

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。肝芽腫においては、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、具体的なエビ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ことを検討した。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 1-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. 肝芽腫の網羅的遺伝子解析

肝芽腫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しうる遺伝子が 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/ -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

維持に参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が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 -catenin 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, 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: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, 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, Volchenbom S, Hero B, Cataldo AD, **Nakagawara A**, Shimada H, Ambros P, Matthey 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.

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, Kamiyo T. Receptor-type protein tyrosine phosphatase 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;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, Volchenbom 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, 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.

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.000000000000046.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）なし