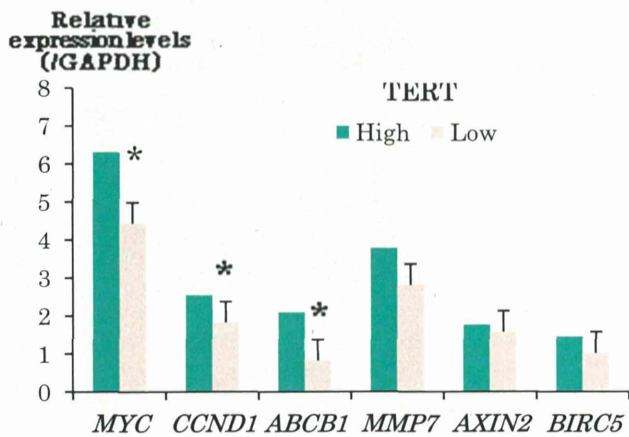


図4：TERT 発現と Wnt/β catenin 標的遺伝子の発現量 (* : P < 0.05)

D. 考察

SNP アレイデータから、染色体の増減からみると1番及び2番染色体異常が数多くみだされ、特に予後不良例に染色体異常が多くみられ、細胞増殖、がん化、再生に関わる遺伝子が多く存在していた。これらの部位の遺伝子の変化によって、胎生期の hepatoblast から hepatocyte への分化が制限され、あるいはより成長の早い細胞に変化することが肝芽腫発症に関与していること示唆された。

遺伝子発現アレイの層別化クラスタリングにて、遺伝子発現量の差で予後良好例と予後不良例を層別化する遺伝子に Wnt シグナル系に関与している遺伝子や AFP が見出されてことから、肝芽腫の発症や進展にこれらの遺伝子発現の変化が関与していることは異論のないところと考えられる。また、パスウェイ解析から、胎児発生における転写後調節に関わる遺伝子群が見出されたことは、肝芽腫発症に胎内の遺伝子発現調整すなわちエピジェネティックな変化の関与が強く示唆された。

RT-PCR での成果も Wnt/β-カテニン標的遺伝

子である MYC, CCND1 and ABCB1 遺伝子の活性化レベルが予後と関連していた。従来から、TERT の発現レベルやテロメラーゼ活性化が予後と関連した一因となったのは、Wnt/β-カテニン標的遺伝子の発現亢進に帰する可能性が示唆され、これらの Wnt/β-カテニンシグナルの抑制が治療の標的となる可能性が示唆された。さらに、TERT の発現として c-myc が強力なプロモーターであることが知られており、c-myc は Wnt/β-カテニンシグナルの標的遺伝子であることから、Wnt/β-カテニンシグナルで活性化した c-myc が TERT の発現を亢進させて、さらに c-myc の発現が促されることになる悪循環が生じ、細胞はさらに増殖に向かうことになり、これが悪性化の一因と考えられる(図5)。最近、欧州のグループが肝芽腫のマイクロアレイの検討で、浸潤あるいは転移性肝芽腫と予後に関連する 16 遺伝子を明らかにした。これらの 16 遺伝子は、MYC 伝達系の亢進に特徴づけられた増殖を亢進させる遺伝子であった。これらの所見は、TERT と myc の悪循環が予後不良な肝芽腫を特徴づけていることを指示する結果と考えられた。

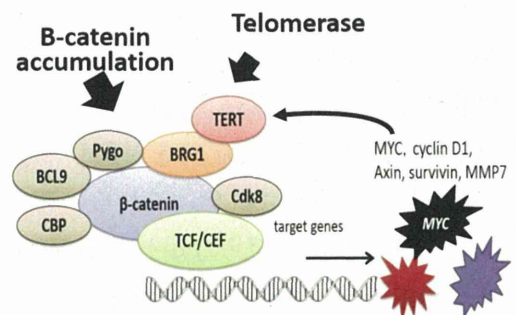


図5：TERT 活性化と Wnt シグナル活性化の関連

以上から、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が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關与している可能性が示唆された。これらの機序を解明すべく、現在、メチル化解析や次世代シーケンサーの技術など導入して、さらに詳細を検討している。これらの成果が得られれば、個々の活性化ルートに依存した分子標的療法が可能となると考えられる。また、未熟児や Beckwith-Wiedemann 症候群での易罹患性と關連する遺伝子が同定に應用されることも期待している。

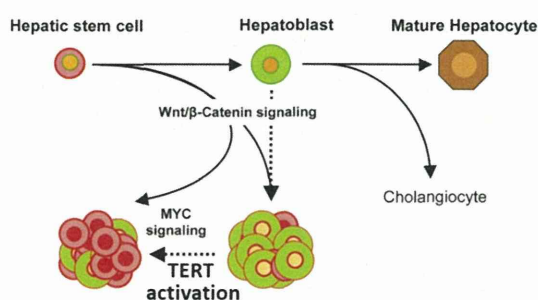


図 6：肝芽腫の発生機序と悪性化機序

E. 結論

肝芽腫検体の SNP アレイ、発現解析アレイやテロメアバイオロジーの検索から、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

現レベルの変化が關与していた。これらには、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關連していることが示唆されたことから、メチル化解析などによる今後の詳細な検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiyama E. Pediatric Hepatoblastoma: diagnosis and treatment. *Translational Pediatrics*, in press
- 2) 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.

2. 学会報告等

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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（業務報告）

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

担当責任者 大喜多 肇 慶應義塾大学医学部病理学教室 准教授

研究要旨：

ユーイング肉腫は小児・若年成人に好発する骨軟部肉腫で、その腫瘍発生には EWSR1-ETS 融合遺伝子が重要な役割を演じている。融合遺伝子による腫瘍発生機構の理解のために、骨髄間葉系幹細胞に EWSR1-FLI1 を発現させ、DNA メチル化の変化を Infinium human methylation assay によって検討した。全プローブによる解析では、EWSR1-FLI1 は骨髄間葉系幹細胞の DNA メチル化パターンをユーイング肉腫様に変化させるには至らないが、一部の CpG サイトのメチル化はユーイング肉腫様へ変化した。これらのことより、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。

A. 研究目的

ユーイング肉腫は、小児期～若年成人期に好発する骨軟部の悪性腫瘍である。近年、化学療法をはじめとする治療法の進歩により治療成績は向上しつつあるものの、治癒率は 50%程度でありいまだに難治性の腫瘍である。本腫瘍の 90%以上では、EWSR1 遺伝子と FLI1 や ERG 遺伝子のような ETS ファミリーの転写因子が染色体転座によって融合し、キメラ遺伝子が形成される（EWSR1/ETS キメラ遺伝子）。このキメラ遺伝子は、本腫瘍に極めて特異性が高く、確定診断をつける上で重要であり、かつ、腫瘍発生にも重要な役割を演じている。その機能を明らかにすることが、ユーイング肉腫の発生機序の解明に重要と信じられており、様々な解析がなされ、本遺伝子が様々な標的遺伝子の転写を調節することにより、腫瘍発生に関わっていると考えられている。キメラ遺伝子によって転写が亢進する遺伝子として CCND1、NKX2.2、ID2、DKK2、NR0B1、PDGFC、EZH2、IGF1、TOPK、CAV1、SOX2 などが、転写

が抑制される分子としては TGFB2R、IGFBP3、CDKN1C、CDKN1A、DKK1 などが報告されている。

そこで、本研究では、ユーイング肉腫特異的キメラ遺伝子とその発生母地と想定される骨髄間質細胞に発現させるユーイング肉腫発症モデルの解析を更に進め、それによって新たな本腫瘍の発生機序を解明し、治療標的分子を探索することを目的とした。特に DNA メチル化解析により、本腫瘍の発生へのエピジェネティクスの関与を検討した。

B. 研究方法

間葉系幹細胞である UET13 細胞に TetR と EWSR1/FLI1 を導入し 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、4 日、16 日、42 日、69 日培養した。また、ユーイング肉腫の細胞株である SK-ES1、RD-ES SYM1、EW93、NCR-EW2 も用いた。Genome DNA を抽出

し、Illumina, Infinium DNA メチル化アッセイ (Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit) を用いて網羅的に CpG サイトのメチル化状態を解析し、GenomStudio を用いて階層的クラスタリング等の解析を行った。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)

本年度は細胞誘導系の実験系を用いるが、来年度以降、臨床検体を用いた解析を実施するにあたり、説明・同意により使用同意を受けた検体あるいは匿名化された既存検体を準備中である。

C. 研究結果

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。本アッセイでは、485,000 カ所以上の CpG サイトを 1 塩基の解像度で解析可能で、各 CpG 部位のメチル化の程度は、メチル化検出用のプローブと非メチル化プローブの蛍光強度の比率 (β -value、0-1 の値で示される) によって表され、0 は全くメチル化されていない状態、1 は完全にメチル化されている状態である。全プローブを用いた階層的クラスタリングを行ったところ 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。

Dox 添加後 4 日と 16 日では、それぞれの細胞が添加後の時間毎にクラスター形成したが、42 日と 69 日では、DOX 添加群と DOX 非添加群がクラスター形成し、DOX 添加によるメチル化パターン変化に

は 16 日以上が必要なことが示唆された。42 日と 69 日で、DOX 添加群と非添加群の比較では、DOX 添加により高メチル化、低メチル化となる CpG サイトが認められるものの、DOX 添加群により高メチル化傾向が認められた。

DOX 添加により β value が 0.2 以上上昇するプローブは、42 日で 39、69 日で 859 あり、両者で 0.2 以上上昇するプローブは 18 あった。その中には ADAP1、ECHDC3、FTO、ADARB2、SYT3、SHANK2、HAVCR1、SHANK2、KIF25、MDFIDOX のプローブが含まれていたが、本アッセイでは一遺伝子に対して多数のプローブが準備されているにもかかわらず、複数のプローブで高メチル化がみられた遺伝子は 1 遺伝子にすぎなかった。しかしながら、42 日、69 日ともに過メチル化を示す 18 プローブのうち、16 プローブでは、ユーイング肉腫細胞で UET13 よりも高メチル化であり、これらのプローブの高メチル化が偶然ではないことも示唆された。

一方、DOX 添加により β value が 0.2 以上低下するプローブは、42 日で 32、69 日のサンプルで 54 であり、両者で 0.2 以上低下するプローブは 4 のみであった。この中には、PDE4D、THRB が含まれていた。42 日、69 日とも低メチル化を示した 4 プローブは、全て、ユーイング肉腫細胞と UET13 でほぼ同等のメチル化を示したことから、腫瘍特異的な変化ではない可能性も示唆された。

D. 考察

ユーイング肉腫は、EWSR1-ETS 融合遺伝子とその腫瘍発生に深く関わっていると考えられている。近年の次世代シーケンサーを用いた解析でもユーイング肉腫で繰り返し認められる融合遺伝子異常以外の遺伝子異常は、STAG2、CDKN 2 A、p53 のみであり、かなり少数であることが判明し

ている。これらのことは、従来考えられていたように融合遺伝子が本腫瘍の発生に決定的な役割を演じていることを示唆している。しかしながら、融合遺伝子は、腫瘍発生の過程で、異常な転写因子として機能することにより標的遺伝子の転写を調節するとされているが、詳細な機序はいまだに不明である。

本研究の結果により、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。融合遺伝子がメチル化へ影響を与えることが示唆されるが、このメチル化変化が腫瘍発生に関与するか、二次的に生じているか等の解析が必要である。EWSR1-FLI1により高メチル化となり、ユーイング肉腫細胞でも骨髄間葉系幹細胞より高メチル化な 16CpG サイトを含む遺伝子は、EWSR1-FLI1によって転写を抑制される標的ではないようであり、これらの腫瘍発生との関連は更なる検討が必要である。

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

ユーイング肉腫のモデル系を用いて EWSR1-FLI1 が DNA メチル化に与える影響を検討した。EWSR1-FLI1 は骨髄間葉系幹細胞の DNA メチル化パターンをユーイング肉腫様へ変化させるには至らないが、一部の CpG サイトにおいてユーイング肉腫同様の高メチル化を惹起した。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

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し。

2. 学会発表

無し。

H. 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

委託業務題目「神経芽腫発生のエピジェネティクス異常とNCYMの役割」

機関名 佐賀県医療センター医学研究所 中川原 章

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
なし				

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
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.	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.	PLoS Genet.	2014	国外
RUNX3 interacts with MYCN and facilitates protein degradation in neuroblastoma.	Yu F, Gao W, Yokochi T, Suenaga Y, Ando K, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A.	Oncogene	2014	国外
Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma.	Nakamura Y, Suganami A, Fukuda M, Hasan MK, Yokochi T, Takatori A, Sato S, Hoshino T, Tamura Y, Nakagawara A.	Cancer Med.	2014	国外
Two cases of neuroblastoma comprising two distinct clones.	Yamazaki F, Nakazawa A, Shimojima N, Tanaka T, Nakagawara A, Shimada H.	Pediatr. Blood Cancer	2014	国外
Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulates MYCN/ATM/p53 pathway.	Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T.	Eu. J. Cancer	2014	国外
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.	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.	J. Clin. Oncol.	2014	国外
RASSF1A methylation may have two biological roles on neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients.	Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y.	Cancer Letters	2014	国外
Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association.	Tomiya A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaoka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R.	Cancer Res.	2014	国外
Receptor-type protein tyrosine phosphatase indirectly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation.	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.	Oncogene	2014	国外
Significance of clinical and biologic features in stage 3 neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project.	Meany HJ, London WB, Ambros PF, Matthay KK, Monclair T, Simon T, Garaventa A, Berthold F, Nakagawara A, Cohn SL, Pearson ADJ, Park JR.	Pediatr. Blood Cancer	2014	国外
Clinical, biological, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project.	Vo KT, Matthay KK, Neuhaus J, London WB, Hero B, Ambros PF, Nakagawara A, Miniati D, Wheeler K, Pearson ADJ, Cohn SL, DuBois SG.	J. Clin. Oncol.	2014	国外
Revised risk estimation and treatment stratification of low- and intermediate-risk neuroblastoma patients by integrating clinical and molecular prognostic markers.	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.	Clin. Cancer Res.	2014	国外
Intracellular fragment of NLRR3 (NLRR3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation.	Akter J, Takatori A, Islam MS, Nakazawa A, Ozaki T, Nagase H, Nakagawara A.	Biochem Biophys Res Commun.	2014	国外
BMCC1, which is an interacting partner of BCL2, attenuates AKT activity, accompanied by apoptosis.	Tatsumi Y, Takano R, Islam MS, Yokochi T, Itami M, Nakamura Y, Nakagawara A.	Cell Death and Disease	2014	国外
Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma.	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.	J. Clin. Oncol.	2014	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「新規小児芽腫モデルマウス作製の試みとヒト小児がんにおける細胞初期化の関与検討」

機関名 京都大学iPS細胞研究所 山田 泰広

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Nuclear Reprogramming and the Cancer Genome(口頭)	Yamada Y.	Guangzhou, China (Nature Conference)	Oct. 31-Nov. 2, 2014	国外
ADVANCES IN NEUROBLASTOMA RESEARCH(口頭)	Yamada Y.	Colonge, Germany (ADVANCES IN NEUROBLASTOMA RESEARCH)	May 13-16, 2014	国外
Dissecting Cancer Biology by Studying induced Pluripotency(口頭)	Yamada Y.	Seoul, Korea (8th International Cell Therapy Conference)	Oct. 23, 2014	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation.	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	Cell	2014	国外
Concise Review: Dedifferentiation Meets Cancer Development: Proof of Concept for Epigenetic Cancer.	Yamada Y, Haga H, Yamada Y	Stem Cells Transl Med.	2014	国外
Application of iPS cell technology to cancer epigenome study: Uncovering the mechanism of cell status conversion for drug resistance in tumor.	Matsuda Y, Semi K, Yamada Y	Pathol Int.	2014	国外
Epigenetic regulation leading to induced pluripotency drives cancer development in vivo.	Ohnishi K, Semi K, Yamada Y	Biochem Biophys Res Commun.	2014	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

委託業務題目「両側性腎芽腫研究とJWITS3臨床研究の分子遺伝学的検討」

機関名 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 金子 安比古

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
BRCA1 関連ゲノム異常は予後良好トリプルネガティブ乳癌と、BRCA2 関連ゲノム異常は予後不良ER 陽性乳癌と相関する。	金子安比古、高田護、春田雅之、戸塚勝理、武井寛幸、永井成勲、井上賢一、黒住昌史、宮崎勝、佐藤亜以子、佐藤悠祐、小川誠司	第73回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜	2014.9.7.	国内
Parental Inheritance and WT1 abnormality types may affect the penetrance rate of hereditary Wilms tumor.	Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Koshinaga T, and Fujiwara Y.	American Society of Human Genetics 64 th Annual Meeting, San Diego, California, USA	Oct, 2014	国外
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 / Parental Inheritance and WT1 Abnormality Types May Affect the Penetrance Rate of Hereditary Wilms Tumor.	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	日本人類遺伝学会第59回大会。東京都	2014.11.	国内
Parental inheritance and <i>WT1</i> abnormality types may affect the penetrance rate of hereditary Wilms tumor.	Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Koshinaga T, Yoneda A, Ohtsuka Y, Fujiwara Y.	第56回日本小児血液・がん学会。岡山市。	2014.11.	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Social and biological factors influencing the outcomes of children with Wilms tumors in Kenya and other Sub-Saharan countries.	Kumon K, Kaneko Y.	Transl Pediatr.	2014	国内
High-incidence spontaneous tumors in JF1/Ms mice: relevance of hypomorphic germline mutation and subsequent promoter methylation of Ednrb.	Watanabe J, Kaneko Y, Kurosumi M, Kobayashi Y, Sakamoto M, Yoshida MA, Akiyama M, Matsushima Y.	J Cancer Res Clin Oncol.	140:99-107, 2014. doi: 10.1007/s00432-013-1546-6. Epub 2013 Nov 6.	国内
Bilateral Wilms tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol.	Oue T, Koshinaga T, Okita H, Kaneko Y, Hinotsu S, Fukuzawa M.	Pediatr Blood Cancer.	61:1184-1189, 2014. doi: 10.1002/pbc.24979. Epub 2014 Feb 12.	国内
RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients.	Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y.	Cancer Letters.	348:167-176, 2014. doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.022. Epub 2014 Mar 26.	国内
Trim32 facilitates degradation of MYCN on spindle poles and induces asymmetric cell division in human neuroblastoma cells.	Izumi H, Kaneko Y.	Cancer Res,	74:5620-5630, 2014. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0169. Epub 2014 Aug 6.	国内
A high incidence of <i>WT1</i> abnormality in bilateral Wilms tumours in Japan and children with <i>WT1</i> incidences of epigenetic but not genetic abnormalities germline mutation.	Kaneko Y, Okita H, Haruta M, Arai Y, Oue T, Tanaka Y, Horie H, Hinotsu S, Koshinaga T, Yoneda A, Ohtsuka Y, Taguchi T, Fujiwara Y.	Brit J Cancer,	2015. doi: 10.1038/bjc.2015.13.	国内
Wilms腫瘍(腎芽腫)の発生に関わるジェネティック・エピジェネティック異常、および遺伝性・両側性Wilms腫瘍の原因遺伝子。	金子安比古	日小血がん誌	51: 423-431, 2014.	国内

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

委託業務題目「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」

機関名 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 細井 肇

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所 （学会等名）	発表した時期	国内・外の別
なし				

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
なし				

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

委託業務題目「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」

機関名 国立大学法人広島大学 檜山英三

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所 （学会等名）	発表した時期	国内・外の別
なし				

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Pediatric Hepatoblastoma: diagnosis and treatment.	Hiyama E	Translational Pediatrics	inpress	国外
Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy	Czauderna P, Haeberle B, Hiyama E, et al.	Curr Opin Pediatr, 26: 19-28, 2014.	2014	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

様式第19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「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」

機関名 慶應義塾大学医学部 大喜多 肇

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所 （学会等名）	発表した時期	国内・外の別
なし				

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
なし				

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

IV 研究成果の刊行物・別刷

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 Neuroblastomas

Yusuke Suenaga¹, S. M. Rafiqul Islam¹, Jennifer Alagu¹, Yoshiki Kaneko¹, Mamoru Kato², Yukichi Tanaka³, Hidetada Kawana⁴, Shamim Hossain^{1#a}, Daisuke Matsumoto¹, Mami Yamamoto¹, Wataru Shoji^{1,5}, Makiko Itami⁴, Tatsuhiro Shibata², Yohko Nakamura¹, Miki Ohira⁶, Seiki Haraguchi^{1#b}, Atsushi Takatori¹, Akira Nakagawara^{1*}

1 Division of Biochemistry and Innovative Cancer Therapeutics and Children's Cancer Research Center, Chiba Cancer Center Research Institute, 666-2 Nitona, Chuo-ku, Chiba, Japan, **2** Division of Cancer Genomics, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, Japan, **3** Department of Diagnostic Pathology, Research Institute, Kanagawa Children's Medical Center, 2-138-4 Mutsukawa, Minami-ku, Yokohama, Japan, **4** Division of Surgical Pathology, Chiba Cancer Center, 666-2 Nitona, Chuo-ku, Chiba, Japan, **5** Department of Pediatric Surgery, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan, **6** Laboratory of Cancer Genomics, Chiba Cancer Center Research Institute, 666-2 Nitona, Chuo-ku, Chiba, Japan

Abstract

The rearrangement of pre-existing genes has long been thought of as the major mode of new gene generation. Recently, *de novo* gene birth from non-genic DNA was found to be an alternative mechanism to generate novel protein-coding genes. However, its functional role in human disease remains largely unknown. Here we show that *NCYM*, a *cis*-antisense gene of the *MYCN* oncogene, initially thought to be a large non-coding RNA, encodes a *de novo* evolved protein regulating the pathogenesis of human cancers, particularly neuroblastoma. The *NCYM* gene is evolutionally conserved only in the taxonomic group containing humans and chimpanzees. In primary human neuroblastomas, *NCYM* is 100% co-amplified and co-expressed with *MYCN*, and *NCYM* mRNA expression is associated with poor clinical outcome. *MYCN* directly transactivates both *NCYM* and *MYCN* mRNA, whereas *NCYM* stabilizes *MYCN* protein by inhibiting the activity of GSK3 β , a kinase that promotes *MYCN* degradation. In contrast to *MYCN* transgenic mice, neuroblastomas in *MYCN/NCYM* double transgenic mice were frequently accompanied by distant metastases, behavior reminiscent of human neuroblastomas with *MYCN* amplification. The *NCYM* protein also interacts with GSK3 β , thereby stabilizing the *MYCN* protein in the tumors of the *MYCN/NCYM* double transgenic mice. Thus, these results suggest that GSK3 β inhibition by *NCYM* stabilizes the *MYCN* protein both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the survival of *MYCN* transgenic mice bearing neuroblastoma was improved by treatment with NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor shown to destabilize *MYCN* via GSK3 β activation. In contrast, tumors caused in *MYCN/NCYM* double transgenic mice showed chemo-resistance to the drug. Collectively, our results show that *NCYM* is the first *de novo* evolved protein known to act as an oncopromoting factor in human cancer, and suggest that *de novo* evolved proteins may functionally characterize human disease.

Citation: Suenaga Y, Islam SMR, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, et al. (2014) *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 Neuroblastomas. *PLoS Genet* 10(1): e1003996. doi:10.1371/journal.pgen.1003996

Editor: Martin Eilers, Universität Würzburg, Germany

Received: April 18, 2013; **Accepted:** October 18, 2013; **Published:** January 2, 2014

Copyright: © 2014 Suenaga et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare for the Third Term Comprehensive Control Research for Cancer, Japan (AN), a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (JSPS KAKENHI Grant Number 17015046) (AN), a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (JSPS KAKENHI Grant Number 24249061) (AN), a Grant-in-Aid for Research Activity start-up (JSPS KAKENHI Grant Number 22890241) (YS) and a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (JSPS KAKENHI Grant Number 24700957) (YS) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), a Global COE program (Global Center for Education and Research in Immune System Regulation and Treatment), Graduate School of Medicine, Chiba University (AN and YS), Takeda Science Foundation (AN), and National Cancer Center Research and Development Fund (23-A-8) (TS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: akiranak@chiba-cc.jp

#a Current address: Department of Integrative Physiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Japan.

#b Current address: Animal Breeding and Reproduction Division, NARO Institute of Livestock and Grassland Science, 2 Ikenodai, Tsukuba, Japan.

Introduction

Gene evolution has long been thought to arise from pre-existing genes through duplication or rearrangement followed by rapid divergence [1–5]. *De novo* gene birth from non-coding genomic regions has been generally believed to be exceptionally rare [1]. However, recent studies using genome-wide analyses have suggested the presence of a large number of *de novo* evolved genes in some species [3,5–11], including primates [12–17]. Studies in

yeast revealed that the proteins produced from *de novo* genes were not insignificant polypeptides but functional proteins [6,7] and that *de novo* gene birth could be a major mechanism of new gene generation [6]. In multicellular organisms, however, the functions of *de novo* evolved proteins have been poorly characterized [3,15], and thus their pathophysiological significance has remained elusive. Therefore, it is still unclear whether *de novo* gene birth is a general mechanism throughout evolution for the creation of functional protein-coding genes.

Author Summary

The *MYCN* oncogene has a central role in the genesis and progression of neuroblastomas, and its amplification is associated with an unfavorable prognosis. We have found that *NCYM*, a *MYCN* cis-antisense RNA, is translated in humans to a *de novo* evolved protein. NCYM inhibits GSK3 β to stabilize MYCN, whereas MYCN induces *NCYM* transcription. The positive feedback regulation formed in the *MYCN/NCYM*-amplified tumors promotes the aggressive nature of human neuroblastoma. *MYCN* transgenic mice, which express human *MYCN* in sympathoadrenal tissues, spontaneously develop neuroblastomas. However, unlike human neuroblastoma, distant metastasis is infrequent. We established *MYCN/NCYM* double transgenic mice as a new animal model for studying neuroblastoma pathogenesis. We found that NCYM expression promoted both the metastasis and chemo-resistance of the neuroblastomas formed in the double transgenic mice. These results demonstrate that NCYM may be a potential target for developing novel therapeutic tools against high-risk neuroblastomas in humans, and that the *MYCN/NCYM* double transgenic mouse may be a suitable model for the screening of these new drugs.

Neuroblastoma is one of the most common solid tumors in children. It originates from the neuronal precursor cells of the sympathoadrenal lineage of the neural crest [18]. Its clinical behavior is enigmatic; the tumors in patients of less than one year of age often regress spontaneously, whereas the tumors detected in patients over one year of age are usually aggressive and eventually cause the patient's death despite intensive multimodality therapies [18]. The *MYCN* oncogene is frequently amplified in those tumors that occur in patients who are over one year of age at diagnosis [19,20]. Transgenic mice expressing human *MYCN* in sympathoadrenal tissues spontaneously develop neuroblastomas [21], suggesting that *MYCN* alone can initiate tumorigenesis and promote tumor growth. However, unlike human neuroblastoma, its distant metastasis is infrequent. Furthermore, in human neuroblastomas without *MYCN* amplification, *MYCN* mRNA expression levels do not correlate with the prognosis of the patients [22,23], suggesting that additional events might contribute to the acquisition of increased aggressiveness. We focused on *NCYM* as a candidate gene that promotes the aggressiveness of *MYCN*-amplified neuroblastomas. *NCYM* is a cis-antisense gene of *MYCN* [24,25] and is co-amplified with *MYCN* in human neuroblastoma cells. *NCYM* is transcribed in the opposite direction to *MYCN*, starting from intron 1 of the *MYCN* gene (Figure 1A), and it has remained unclear for a long time whether the gene encodes a functional protein [24,26]. In this study, we have found that NCYM is indeed a functional protein that regulates MYCN function in human, but not mouse, neuroblastoma.

Results

NCYM is a *de novo* evolved gene

We first analyzed the genomic sequence of *NCYM* in various species and found that in humans and chimpanzees the potential NCYM protein is composed of 109 amino acids (Figure 1B, Figure S1). We next searched for paralogs and orthologs of the human NCYM protein among other animals using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) databases with an E-value threshold of 10^{-3} . We did not find any paralogs, but identified orthologs for a probable NCYM protein in olive baboons,

chimpanzees and pigmy chimpanzees. From here on, we focused on the *NCYM* gene of the hominidae to investigate the function of the protein product. The evolutionary rates between the indicated species suggest that the coding sequence of *NCYM* gene was exposed to positive selection in humans and chimpanzees (Figure 1C), and the amino acid frequencies in these species were significantly different from the uniform usage of amino acids ($P < 0.001$; Figure S2). We next raised an antibody against the putative human NCYM protein, and identified a 12 to 15 kDa protein in human neuroblastoma cells which mainly localized to nuclei in *MYCN*-amplified neuroblastoma cells (Figure S3, Figure S4). The NCYM protein was expressed in a variety of normal human tissues, including the neuronal cells of the cerebrum and cerebellum, spermatocytes of the testis, pancreatic cells and also the heart (Figure S5). NCYM was also localized in both the nucleus and cytoplasm in these cells (Figure S5A–D). NCYM was expressed in both primary and metastatic human neuroblastomas (Figure 1D, Figure S5E and F), and was co-expressed with the MYCN protein in cells of human neuroblastomas (Figure 1D and E) and the neuronal cells of the human cerebrum (Figure 1F and G). It was also co-expressed with the MYCN protein in some primary human cancers, including thyroid cancer (Figure S6). Thus, the NCYM protein is a *de novo* evolved gene product and is endogenously expressed in both normal human tissues and cancers.

Prognostic significance of *NCYM* expression in human neuroblastoma

We next examined the prognostic significance of *NCYM* mRNA expression in human neuroblastoma. The *NCYM* gene was co-amplified with the *MYCN* gene in all the cell lines and primary neuroblastomas we examined (Figure S7). *NCYM* expression levels were significantly correlated with that of *MYCN* in primary neuroblastomas ($n = 106$, $P = 4.69 \times 10^{-16}$; Figure 2A) and in the tumors with a single copy of *MYCN* ($n = 86$, $P = 1.11 \times 10^{-13}$; Figure 2B). In addition, high levels of *NCYM* mRNA expression were significantly associated with unfavorable prognostic factors ($P < 0.05$, Table S1) and a poor outcome ($P = 3.70 \times 10^{-5}$; Figure 2C), similar to that for *MYCN* mRNA expression ($P < 0.05$; Table S1 and $P = 2.31 \times 10^{-5}$; Figure 2D). Interestingly, high levels of *NCYM* mRNA expression were also significantly correlated with poor outcome in those patients diagnosed at over one year of age without *MYCN* amplification ($n = 45$, $P = 0.0375$; Figure S8A) whereas those of *MYCN* did not correlate with the prognoses ($n = 45$, $P = 0.144$; Figure S8B). Multivariate analysis of 106 primary neuroblastomas showed, as expected, that *NCYM* mRNA expression is not an independent prognostic factor from expression and amplification of *MYCN* (Table S2). However, it is an independent prognostic factor from age at diagnosis, stage and *TtkA* expression.

Positive feedback regulation between NCYM and MYCN

The co-amplification and co-expression of *NCYM* and *MYCN* in human primary neuroblastomas prompted us to investigate the functional interaction between NCYM and MYCN. Previously we have reported that MYCN directly targets its own expression in neuroblastoma cell lines [27]. Because the promoter region of the *NCYM* gene is localized within intron 1 of *MYCN* (Figure S9A), we examined whether MYCN regulates *NCYM* transcription. Overexpression of MYCN in human neuroblastoma cells induced *NCYM* mRNA expression (Figure 3A), whereas shRNA-mediated knockdown of *MYCN* downregulated endogenous *NCYM* mRNA levels (Figure 3B). MYC overexpression did not induce either *MYCN* or *NCYM* expression (Figure S9B). However, MYCN

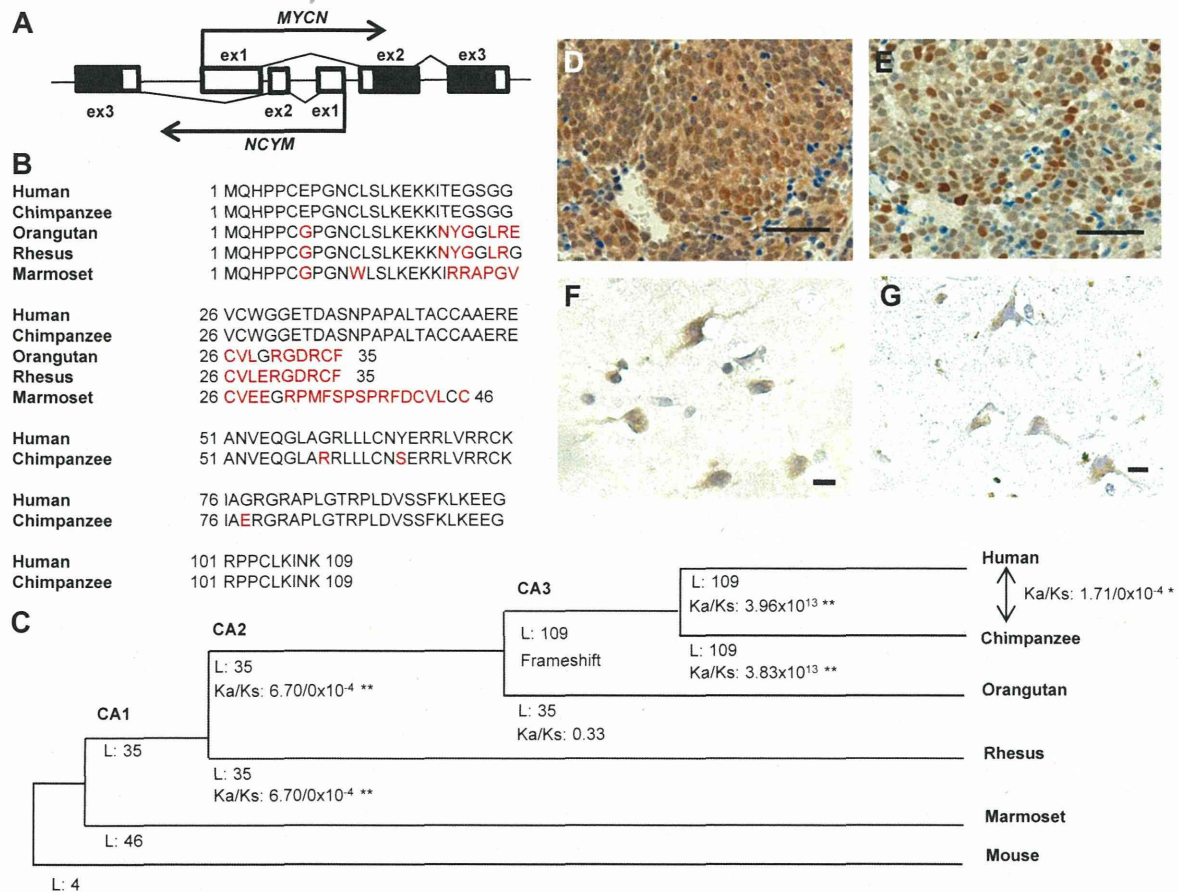


Figure 1. NCYM encodes a *de novo* evolved protein in humans. (A) Gene structure of the human *MYCN/NCYM* locus. (B) Alignment of the possible amino acid sequences of NCYM in the human and primate genomes, where the ORF of the primate genes begins at the same position as the human start codon. Red text indicates amino acid differences compared with human NCYM. (C) Change in protein features along the lineage shown. CA indicates common ancestor. L indicates the sequence length of amino acids before the first terminal codon. Asterisk indicates statistical significance (** $P < 0.001$, * $P < 0.05$). K_a and K_s indicate the rate of non-synonymous changes and synonymous changes, respectively. (D–G) The protein expression of NCYM and MYCN in human primary neuroblastomas (D, E) and normal human cerebrum (F, G). Scale bars, 100 μ m (D, E) and 50 μ m (F, G). Sections of neuroblastomas with *MYCN* amplification and those of normal human cerebrum were stained with anti-NCYM (D, F) or anti-MYCN (E, G) antibodies.

doi:10.1371/journal.pgen.1003996.g001

overexpression did enhance *NCYM* promoter activity in a dose-dependent manner (Figure 3C), suggesting that MYCN, but not MYC, activates the transcription of *NCYM*. Putative E-boxes exist in intron 1 of the *MYCN* gene; however, it is unclear whether they are responsible for this feedback regulation. We therefore generated constructs containing different lengths of the MYCN intron 1 region and performed luciferase assays to identify the MYCN-responsive region (Figure S9C). MYCN enhances its own promoter activity in a dose-dependent manner when co-transfected with reporter plasmids containing the NCYM promoter region (from +1073 to +1312). However, when co-transfected with plasmids without this NCYM promoter region, MYCN positive autoregulation was diminished. Within this region, there is a putative E-box located just 2 base pairs upstream from the transcription start site of the *NCYM* gene (Figure S10A). We generated constructs containing the NCYM promoter region comprising either a wild-type or a mutant E-box. Overexpression of MYCN enhanced NCYM wild-type promoter activity, but mutation of the E-box diminished its activation (Figure S10C). MYC overexpression did not activate either of the NCYM

promoter constructs (Figure S10B and C). Therefore, these results indicate that MYCN enhances NCYM promoter activity in an E-box-dependent manner. MYC, however, is not involved in *NCYM* transcription.

We next investigated the function of NCYM in neuroblastoma cells. NCYM overexpression induced MYCN protein levels (Figure 3D, left panel; Figure S11A), but had no effect on the mRNA levels of *MYCN* (Figure 3D, right panel; Figure S11A). Consistent with these results, shRNA-mediated knockdown of NCYM significantly downregulated the amount of MYCN protein without affecting the level of *MYCN* mRNA expression (Figure 3E). In addition, knockdown of NCYM decreased the stability of the MYCN protein (Figure S11B). This NCYM knockdown-mediated destabilization of MYCN could be inhibited using the proteasome inhibitor MG132 (Figure S11C). It is known that the stability of the MYCN protein is regulated by a series of phosphorylation and ubiquitination events that are required for its recognition by the proteasome [28]. CDK1/Cyclin B1 phosphorylates MYCN at serine 62: the mono-phosphorylated MYCN is then recognized by GSK3 β and subsequently phosphorylated at threonine 58, leading

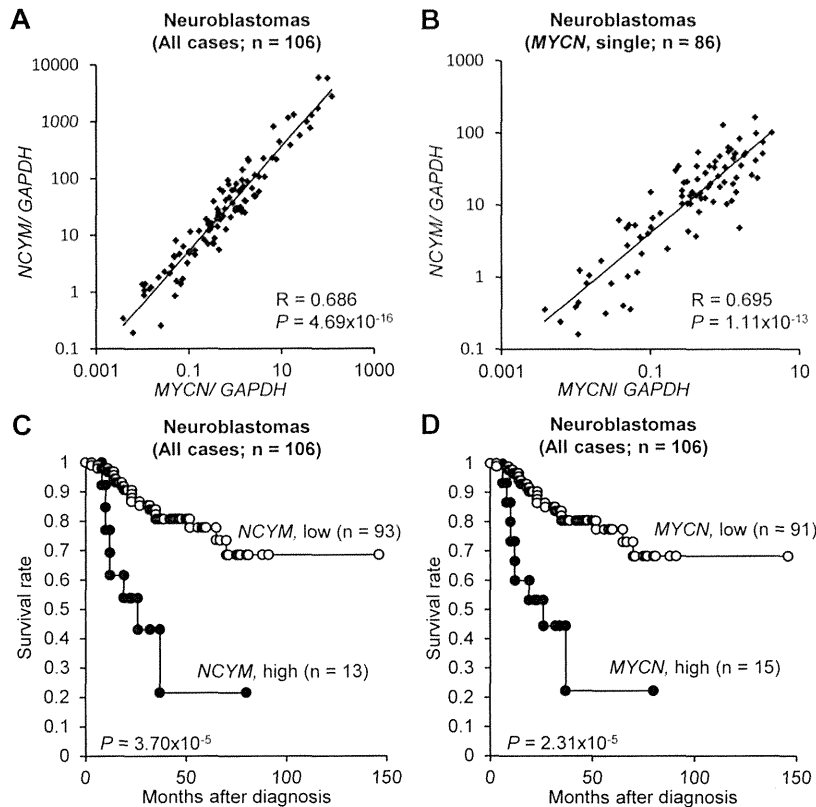


Figure 2. NCYM expression is associated with poor prognosis in human neuroblastoma. (A) NCYM mRNA expression correlates with that of MYCN in human primary neuroblastomas (n = 106, $R_s = 0.686$, $P = 4.69 \times 10^{-16}$). (B) NCYM mRNA expression correlates with that of MYCN in human primary neuroblastomas with MYCN single copy (n = 86, $R_s = 0.695$, $P = 1.11 \times 10^{-13}$). The mRNA expression of NCYM and MYCN was detected by qRT-PCR and normalized using GAPDH. (C) Kaplan–Meier survival curves (n = 106, $P = 3.70 \times 10^{-5}$, log-rank test). The expression levels of NCYM were designated high (n = 13, closed circle) or low (n = 93, open circle) based on the respective average expression. (D) Kaplan–Meier survival curves. The expression levels of MYCN were designated high (n = 15, closed circle) or low (n = 91, open circle) based on the respective average expression. High MYCN mRNA expression was significantly correlated with poor prognosis (n = 106, $P = 2.31 \times 10^{-5}$, log-rank test). doi:10.1371/journal.pgen.1003996.g002

to its proteasome-dependent protein degradation after an E3-mediated polyubiquitination [28,29]. Therefore, using immunoprecipitation, we next searched for factors interacting with NCYM that are able to induce MYCN stabilization, and found that NCYM forms a complex with MYCN and GSK3 β in CHP134 cells (Figure 3F and G). In addition, purified NCYM was capable of interacting with purified GSK3 β and MYCN *in vitro* (Figure 3H). To examine the effect of NCYM on GSK3 β -mediated phosphorylation of MYCN, we performed an *in vitro* kinase assay (Figure 3I). NCYM protein inhibited the phosphorylation of MYCN. Because the purified NCYM protein is not a substrate of GSK3 β (Figure S12), it is unlikely that NCYM competes with MYCN for GSK3 β as a substrate. Taken together these results suggest that the NCYM protein inhibits GSK3 β -mediated MYCN phosphorylation and stabilizes the MYCN protein *in vitro*.

It has been reported that MYCN knockdown decreases cell proliferation and induces apoptosis and/or differentiation in MYCN-amplified neuroblastoma cells [30]. Therefore, we next investigated the functional role of NCYM in these cells (Figure S13 and S14). We performed NCYM knockdown in BE (2)-C, CHP134, SK-N-AS and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. SK-N-AS and SH-SY5Y cells are MYCN-single copy but have a high expression of MYC, while BE (2)-C and CHP134 are cell lines

with MYCN-amplification and hence have a high expression of MYCN and NCYM (Figure S13A). NCYM knockdown did not affect the survival of the MYCN-single neuroblastoma cell lines, but promoted massive apoptosis of the MYCN-amplified neuroblastoma cells (Figure S13B and C). In addition, in BE (2)-C cells, NCYM knockdown was found to inhibit cell proliferation and invasion (Figure S14B and D). These results suggest that NCYM promotes the survival and aggressiveness of MYCN-amplified neuroblastoma cells.

Co-expression of MYCN/NCYM in mice promotes neuroblastoma metastasis

To assess the function of NCYM *in vivo*, we generated transgenic mice expressing the human NCYM gene under the control of the rat tyrosine hydroxylase (TH) promoter (Figure S15A and B). In addition, we made double transgenic mice carrying both the human MYCN and NCYM genes. NCYM Tg/+ mice were mated with MYCN Tg/+ NCYM Tg/+ mice, and 83 descendants were observed for 200 days (Figure S15C and D). None of the NCYM transgenic mice of the 129^{ter}/SVJ background developed neuroblastoma (Figure S15D), suggesting that NCYM overexpression alone is not sufficient to initiate neuroblastoma *in vivo*. Although tumor formation was not accelerated in the MYCN/

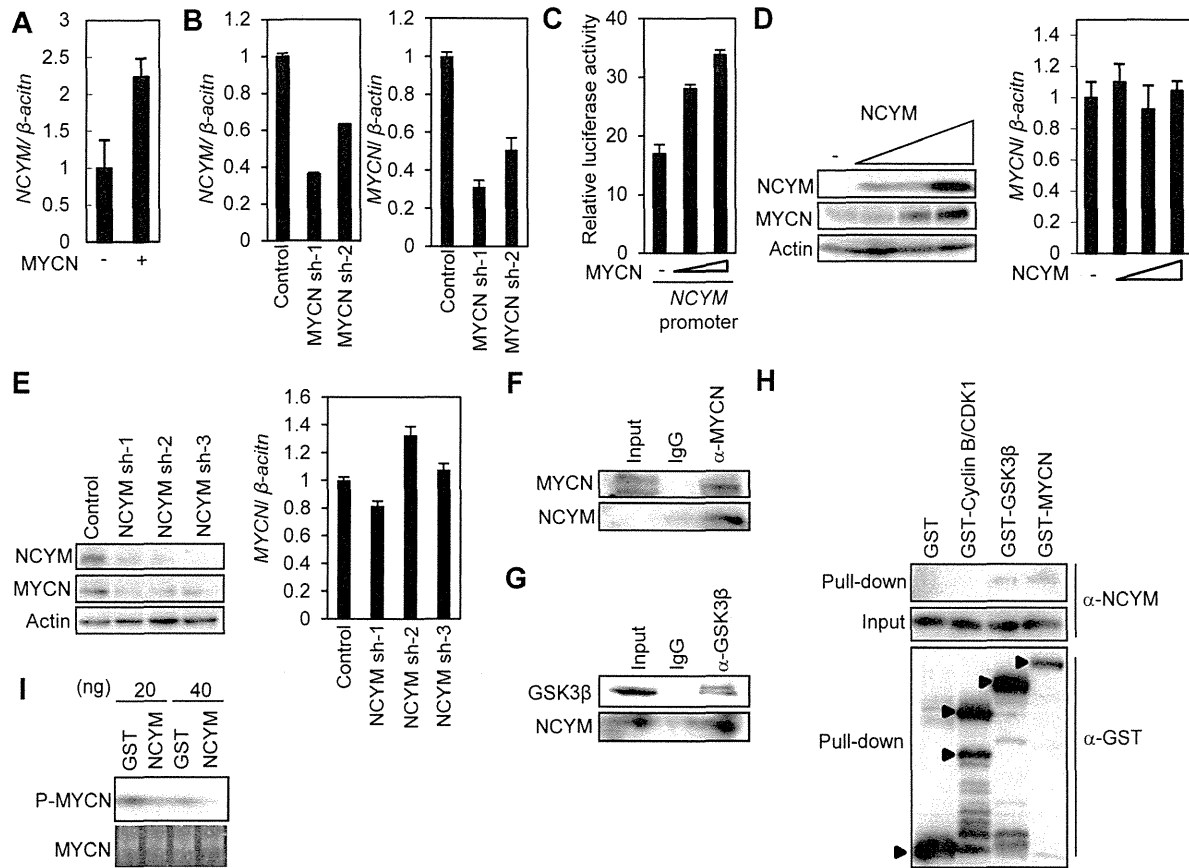


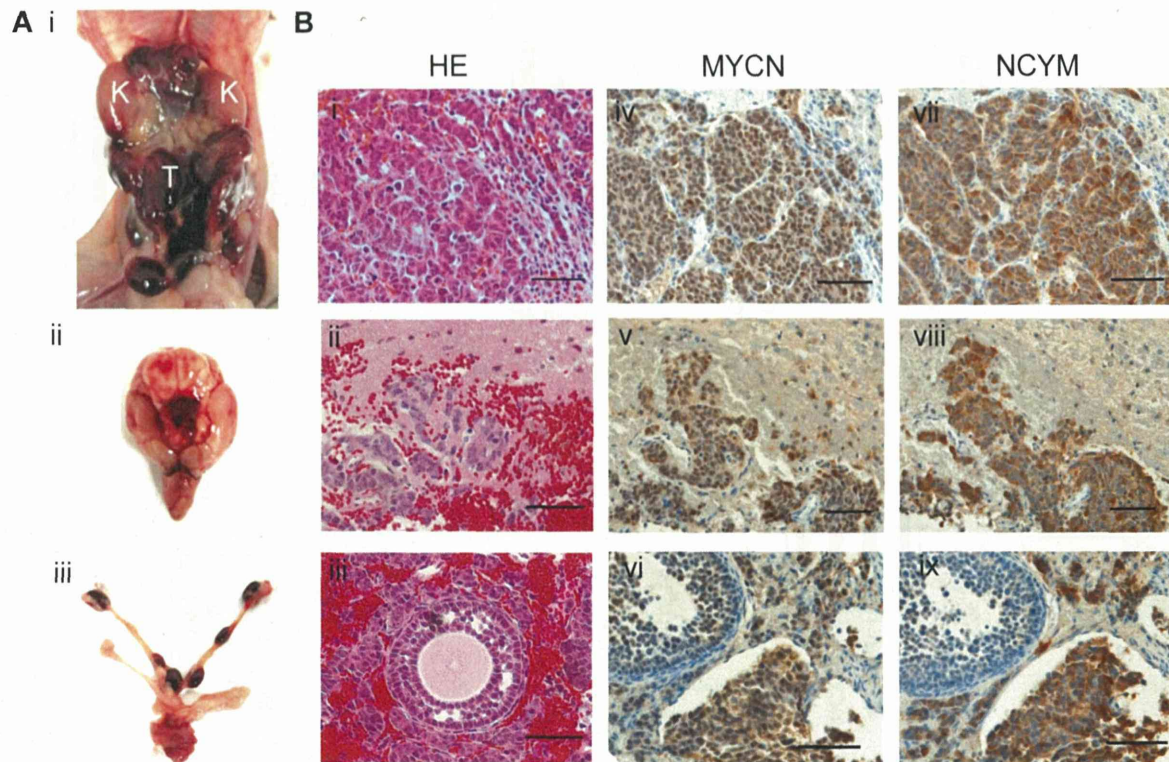
Figure 3. Functional interaction between NCYM and MYCN. (A) Relative mRNA levels of *NCYM* in SK-N-AS *MYCN* single copy human neuroblastoma cells transfected with *MYCN* expression vector. mRNA levels were measured by qRT-PCR with β -actin as an internal control. (B) Relative mRNA levels of *NCYM* (left panel) or *MYCN* (right panel) upon depletion of *MYCN* in CHP134 human *MYCN*-amplified neuroblastoma cells. (C) *MYCN* enhances *NCYM* promoter activity. Human neuroblastoma SK-N-AS cells were transfected with increasing amounts of *MYCN* expression plasmid (0, 200, 300 ng) and their luciferase activity was measured. (D) Western blots showing *NCYM* overexpression induces *MYCN* protein in Neuro 2a mouse neuroblastoma cells (left panel). *MYCN* mRNA expression in mouse neuroblastoma Neuro 2a cells transfected with increasing amounts of *NCYM* expression vector measured by qRT-PCR (right panel). (E) Western blots showing *NCYM* knockdown decreases *MYCN* protein in CHP134 cells (left panel). *MYCN* mRNA expression in *NCYM* knockdown CHP134 cells as measured by qRT-PCR (right panel). (F, G) Co-immunoprecipitation of endogenous *NCYM* with endogenous *MYCN* and GSK3 β . (H) GST-pulldown assay. Purified *NCYM* proteins were pulled down with GST-fused GSK3 β or GST. The amount of phosphorylated *MYCN* was quantified using standard autoradiography. The total amount of the *MYCN* was quantified by using an Oriole Fluorescent Gel stain. (I) *In vitro* kinase assay. Radiolabeled ATP was used for the second reaction with GSK3 β together with the indicated amount of *NCYM* or GST. The amount of phosphorylated *MYCN* was quantified using standard autoradiography. The total amount of the *MYCN* was quantified by using an Oriole Fluorescent Gel stain. doi:10.1371/journal.pgen.1003996.g003

NCYM double transgenic mice (Figure S15E), the incidence of neuroblastomas with distant metastases was significantly increased in the *MYCN/NCYM* double transgenic mice (Figure 4, Figure S16, Table S3). The overexpression of the *MYCN* and *NCYM* proteins in primary and metastatic tumor cells was confirmed by immunohistochemistry (Figure 4B). In the neuroblastoma tissue of the double transgenic mice, GSK3 β was significantly inactivated by phosphorylation at serine 9 (Figure 5A). To investigate the mechanism by which *NCYM* promotes the phosphorylation of GSK3 β , we analyzed the phosphorylation status of the known upstream kinases for GSK3 β , AKT [28] and S6K [31]. S6K was highly phosphorylated in the *MYCN/NCYM* double transgenic mice, whereas AKT was not noticeably activated. The phosphorylation levels of S6K in neuroblastomas from the *MYCN/NCYM* double transgenic mice were correlated with the expression levels of *MYCN* and *NCYM* (Figure 5A, M7-M11). These results suggest that *NCYM* promotes the phosphorylation of GSK3 β via

the activation of mTOR-S6K signaling. Furthermore, *NCYM* co-immunoprecipitated with GSK3 β (Figure 5B) and substrates of GSK3 β such as *MYCN* and β -catenin were stabilized in the neuroblastoma tissues induced in *MYCN/NCYM* transgenic mice (Figure 5A). We next examined the number of apoptotic cells in neuroblastomas from *MYCN* transgenic mice and *MYCN/NCYM* double transgenic mice by staining for cleaved caspase-3 (Figure S17). The number of apoptotic tumor cells was significantly decreased in the primary tumors of *MYCN/NCYM* double transgenic mice, suggesting that *NCYM* promotes the survival of neuroblastoma cells *in vivo*.

The tumors which develop in *MYCN/NCYM* transgenic mice are resistant to PI3K/mTOR inhibition

To examine whether the overexpression of *NCYM* contributes to the chemosensitivity of neuroblastomas via GSK3 β inhibition, we tested the effect of NVP-BEZ235 on the survival of the *MYCN/*



Metastatic tumor	MYCN Tg/+	MYCN Tg/+ NCYM Tg/+		MYCN Tg/+ NCYM Tg/Tg
		Line 4	Line 6	Line 6
No	21	2	12	7
Yes	1 (4.5%)	4 (67%)	5 (29%)	3 (30%)
Total	22	6	17	10

Figure 4. NCYM promotes metastasis in mouse transgenic models of neuroblastoma. (A) Neuroblastomas arise as multifocal primary lesions in a MYCN/NCYM double transgenic mouse (line 6). (i) Abdominal primary tumors and metastatic tumors in the intracranium (ii) and ovary (iii) occurred within the same mouse (M1). (B) H&E staining (i, ii, iii) and immunohistochemistry for MYCN (iv, v, vi) and NCYM (vii, viii, ix) expression in abdominal tumors (i, iv, vii) and metastatic tumors in the intracranium (ii, v, viii) and ovary (iii, vi, ix), in the MYCN/NCYM transgenic mouse (M1). Scale bars, 50 μ m. (C) The rates of metastatic tumor development in MYCN and MYCN/NCYM transgenic mice. Line 6; $P=0.036$, Mann-Whitney U test. Line 4; $P<0.01$, Fisher's exact probability test. doi:10.1371/journal.pgen.1003996.g004

NCYM double transgenic mice. NVP-BEZ235 is a dual inhibitor of both PI3K and mTOR and promotes the degradation of MYCN to effectively reduce tumor burden in the MYCN transgenic mouse via GSK3 β activation [32]. As reported, NVP-BEZ235 treatment significantly prolonged the survival duration of the MYCN transgenic mice ($P<0.01$; Figure 5C). In contrast NVP-BEZ235 did not prolong the survival of the MYCN/NCYM double transgenic mice ($P=0.648$; Figure 5D). Thus, the expression of NCYM reduced the efficiency of this drug *in vivo*.

Discussion

Our results reveal that NCYM, which was initially thought to be a large non-coding RNA transcribed from a *cis*-antisense gene of

human MYCN [26], is actually translated into a functional protein in humans. MYCN is a highly conserved, major oncogene in human cancer. The newly evolved *cis*-antisense NCYM gene product targets the sense MYCN gene product, influencing its stabilization, which in turn enhances transcription of the NCYM gene. This positive autoregulatory loop may function in primary human neuroblastomas to enhance metastasis as well as drug resistance through stabilization of MYCN and even β -catenin, which are mediated by inhibition of GSK3 β (Figure S18). Thus, NCYM is the first *de novo* evolved gene product shown to function in the development of human neuroblastoma.

NCYM promoted phosphorylation of GSK3 β at serine 9 possibly via the activation of mTOR-S6K signaling, that might have led to the constitutive inactivation of GSK3 β *in vivo*.