

**厚生労働科学研究費委託費
革新的がん医療実用化研究事業**

“なぜ遺伝子変異なしでがんができるか”

その分子基盤解明と 標的探索

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上條 岳彦

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、埼玉県立がんセンターが実施した平成26年度「“なぜ遺伝子変異なしでがんができるか”：その分子基盤解明と標的探索」の成果をとりまとめたものです。

目 次

I . 総括研究報告	
“なぜ遺伝子変異なしでがんができるか”：その分子基盤解明と 標的探索に関する研究-----	1
上條岳彦	
II . 分担研究報告	
1 . 神経芽腫がん幹細胞のTranscriptome・エピゲノム解析に 関する研究-----	5
上條岳彦	
2 . INRGデータベースの追跡項目に合致した神経芽腫症例 データベースの整備-----	8
中川原 章、田尻達郎	
3 . 神経芽腫腫瘍検体のproteome解析-----	14
堺 隆一	
4 . ヒトおよびマウス神経芽腫がん幹細胞のエピゲノム解析-----	19
牛島俊和	
5 . マウス神経芽腫がん幹細胞の新規培養法開発とエピゲノム 解析に関する研究-----	24
門松健治	
6 . 神経芽腫におけるgenetic landscapeに関する研究-----	26
滝田順子	
7 . 候補標的分子の分子生物学的解析-----	31
江成政人	
8 . ヒトおよびマウス神経芽腫がん幹細胞のTranscriptome解析： 神経芽腫腫瘍検体のaCGHによるゲノム変異の網羅的解析-----	35
大平美紀	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表-----	39
IV . 研究成果の刊行物 -----	65

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
総括研究報告書

“なぜ遺伝子変異なしでがんができるか”：その分子基盤解明と標的探索
に関する研究

主任研究者 上條 岳彦 埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所長

研究要旨

遺伝子変異の無いがん”の一つと考えられる神経芽腫のエピゲノム・ゲノム解析によるがん幹細胞標的療法開発というきわめて独創性の高い研究であり、得られた成果は成人腫瘍においても重要なエピジェネティック異常経路を共有していることが推測され、がんの標的治療に新たなパラダイムを提供できる可能性があると考えられる。本年度の研究は、がん幹細胞性制御分子の網羅的解析によるスクリーニングを施行し、候補同定についての基盤となる結果が得られた。

研究分担者

上條 岳彦	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所 所長
中川原 章	佐賀県立医療センター 好生館 理事長
田尻 達郎	京都府立医科大学 外科学教室(小児外科学)教授
堺 隆一	国立がん研究センター研究所 転移浸潤シグナル研究分野 分野長
牛島 俊和	国立がん研究センター研究所 エピゲノム解析分野 分野長
門松 健治	名古屋大学大学院 医学系研究科生化学教室 教授
滝田 順子	東京大学医学系研究科・ 医学部小児科 准教授
江成 政人	国立がん研究センター研究所 難治がん研究分野ユニット長
大平 美紀	千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室 室長

A．研究目的

神経芽腫におけるエピゲノム・トランスクリプトーム解析を中心に施行し、これにゲノム解析、プロテオーム解析を加えたマルチオミックス解析を行い、“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構を解明することを目的とする。このマテリアルとして、特に難治化に関わるがん幹細胞検体（腫瘍スフェア細胞）を主に用いる。これによって、難治神経芽腫症例のバイオマーカーと分子標的の同定を目指すものである。

B．研究方法

（上條岳彦）既に同定した Tumor Sphere 形成因子については標的療法開発を行っていく（H26）。初代培養 Tumor Sphere において発現量の変化があり、神経芽腫患者の予後と相関する分子をさらに RNA sequencing 法で同定する（H26）。データ分取にはイルミナ Miseq

を用い、コード領域および non-coding の RNA における新規転写産物の検出を行う。データ解析は参照配列にマッピングされたリードを既存の遺伝子モデル毎に計量する。miRNA 解析はアジレント社の miRNA マイクロアレイ Human Rel.12.0 を用いて発現変化をスクリーニングする (H26)。

(中川原章、大平美紀) 神経芽腫におけるゲノム変化のパターンを、アレイ CGH を用いて網羅的に解析する。この際千葉県がんセンター研究所と協力して推進する。得られた候補分子の解析を分子生物学・遺伝学的手法で解析する (H26)。

(堺隆一) 複数の神経芽腫細胞・スフェアからカラムを用いた精製によりリン酸化 Tyr を含む蛋白質群を単離し、質量分析で新規 ALK 結合蛋白質を同定していく。公的データベースを用いて予後との相関を調べ、siRNA を用いて神経芽腫の増殖、運動能、浸潤能に対する影響を調べ、重要な分子を絞り込む (H26)。

(牛島俊和) 上條主任研究者及び門松分担者から供与される神経芽腫スフェア、神経芽腫細胞株、原発腫瘍等を用いる。DNA メチル化解析は、Infinium 450K beadarray を用いて行う。ヒストン修飾解析は、H3K27me3 修飾に対する ChIP-seq を行う。DNA メチル化及び H3K27me3 の両者について、転写開始点との位置関係、CpG アイランド構造の有無等を考慮しながら、スフェアに特徴的な変化を同定する。スフェアにおいて DNA メチル化や H3K27me3 により不活化される遺伝子の中から、幹細胞性に関与する可能性が高いものを抽出する

(H26)。

(滝田順子) 初発、転移、再発組織の凍結検体より切片を切り出し、レーザーマイクロディセクションにより単一細胞の抽出を行う。解析症例はそれぞれ 1、2 例とし、各腫瘍 20-50 個の単一腫瘍細胞を抽出する。単一細胞の全 DNA/RNA の増幅も行い、さらに単一細胞のエクソーム解析を行う (H26)。

(門松健治) 神経芽腫癌幹細胞の新規培養法ががん幹細胞の純化に適しているかを、分化能、自己増殖能、腫瘍形成能などを指標に判定し、最適化に務める。難治例・再発例のヒト腫瘍検体ならびにモデルマウスで得た癌および前癌組織を材料として用いる (H26)。

(江成政人) ALK 陽性神経芽腫で腫瘍スフェアを形成する(上條と協力)。ALK 阻害剤の感受性について検討し、阻害剤投与後に耐性となった検体を得る。この ALK 阻害剤で抵抗性となったスフェアと薬剤添加前のスフェアとの比較解析(マイクロアレイ等)を行い、抵抗性に関わる遺伝子を探索する(6-28)。

(田尻達郎) JNBSG の神経芽腫臨床データの解析と基礎研究者への提供を行う(中川原と協力)。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針(厚生労働省告示)」に従って実施する。

本研究計画遂行に当たっては「ヒトゲノム研究に関する基本原則(科学技術会議生命倫理委員会)」を十分に理解し、「ヒトゲノム・遺伝子 解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文部科学

省・厚生労働省・経済産業省共同告示第1号(平成16年12月28日全部改正)(平成17年6月29日一部改正)(平成20年12月1日一部改正)を遵守して実施する。また、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に該当する研究を包含する研究申請を行い、承認済みである。

C. 研究結果

・ヒト神経芽腫がん幹細胞(スフェア細胞)におけるスクリーニングでは、細胞株での解析と初代細胞での解析において共通する分子としてWNTシグナル系分子の上昇がみられ、この高発現は不良な予後と一致していた。このノックダウンはスフェア形成の阻害をもたらすので、さらに解析を続けていく(上條、大平)。今後、コントロール細胞としてiPSまたはES由来神経堤細胞を用いてトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析によるスクリーニングを行い、更に標的を絞り込んでいく(上條、牛島、大平)。これまで神経芽腫がん幹細胞性制御分子として同定されたCDX1については、in vitro解析がほぼ終了し、in vivo解析をKnockinマウスで施行する(上條)。

・マウス神経芽腫がん幹細胞(スフェア細胞)におけるスクリーニングでは、野生型とNBモデルMYCNTGマウスのスフェア形成細胞を用いてトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析が行われた。ゲノムコピー数の異常は見当たらず、MYCNTGでMYC-MAXのターゲット遺伝子群の増加、およびPRC2ターゲット遺伝子群の低下が見られた。さらに転れぞれ臨床因子と関連することが確認された(滝田)。

写開始地点から2kb以内のDNAメチル化を見るとTH-MYCNでメチル化の多いことが分かった(門松、牛島、大平)。

・神経芽腫症例フォローアップ研究：調査施設数内訳は、調査ファイル回収済み施設：88施設中81施設、調査ファイル回収済み症例数：2104例中1830例である。現在、転帰(イベント・生死の両方)が判明している1146例についてデータ解析を行っている(中川原、田尻、上條)。

・ALK結合タンパク質の解析をマスマスプロトメトリーで網羅的に解析した。結合分子としてFLOT1を同定し、FLOT1はALKのエンドソーム局在を阻害し、ALK分解を促進することを明らかにした(堺)。SHP2を新たなALK結合分子として見出し、解析を行っている(堺)。ALK阻害剤とp53活性化剤の併用が、神経芽腫においても有効であることが示唆された。更に、がん幹細胞様形質を持つ神経芽腫のスフェアアクセシ系を樹立し、その際のALK阻害剤耐性についても、ALK阻害剤とp53活性化剤との併用が有効であることもわかった(江成)。

・神経芽腫の分子病態の全貌を把握するために、442例の大規模検体において、既知の神経芽腫関連遺伝子に関するtarget sequencingおよびゲノムコピー数の網羅的解析を行いgenetic landscapeの作成を試みた。ゲノム異常により6つのサブグループ(A:ALK+MYCN、B:Other mutation、C:MYCN+1p LOH、D:11q LOH、E:Hyperploid、F:silent)が検出され、そ

D. 考察

本年度の研究を受けて、次年度にはヒト神経芽腫がん幹細胞モデルとしての Sphere 形成神経芽腫細胞のエピゲノム・トランスクリプトーム解析を進めるために、コントロールとしてヒト iPS から樹立した神経堤細胞を用いて網羅的解析を行う必要がある。この結果を考慮して、神経芽腫がん幹細胞性制御因子のスクリーニングを継続する。現在マウスの神経芽腫がん幹細胞モデルとして、MYCNトランスジェニックマウス神経芽腫細胞でのエピゲノム・トランスクリプトーム解析を進めているが、この結果と比較してのターゲット絞り込みも検討していく。

また、1細胞ゲノムシーケンス、1細胞トランスクリプトーム解析技術も班内で開発中であり、神経芽腫検体でのソーティング・1細胞マルチオミックス解析への応用を図り、上述のターゲット分子での解析を今後検討したい。

E．結論

本研究は“ 遺伝子変異の無いがん ” の一つと考えられる神経芽腫のエピゲノム・ゲノム解析によるがん幹細胞標的療法開発というきわめて独創性の高い研究であり、得られた成果は成人腫瘍においても重要なエピジェネティック異常経路を共有していることが推測され、がんの標的治療に新たなパラダイムを提供できる可能性があると考えられる。本研究においては、期間内に難治神経芽腫症例のバイオマーカーと分子標的の同定を行い、同定したバイオマーカーは臨床研究グループの治療プロトコール作成のリスク分類に反映させていく。また、標的分子のうち創薬シーズとなり得る分子

については知的財産権確立・新薬開発へと発展させていきたい。

F．健康危険情報

特記なし。

G．研究発表

1. 論文発表：各自の分担研究に記載
2. 学会発表：各自の分担研究に記載

H．知的財産権の出願・登録状況

各自の分担研究に記載

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

神経芽腫がん幹細胞の Transcriptome・エピゲノム解析に関する研究

研究分担者 上條 岳彦 埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所長

研究要旨

神経芽腫におけるエピゲノム・トランスクリプトーム解析を中心に施行し、これにゲノム解析、プロテオーム解析を加えたマルチオミックス解析を行い、“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構を解明することを目的として研究を進めた。現時点では神経芽腫がん幹細胞のがん幹細胞性の制御に WNT シグナルが重要な役割を果たしていることが推測された。

A．研究目的

神経芽腫におけるエピゲノム・トランスクリプトーム解析を中心に施行し、これにゲノム解析、プロテオーム解析を加えたマルチオミックス解析を行い、“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構を解明することを目的とする。このマテリアルとして、特に難治化に関わるがん幹細胞検体（腫瘍スフェア細胞）を主に用いる。これによって、難治神経芽腫症例のバイオマーカーと分子標的の同定を目指すものである。

B．研究方法

1. 既に同定した Tumor Sphere 形成因子については標的療法開発を行っていく。
2. これまで神経芽腫がん幹細胞性制御分子として同定された CDX1 については、in vitro 解析がほぼ終了し、in vivo 解析を Knockin マウスで施行する。
3. 初代培養 Tumor Sphere において発現量の変化があり、神経芽腫患者の予後

と相関する分子をさらに RNA sequencing 法で同定する。データ分取にはイルミナ Miseq を用い、コード領域および non-coding の RNA における新規転写産物の検出を行う。データ解析は参照配列にマッピングされたリードを既存の遺伝子モデル毎に計量する。分担研究者 門松・牛島らのエピゲノムデータ、中川原・滝田らのゲノムデータを統合して今後解析する。

（倫理面への配慮）

本研究はヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省告示）」に従って実施する。本研究計画遂行に当たっては「ヒトゲノム研究に関する基本原則（科学技術会議生命倫理委員会）」を十分に理解し、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省共同告示第1号）（平成16年12月28日全部改正）（平成17年6月29日一部改正）（平成20

年12月1日一部改正)」を遵守して実施する。また、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に該当する研究を包含する研究申請を行い、承認済みである。

C . 研究結果

1. ヒト神経芽腫がん幹細胞 (スフェア細胞) におけるスクリーニングでは、細胞株での解析と初代細胞での解析において共通する分子として WNT シグナル系分子の上昇がみられ、この高発現は不良な予後と一致していた。このノックダウンはスフェア形成の阻害をもたらすので、さらに解析を続けていく。
2. CDX1 および CD133 の Knockin マウスについてはヘテロマウスを作出した。今後神経堤細胞リネージでの発現が可能な Cre マウスとの交配によって組織特異的 CDX1 または CD133 過剰発現マウスが作成できる基盤が構築された。
3. コントロール細胞として iPS または ES 由来神経堤細胞を用いてトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析によるスクリーニングを行い、更に標的を絞り込んでいく。

D . 考察

WNT シグナル経路は正常幹細胞の幹細胞性維持に重要な経路であり、今回の解析でもスフェア形成での上昇と、神経芽腫がん幹細胞に重要な転写因子による誘導が見られたことから注目されると考えられる。

E . 結論

ヒト神経芽腫がん幹細胞における高発

現遺伝子スクリーニングでは、細胞株での解析と初代細胞での解析において共通する分子として WNT シグナル系分子の上昇がみられた。この WNT シグナル系分子高発現は不良な予後と一致し、さらにこの分子のノックダウンはスフェア形成の阻害をもたらした。以上から神経芽腫がん幹細胞のがん幹細胞性の制御に WNT シグナルが重要な役割を果たしていることが推測された。

F . 健康危険情報

特記なし。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1-1. Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T(corresponding author). Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway.

Eur J Cancer. 2014、50:1555-65.

- 1-2. 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 Lett. 2014

- 1-3. Shimozato O, Waraya M,

Nakashima K, Souda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, Nakagawara A, Ozaki T, Kamijo T (corresponding author). Receptor-type protein tyrosine phosphatase κ (PTPRK) directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation.

Oncogene. 2014 Jun 2. doi: 10.1038/onc.2014.141. [Epub ahead of print].

1-4. Sun Y, Furihata T, Ishii S, Nagai M, Harada M, Shimozato O, Kamijo T, Motohashi S, Yoshino I, Kamiichi A, Kobayashi K, Chiba K.

Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers.

Clin Transl Med. 2014 Nov 18;3:37. doi: 10.1186/s40169-014-0037-y. eCollection 2014.

1-5. 上條岳彦、檜山英三、肝芽腫の診断と治療、「最新肝臓学」、日本臨牀社、2014

1-6. 上條岳彦、小児固形腫瘍のがん幹細胞 小児外科、47 巻第 2 号 123-128、2015

2. 学会発表

2-1. 「多診療科医師合同シンポジウム 難治性固形腫瘍を考える - 基礎から臨床まで：神経芽腫」

神経芽腫の基礎生物学 Basic Biology

of Neuroblastoma. 第 56 回小児血液・がん学会 上條岳彦

2-2. Tumor sphere specific transcription factor CDX1 regulates stem cell-related gene expression and aggressiveness in neuroblastoma. Advances of Neuroblastoma 2014. Hisanori Takenobu, Takehiko Kamijo 他
2-3. Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulates MYCN/ATM/p53 pathway. Advances of Neuroblastoma 2014. Yohko Yamaguchi, Takehiko Kamijo 他

H . 知的財産権の出願・登録状況

CDX1 測定による神経芽腫の悪性度の決定と予後判定。特願 2013-002842

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）
分担研究報告書

INRGデータベースの追跡項目に合致した神経芽腫症例データベースの整備

担当責任者 田尻 達郎 京都府立医科大学大学院医学研究科 小児外科学 教授
担当分担者 中川原 章 佐賀県医療センター 好生館 理事長

研究要旨

神経芽腫は、小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度が高く、年間150～200例が発生する。しかし、半数以上を占める高リスク群の治療率は未だ生存率20～40%であり、その新規治療法開発が国際的にも喫緊の重要課題となっている。一方、低・中間リスク群では、治療の軽減、合併症回避を行いながら治療成績の向上を図ることが求められ、新規リスク因子や個別化治療法の開発が必要である。

JNBSG（日本神経芽腫スタディグループ）は、2006年に日本全体の神経芽腫を包括してその臨床情報の把握、及び、国際的に発信できる臨床試験の遂行を目的に設立された。また本邦の多くの神経芽腫検体の分子遺伝情報についてはJNBSG設立以前より千葉県がんセンターが中心となり解析を行いデータ管理を行ってきた。JNBSG設立以降のJNBSG施設の症例のデータについては管理の主体をJNBSGデータセンターへ移管しており、非JNBSG施設のデータは千葉県がんセンターで継続的にデータ管理がされている。この両者のデータを統合することが現時点では本邦の神経芽腫のほぼ全症例を網羅したデータベースとなることと考えられるため、2013年11月から、JNBSGデータセンターと千葉県がんセンターより各施設に詳細な臨床情報の再検索依頼を行い、2014年11月末まで各施設から回収を終了した。現在、データをクリーンアップ中であり、2014年度末から分子遺伝情報を併合したデータベースに対して解析を開始し、2015年度中の解析終了を目指している。

A．研究目的

2006年に日本神経芽腫研究グループ（JNBSG）を設立し、データセンター、中央病理・分子診断、検体センター等の基盤整備を行い、わが国の全神経芽腫を対象に多施設臨床試験を行ってきた。神経芽腫の特徴はその生物学的多様性にある。高リスク群では予後改善のための新規治療戦略が求められ、低・中間リスク群ではリスク因子にもとづく治療軽減、合併症回避、そして治療成績の向上を図る必要がある。また、臨床試験（研究）に付随した腫瘍検体を用いて、わが国独自に開発した神経芽腫ゲノム・病理リスク分

類（INPC分類）による評価系の確立と次世代シーケンシングによる治療の有効性と抵抗性に関わる遺伝子の同定と分子標的治療薬の開発と臨床導入が必要である。

本邦の多くの神経芽腫検体の分子遺伝情報についてはJNBSG設立以前より千葉県がんセンターが中心となり解析を行い、データ管理を行ってきた。JNBSG設立以降のJNBSG施設の症例のデータについては管理の主体をJNBSGデータセンターへ移管しており、非JNBSG施設のデータは千葉県がんセンターで継続的にデータ管理がされている。この両者のデータを統合し、本邦全体の神経芽腫の臨床情報と分子遺

伝情報を併合したデータベースを作成し、解析することを目的とする。

B．研究方法

2013年度から、臨床情報検索項目フォームを作成し、11月から、順次、データセンターからJBBSG登録施設に再検索依頼を開始し、2014年11月末までに各施設から回収予定である。その後、データクレンジングを行い、分子遺伝情報を併合したデータベースを作成して解析を行う。

(倫理面への配慮)

JNBSGにおける登録や臨床試験の実施、またこれに付随するすべての研究に関しJNBSG内部における倫理審査を実施し、また各参加施設においては倫理委員会または治験審査委員会の承認を必須条件とする。さらに必要な際には第三者機関による倫理審査を実施する。すなわちヘルシンキ宣言やわが国における各種倫理指針を遵守する。すべての患者において登録前に十分な説明を行い、理解に基づく自発的同意を本人または代諾者より文書で得る。

個々の臨床試験(研究)においては、JNBSGの各療法委員会により治療の質を管理し、効果・安全性評価委員会、研究審査委員会により安全性および倫理性を保証する。すなわち第三者機関による監視システム等により許容し得ない患者不利益や危険性を排除し、患者の人権擁護、個人情報の保護、データベースの機密性等を保証する。またすべての患者由来の検体は、同意のもとに検体センターに保存し、二次利用のための管理を行う。

C．研究結果

2013年度から、臨床情報検索項目フォームを作成し、11月から、順次、JNBSGデータセンターからJBBSG登録施設に再検索依頼を開始し、2014年11月末までに

各施設から回収を終了した。88施設に調査ファイルを送付し、81施設から回収、対象症例2104例中、1830例が回収可能であった。平成27年2月現在、データクレンジング中である。平成26年度末までに千葉県がんセンターからJNBSG施設以外の施設に依頼し、回収した臨床情報とデータの統合を行い、解析を開始する予定である。

D．考察 E．結論

JNBSGデータセンターから、JNBSG施設に調査を依頼し、回収した1830例のデータのデータクレンジングにおいては、入力不備の部分もあり、一部のデータについては、再度の施設への調査も検討中である。千葉県がんセンターからJNBSG施設以外の施設に依頼し、回収した臨床情報検索項目フォームと早期の統合と、質の高いデータにするためのデータクレンジングが急務である。JNBSGでは、INRGフォローアップ解析WGを平成27年1月に立ち上げ、具体的な解析手法について検討を開始した。平成27年度中の解析終了を目指している。

F．健康危険情報 該当事項なし

G．研究発表

1. 論文発表

- 1) Janette M, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K: Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma :BioMed Cancer

- 2014
- 2) 米倉竹夫、田尻達郎、伊勢一哉、小野 滋、大植孝治、佐藤智行、杉藤公信、菱木知郎、平井みさ子、文野誠久、本多昌平、風間理郎、杉山正彦、中田光政、仲谷健吾、脇坂宗親、近藤知史、上原秀一郎、鬼武美幸、木下義晶、日本小児外科学会悪性腫瘍委員会:小児の外科的悪性腫瘍, 2012 年登録症例の全国集計結果の報告 日小外会誌 50;114-150, 2014
 - 3) Hirakawa M, Nishie A, Asayama Y, Fujita N, Ishigami K, Tajiri T, Taguchi T, Honda H: Efficacy of preoperative transcatheter arterial chemoembolization combined with systemic chemotherapy for treatment of unresectable hepatoblastoma in children: Jpn J Radiol 32:529-536, 2014.
 - 4) Sakai K, Kimura O, Furukawa T, Fumino S, Higuchi K, Wakao J, Kimura K, Aoi S, Masumoto K, Tajiri T: Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in a rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. : J Pediatr Surg 49:1749-1752, 2014.
 - 5) 竹内雄毅、樋口恒司、坂井宏平、文野誠久、青井重善、古川泰三、木村修、田尻達郎: 腹部腫瘍により発見された Herlyn-Werner-Wunderlich 症候群の 1 例 日本小児外科学雑誌 第 50 巻 第 1 号 76-80, 2014
 - 6) 樋口恒司、木村修、古川泰三、文野誠久、青井重善、坂井宏平、土屋邦彦、家原知子、細井創、田尻達郎: 胸壁悪性軟部肉腫に対する肋骨合併切除・胸郭再建術 小児外科 46 : 120-124 , 2014
 - 7) 文野誠久、金聖和、坂井宏平、樋口恒司、青井重善、古川泰三、木村修、田尻達郎: 腸間膜リンパ管腫切除術 小児外科 46 : 143-147 , 2014
 - 8) 文野誠久、加藤久尚、樋口恒司、出口英一、田尻達郎: 胆汁うっ滞 先天性胆道拡張症 周産期医学 44 : 1343-1346, 2014
 - 9) 文野誠久、坂井宏平、東真弓、青井重善、古川泰三、田尻達郎: 膵・胆管合流異常の診断の最前線: 膵・胆管合流異常における DIC-CT の診断意義 胆と膵 35 : 897-900, 2014
 - 10) 田尻達郎: 第 11 節 小児固形悪性腫瘍における遺伝子解析による悪性度 診断と遺伝子治療 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発 348-353, 2014
 - 11) 田尻達郎: QOL を重視した小児外科医療の進歩 相楽医報 第 151 号 : 18, 2014
 - 12) 田尻達郎: 小児外科医療の進歩～QOL 向上を目指して～ 京都小児科医学会報 No.58 19-23, 2014
 - 13) F, Nakazawa A, Osumi T, Shimojima N, Tanaka T, Nakagawara A, Shimada H. Two Cases of Neuroblastoma Comprising Two Distinct Clones. Pediatric Blood Cancer.;61(4):760-762 2014
 - 14) 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.
 - 15) Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, **Takita J**, Ohira M,

- Nakagawara A et al. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res.* *Cancer Res.* 15;74:3790-801, 2014
- 16) Suenaga Y, Islam SMR, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shibta 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.*10(1) , 2014
- 17) 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
- 18) 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.*3(1):25-35, 2014
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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 directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene*, 2014[Epub ahead of print]
- 25) Meany HJ, London WB, Ambros PF, Matthay KK, Monclair T, Simon T, Garaventa A, Berthold F, Nakagawara

- A, Cohn SL, Peason 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
- 26) 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
- 27) 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 [Epub ahead of print]
- 28) 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(1):86-93, 2014
- 29) 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* 22:1607,2015.
- 30) Mosse YP, Deyell RJ, Berthold F, Nakagawara A, Ambros PF, Monclair T, Cohn SL, Pearson AD, London WB, Matthay KK. Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults. A report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Pediatr. Blood Cancer*. 61(4):627-35, 2014
2. 学会発表
- 1) S Fumino, T Furukawa, S Aoi, K Higuchi, K Sakai, T Iehara, H Hosoi, T Tajiri. Surgical Strategy for Mediastinal Neuroblastic Tumors in Children: a Single Institution Experience. *Advances in Neuroblastoma Research*. 2014 May 13-16 Koln, Germany.
- 2) K Sakai, O Kimura, T Furukawa, K Higuchi, J Wakao, K Kimura, S Fumino, S Aoi, K Masumoto, T Tajiri. Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in rat models of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *The 47th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons*. 2014 May 24-29, Canada.

- 3) S Fumino, K Kimura, T Iehara, M Nishimura S Nakamura R Souzaiki, A Nishie, T Taguchi, H Hosoi, Tatsuro Tajiri. Validity and reliability of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from 2 territorial centers in Japan 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology. 2014 Oct 21-26, Tront, Canada.
- 4) A Yoneda, M Nishikawa, M Inoue, H Soh, Y Tazuke, H Yamanaka, M Nomura, K Deguchi, R Matsuura, M Fukuzawa. T Tajiri, T Iehara, A Nakagawara. THE NEW GUIDELINE FROM THE INTERNATIONAL NEUROBLASTOMA RISK GROUP (INRG) PROJECT HAS PROFOUND EFFECTS ON CLINICAL TRIALS WHICH EMPLOYED IMAGE DEFINED RISK FACTORS. Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research 2014) May.13-16
- 5) A Yoneda, T Tajiri, T Iehara, M Kitamura, A Nakazawa, H Takahashi, T Takimoto, A Nakagawara. CHARACTERISTICS OF IMAGE DEFINED RISK FACTORS (IDRFS) IN PATIENTS ENROLLED THE LOW RISK PROTOCOL (JNB-L-10) FROM THE JAPAN NEUROBLASTOMA STUDY GROUP (JNBSG) Toronto, Canada (SIOP (46th)) Oct/22-25.2014

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当事項なし。
2. 実用新案登録
該当事項なし。
3. その他
該当事項なし。

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

神経芽腫腫瘍検体の proteome 解析

研究分担者 堺 隆一 国立がん研究センター研究所 難治進行がん研究分野 分野長

研究要旨

神経芽腫において野生型 ALK と結合する蛋白質と質量分析にて半網羅的に同定し、ALK シグナルの調節と神経芽腫の幹細胞特性や治療抵抗性との関わりを解析を行った。エンドサイトーシスに関わるラフト局在蛋白質 Flottillin-1 (FLOT1) は、ALK と結合しその細胞内への取り込みや分解に関わり、ヒト神経芽腫組織の解析においても FLOT1 の発現が低い群で有意に予後不良群であることが分かった。FLOT1 低下による受容体型チロシンキナーゼの活性化は ALK に選択的に認められ、この分子が特に ALK 阻害剤に対する腫瘍の感受性に関わることを明らかにした。また同じく ALK と結合することが明らかになった蛋白質チロシンホスファターゼの SHP2 の発現が ALK に依存した神経芽腫の悪性形質に関わることを示され、その作用機序について解析を進めている。

A．研究目的

神経芽腫における ALK の活性化変異は全体の 7 ~ 8 % 程度であるとみられ、遺伝子増幅と合わせても 10 % 程度である。ALK が活性化した悪性リンパ腫や肺癌においては、ALK 阻害剤が臨床試験にまで進められていて著効を示す例があり、神経芽腫においても遺伝子増幅例では効果があるものの、頻度の高い F1174L など幾つかの変異については ALK 阻害剤の効果を示しにくいとの報告がある。一方これまでの解析で、ALK に遺伝子変異がなくても ALK の蛋白質量が増加している神経芽腫症例は予後が悪いというデータも得ており (Tomiya A et al, Cancer Res 2014)、このようなケースで

は、ALK 阻害剤が効果を示す可能性がある。今後問題になると危惧される薬剤抵抗性などの問題を回避するためにも、神経芽腫で活性化した ALK がもたらすがん化シグナルの正確な理解は極めて重要な課題であると考えられる。複数の神経芽腫細胞・スフェアからリン酸化チロシンを含む蛋白質群をカラム精製し、新規 ALK 結合蛋白質などを中心に質量分析で同定して機能解析を行い ALK 結合分子群の腫瘍特性や治療抵抗性との関わりを包括的に理解することにより、ALK チロシンキナーゼが伝える特別ながん化シグナルの本態を解明し、治療抵抗性を克服する道筋を見出すことを目的とする。

B . 研究方法

ALK 結合蛋白質を同定する最初の試みとして FLAG タグを付加した野生型 ALK を恒常的に発現する神経芽腫細胞株から M2-アガロースによって FLAG タグの着いた蛋白質をプルダウンして、コントロール親株 (TNB-1 細胞) と比較して導入した ALK に特異的に結合する蛋白質を質量分析にて半網羅的に解析してきた。その結果、約 30 の蛋白質が再現性よく同定された。このうち IRS1、SOS1、Grb2、ZO-1 など幾つかについては、ALK との結合がリンパ腫など他の系でも報告されており、この手法で ALK 結合蛋白質が確かに同定されていることが示唆された。Flotillin1 (FLOT1)、PTPN11 (SHP2)、SH2B1 など特異的抗体を入手でき、ALK との結合やリン酸化が確認できたものについて先行して抗体や siRNA を用いた機能解析を進めた。今回新規に見つかった他の分子についても特異的抗体を作成して同様な機能解析に進めつつある。具体的には以下のような解析を中心に、推定される分子特有の機能に対する解析も加える。

・神経芽腫の生物学的特性への影響

siRNAによる発現抑制で、増殖能、運動性、細胞増殖能、運動能、スフェア形成能、ソフトアガーコロニー形成能、ヌードマウスでの造腫瘍能などに与える影響を検討する。また、ALKの発現やリン酸化の程度、既知のAkt、Erk1/2などの下流分子の活性化などに与える影響について、それぞれリン酸化特異的抗体を用いて検

討する。

・阻害剤感受性への影響

ALK阻害剤TAE684の増殖抑制効果を濃度をふって検討し、各々のALK結合蛋白質の発現抑制がALK阻害剤に対する感受性に与える影響を検討する。

C . 研究結果

神経芽腫でALKに結合するリン酸化蛋白質として同定したFlotillin1 (FLOT1) はその発現量の低いことが神経芽腫の予後不良と関わることから、ALK蛋白質の安定性などとの関わりで機能解析を進めた。その結果、ラフトに局在するFLOT1はALKと選択的に結合しエンドサイトーシスを介してALK蛋白質の分解に関わることが示された。また、神経芽腫で見られるF1174Lなど幾つかの変異に関して、変異型ALKとFLOT1との結合能が野生型に比べ著明に減少しているのが確認された。一方で神経芽腫でFLOT1の発現をノックダウンにより抑制すると、細胞運動能、足場非依存性増殖、ヌードマウスにおける造腫瘍能などが増加するという結果も得られた。以上のことからFLOT1の発現低下やFLOT1との結合能が低いALK変異によりALK蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強に関わる可能性が示唆された。この結果は、ALK蛋白質の発現量が遺伝子変異の有無にかかわらず神経芽腫の予後不良に関わるという解析結果とも整合性が有り、今後FLOT1低値の神経芽腫においてALK阻害剤が治療に

有効である可能性について動物モデルなどを用いて検証していく必要がある。

SHP2 (PTPN11) については、ALK自体またはSrcによりチロシンリン酸化を受け、神経芽腫細胞のアポトーシス抑制に関わることが示された。SH2B1については、ALKと結合すること、ALK阻害剤でチロシンリン酸化が落ちること、siRNAによるノックダウンで神経芽腫の運動能などの悪性形質が抑制されることは確認できている。SHP2とSH2B1がそれぞれ蛋白質ホスファターゼとシグナルアダプター分子として、どのようにALKシグナルの調整に関わっているのか現在詳細について解析を進めている。

D . 考察

今回、初めてALKに結合するリン酸化蛋白質として同定したFlotillin1 (FLOT1) は、ヒト神経芽腫組織の解析においても予後不良群の組織で発現は低下しており、FLOT1の発現低下やFLOT1との結合能が低いALK変異によりALK蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強と悪性化に関わり、このような細胞はcrizotinibなどALK阻害剤に感受性が高い可能性が示唆された。また同じくALKに結合する分子として新たに同定したチロシンホスファターゼSHP2 (PTPN11) は、ドッキング分子ShcCとともにALKと複合体を作り、ALKの活性化シグナルを下流のErkやAktに媒介して神経芽腫の進展を制御していると考えている。ALKのシグナル

を負と正に制御するこの2つのシステムのバランスが、神経芽腫の薬剤感受性、幹細胞性、転移能などの性質にどのように関わるかを、今後他の神経芽腫細胞や幹細胞スフェアなども用いて調べる必要がある。

E . 結論

ALKシグナルの活性化が神経芽腫の進行過程で重要な役割を果たすと考えているが、ALK結合蛋白質の解析で、以前から研究しているShcCや今回新たに見つかったSHP2のようにALKシグナルを正に制御する分子と、FLOT1のようにALKシグナルを負に制御する分子群があることが分かった。生理的にはALK活性がこれらの分子群の巧妙な調節によって制御されていると考えられるが、神経芽腫はそのバランスの破綻した状態と捉えることもできる。今後、神経芽腫の幹細胞性や自然消退において、既に解析した分子を含むALK結合分子群がどのように関与しているのかを明らかにすることによって、阻害剤抵抗性などの壁を乗り越えた新規治療法の開発につながると考える。

G . 研究発表

1. 論文発表

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

Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito
Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K,
Sakai R. Saracatinib impairs the peritoneal
dissemination of diffuse-type gastric
carcinoma cells resistant to Met and FGFR
inhibitors. Cancer Sci.105:528-536,2014

Yamaguchi H, Yoshida H, Takanashi M, Ito
Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M,
Sakai R. Stromal fibroblasts mediate
extracellular matrix remodeling and invasion
of scirrhous gastric carcinoma cells.
PlosOne 9(1):e85485,2014

Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Iwakawa R,
Narisawa-Saito M, Nakashima K, Tsuta K,
Tsuda H, Kiyono T, Yokota J, Sakai R.
Oncogenic Ras/ERK signaling activates
CDCP1 to promote tumor invasion and
metastasis. Mol Cancer
Res.12:1449-1459,2014

2. 学会発表

Tomiyama A, Uekita T, Sakai R: Flotillin1
regulates oncogenic signaling in
neuroblastoma cells through receptor
endocytosis of anaplastic lymphoma kinase.
Advances in Neuroblastoma Research 2014,
2014, Toronto Canada.

山口英樹, 堺隆一: 間質線維芽細胞との
相互作用を標的としたスキルス胃癌治
療薬の探索. 第23回日本がん転移学会
学術集会・総会, 2014, 金沢

白木原琢哉, 堺隆一: スキルス胃癌の
浸潤・腹膜播種へのFGFシグナルの関与.
第23回日本がん転移学会学術集会・総
会, 2014, 金沢

上北尚正, 堺隆一: 小細胞がんにおける
足場非依存性増殖シグナルの解析. 第2
3回日本がん転移学会学術集会・総会,
2014, 金沢

上北尚正, 堺隆一: Ras-ERKシグナルに
よるCDDP1発現誘導を介した癌の浸
潤・転移機構. 第73回日本癌学会学術
総会, 2014, 横浜

中島克彦, 上北尚正, 黒澤仁, 堺隆一:
転移関連タンパク質CDCP1の切断によ
る分泌とその機能. 第73回日本癌学会
学術総会, 2014, 横浜

富山新太, 上北尚正, 山口英樹, 上野英
明, 滝田順子, 佐々木一樹, 中川原章,
森健太郎, 堺隆一: 新規ALK結合蛋白質
であるFlotillin1は、ALKの細胞膜結合の
調節を介してALKシグナルを制御する.
第73回日本癌学会学術総会, 2014, 横
浜

白木原卓哉, 堺隆一: スキルス胃癌の

浸潤・腹膜播種へのFGFシグナルの関与 .
第73回日本癌学会学術総会，2014，横
浜

Sakai R:Regulation of oncogenic signaling
in neuroblastoma through binding partners
of anaplastic lymphoma kinase. 第11回
プロテインホスファターゼ国際カンファ
レンス，2014，仙台

H . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

分担研究報告書

ヒトおよびマウス神経芽腫がん幹細胞のエピゲノム解析

研究分担者 牛島 俊和 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野 分野長

研究要旨

神経芽細胞腫において、エピゲノム異常が特に重要であることが近年の研究で示されている。神経芽細胞腫の発がん分子基盤解明には、神経芽細胞腫におけるエピゲノム異常の全体像を把握する必要がある。本研究では、神経芽細胞腫とその発生母地の DNA メチル化異常のプロファイリングを行うことを目的とした。本年度は、ヒト神経芽細胞腫の細胞株、および、マウス神経堤細胞由来 sphere のゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った。その結果、ヒト神経芽細胞腫細胞株は、他のがん種の細胞株とは異なる CpG メチル化プロファイルを示すこと、*MYCN* を導入した胎児期のマウス神経堤細胞では、分化に関連する遺伝子が特異的に高メチル化を示すことが明らかとなった。今後は、ヒト iPS 細胞由来の神経堤細胞やマウス神経芽細胞腫の解析を加えることで、神経芽細胞腫の腫瘍細胞に特異的な異常 DNA メチル化を明らかにしていく予定である。

A．研究目的

神経芽細胞腫は遺伝子変異が少ないことが知られており、その一部は自然退縮というゲノム異常では説明できない現象を示す。我々は CpG island methylator phenotype(CIMP)陽性の神経芽細胞腫は *MYCN* 増幅が陰性であったとしても有意に予後が不良であることを示してきた。これらは、神経芽細胞腫において、エピゲノム異常が特に重要であることを強く示唆しているものである。

神経芽細胞腫の発がん分子基盤解明には、神経芽細胞腫におけるエピゲノム異常の全体像を把握する必要がある。本研

究では、神経芽細胞腫とその発生母地の DNA メチル化異常のプロファイリングを行うことを目的とした。神経堤由来の細胞が神経芽細胞腫の発生母地と考えられるが、ヒト神経堤細胞の入手は非常に困難である。そこで考えられるアプローチとしては、(1)ヒト iPS 細胞から作製した神経堤細胞を用いる、(2)マウスモデルを用いることが考えられる。

本年度は、そのアプローチの途中段階として、ヒト神経芽細胞腫の細胞株、および、マウス神経堤細胞由来 sphere のゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った。

B . 研究方法

1. ヒトおよびマウスゲノム DNA サンプル

ヒト細胞株は、ATCC から購入または JCRB から分与を受け、フェノール・クロロホルム法によりゲノム DNA を抽出した。胎児期 (E13.5) の野生型及びヒト MYCN を導入した (MYCN-Tg) マウスの神経堤細胞から培養した sphere のゲノム DNA は、門松分担者から供与を受けた。

2. ゲノム網羅的 DNA メチル化解析

ヒトゲノム DNA の網羅的メチル化解析には、Infinium Human Methylation450 beadchip (Illumina) を用いた。重亜硫酸 処理したゲノム DNA を増幅し、482,421 CpG 部位および 3,091 non-CpG 部位が解析可能な BeadChip にハイブリダイズして、プライマー伸長反応後、iSCAN (Illumina) スキャナを用いてデータを取得した。完全メチル化を 1、完全非メチル化を 0 とする 値を用いてメチル化の程度を判定した。

マウスゲノム DNA の網羅的メチル化解析については、MBD-seq 法を用いた。断片化した二重鎖ゲノム DN と MBD2 が結合した磁気ビーズを混合することにより、メチル化 DNA を選択的に回収した。それらの配列を Ion Proton (Life technologies) を用いて約 2,000 万リード分取得し、Torrent Suite を用いてマウスゲノムにマップした。

Strand NGS software (Agilent) に搭載されている MACS 法を用いて、メチル化 DNA が Input に対して有意に濃縮されている領域を算出することにより、メチル化領域を特定した。

3. DNA メチル化の生物情報学的解析

DNA メチル化プロファイルの階層的クラスター解析は、R package の Heatplus ライブラリを用いて行った。Gene ontology 解析は DAVID 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

今回は無し

C . 研究結果

1. ヒト神経芽細胞腫細胞株の DNA メチル化プロファイル

ヒト神経芽細胞腫細胞株の DNA メチル化プロファイルを明らかにするため、神経芽細胞腫細胞株 (N = 10) について、HumanMethylation450 を用いてゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った。別の研究で解析した胃がん細胞株 (N = 29)、大腸がん細胞株 (N = 3)、乳がん細胞株 (N = 17)、正常細胞株 (胃、大腸、乳腺、各 N = 1, 1, 2)、副腎髄質 (N = 1)、末梢血 (N = 1) の結果を併せて DNA メチル化プロファイルの階層的クラスター解析を行った。

ゲノム全体の CpG を用いた解析では、全ての神経芽細胞腫細胞株は一つ

のクラスターに分類された。CpG アイランド(CGI)に限定した解析でも、全ての神経芽細胞腫細胞株は一つのクラスターに分類されていた。また、神経芽細胞腫細胞株は、他のがん種の CIMP 陽性細胞株とは大きく異なっており、他のがん種の CIMP 陰性細胞株の群に近い傾向を示した。この傾向は、転写開始点近傍の CGI (TSS200 CGI)の解析において、より顕著であった。

さらに、神経芽細胞腫細胞株は、シナプス伝達関連遺伝子群等のプロモーターの CpG メチル化プロファイルにより、二つのグループに分割された。加えて、一部の神経芽細胞腫細胞株においては、non-CpG のメチル化が検出された。

2. マウス神経堤細胞由来 sphere のゲノム網羅的メチル化解析

胎児期 (E13.5) の野生型及び MYCN-Tg マウスの神経堤細胞から培養した sphere のゲノム網羅的メチル化解析を MDB-seq 法を用いて行った(各 N = 4, N = 5) 結果、遺伝子転写開始点近傍 (±200bp) で野生型特異的に高メチル化を示した遺伝子 7 個、MYCN-Tg 特異的に高メチル化を示した遺伝子 35 個を同定した。

Gene ontology 解析の結果、MYCN-Tg 特異的に高メチル化を示した遺伝子には、分化関連遺伝子が有意に高頻度に含まれていることが示された。その中には、神経堤細胞の分化の方向性決

定に重要であることがよく知られる Sox10 が含まれていた。野生型で特異的に高メチル化を示した遺伝子については数が少数のため、Gene ontology 解析が不可能であった。

D. 考察

1. ヒト神経芽細胞腫の DNA メチル化プロファイル

ヒト神経芽細胞腫細胞株は、他のがん種の細胞株とは異なる DNA メチル化プロファイルを示すことが明らかになった。特に、他のがん種の CIMP 陽性細胞株のメチル化プロファイルとは大きく異なり、メチル化されている CGI の数も少なかったことから、神経芽細胞腫で認められる CIMP は他のがん種の CIMP とは異なるメカニズムに基づくことが示唆された。さらに、神経芽細胞腫細胞株は、シナプス伝達関連遺伝子群等のプロモーターの CpG メチル化プロファイルにより、二つのグループに分けられることが示された。

正常なヒト神経堤細胞の入手が極めて困難であるため、今年度は、がん細胞に特異的な DNA メチル化異常の解析ができなかった。今後は、京都大学戸口田教授が開発したヒト iPS 細胞由来の神経堤細胞を標準試料として解析することで、がん細胞に特異的な DNA メチル化異常のプロファイリングを進める予定である。

2. マウス神経堤細胞由来 sphere のゲノム網羅的メチル化解析

胎児期の野生型及び MYCN-Tg マウスの神経堤細胞から培養した sphere のゲノム網羅的メチル化解析の結果、MYCN-Tg 特異的に高メチル化を示した遺伝子には分化に関連する遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。マウス神経堤細胞において、MYCN の導入が分化関連遺伝子への DNA メチル化異常を誘発したと考えられる。これらの分化異常に関わる DNA メチル化が、MYCN-Tg における神経芽細胞腫の発がんに関わっている可能性がある。

今後、MYCN-Tg マウスに発生する神経芽細胞腫原発巣およびその sphere のゲノム DNA を門松分担任から供与を受け、その DNA メチル化状態を解析する予定である。これにより、MYCN-Tg マウス特異的なメチル化が腫瘍細胞に存在するかどうかは明らかになる。

E . 結論

ヒト神経芽細胞腫細胞株は、他のがん種の細胞株とは異なる CpG メチル化プロファイルを示すことを明らかにした。MYCN を導入した胎児期のマウス神経堤細胞では分化に関連する遺伝子が特異的に高メチル化を示すことが明らかとなった。

F . 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの
該当無し

本研究費に密接に関係するもの

Takeshima H, Wakabayashi M, Hattori N, Yamashita S and Ushijima T.

Identification of co-existence of DNA methylation and H3K27me3 specifically in cancer cells as a promising target for epigenetic therapy. *Carcinogenesis*, 36: 192-201, 2015.

Hattori N and Ushijima T. Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer. *Biochem biophys Res Commun*, 455: 3-9, 2014.

Ushijima T. Cancer epigenetics: Now harvesting fruit and seeding for common diseases. *Biochem Biophys Res Commun*, 455: 1-2, 2014.

2. 学会発表

Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation by chronic inflammation, and its application to cancer risk diagnosis and prevention. *Epigenetics in Development and Diseases Conference 9th Asian Epigenomics Meeting*. Singapore, August, 2014. (invited)

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

マウス神経芽腫がん幹細胞の新規培養法開発とエピゲノム解析に関する研究

研究分担者 門松 健治 名古屋大学大学院医学系研究科生化学教室 教授

研究要旨

胎児期 E13.5 交感神経節を対象に sphere 培養を確立した。この sphere は既に腫瘍形成能を獲得していた。そのゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームの網羅的な解析により、いくつかの特徴的变化が起きていることが判明した。

A．研究目的

マウス神経芽腫がん幹細胞の新規培養法開発とゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム解析をおこなう。“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構の解明と治療のための分子標的同定の基盤を確立する。

B．研究方法

*TH-MYCN*マウスの胎児期E13.5交感神経節を対象にsphere培養を行う。交感神経節とsphereについて組織学的に同等であるかを解析する。これらsphereの分化能、自己増殖能、腫瘍形成能を比較する。また、E13.5 sphereについて、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームの解析を行う。特にエピゲノム変化が重要と予想されるので、これを中心にmRNA、miRNA、lncRNAとの関連を解析する。

（倫理面への配慮）

学内の遺伝子組み換え研究計画書及び実験動物計画書の承認を受け、研究倫理を順守して研究を行った。

C．研究結果

*TH-MYCN*マウスおよび胎児期（E13.5）の野生型マウスの腹腔交換神経節からのSphere培養を樹立した。まず、E13.5 *TH-MYCN*マウスのSphereは既に腫瘍形成能を獲得していることが判明した。そこで、野生型及び*MYCN-Tg*マウスのSphereの差別化がどのようにして起こるのかを明確にするために、ゲノム網羅的メチル化解析をMDB-seq法を用いて行った。加えてmRNA、lncRNA、miRNAの発現解析をマイクロアレイを用いて、ゲノム解析をarray CGHを用いて行った。この結果、*TH-MYCN*マウスでは、ゲノムコピー数の異状はE13.5で起きていること、遺伝子発現の特徴として*MYCN*下流遺伝子の発現誘導などが起きていること、DNAメチル化に差別化が起きていることなどが明らかになった。

E．結論

E13.5 sphereは既に腫瘍形成能を獲得していた。そのゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームの網羅的な解析により、いくつかの特徴的变化が起きている

ることが判明した。

G . 研究発表

1. 論文発表

Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies. *Expert Opin Drug Discov.* 10(1):53-62, 2015.

Nakaguro M, Kiyonari S, Kishida S, Cao D, Murakami-Tonami Y, Ichikawa H, Takeuchi I, Nakamura S, Kadomatsu K. The nucleolar protein PES1 is a marker of neuroblastoma outcome and is associated with neuroblastoma differentiation. *Cancer Sci.* 2014.

Murakami-Tonami Y, Kishida S, Takeuchi I, Katou Y, Maris JM, Ichikawa H, Kondo Y, Sekido Y, Shirahige K, Murakami H, Kadomatsu K. Inactivation of SMC2 shows a synergistic lethal response in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Cell Cycle.* 13(7):1115-31, 2014.

Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, Kadomatsu K. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One.* 9(1):e86813, 2014.

Kishida S, Kadomatsu K. Involvement of midkine in neuroblastoma tumorigenesis. *Br J Pharmacol.* 171(4):896-904, 2014.

Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine: an emerging target of drug deve-

lopment for treatment of multiple diseases. *Br J Pharmacol.* 171(4):811-3, 2014.

Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P. Therapeutic potential of midkine in cardiovascular disease. *Br J Pharmacol.* 171(4):936-44, 2014.

2. 学会発表

Kishida S, Kadomatsu K. The RNA aptamer Against Midkine Suppresses neuroblastoma Xenograft Growth by Attenuating Midkine-Notch2 Pathway (口頭), ANR2014

Tsubota S, Kishida S, Kadomatsu K. Elucidation of mechanisms underlying fate determination of neuroblastoma in MYCN-Tg mice. (ポスター), ANR2014

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

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

神経芽腫におけるgenetic landscapeに関する研究

研究分担者 滝田 順子 東京大学大学院医学系研究科小児科准教授

研究要旨

神経芽腫における分子病態の全体像を把握するために、大規模検体において、genetic landscapeの作成を試みた。その結果、MYCN、ALKおよび1p LOH、11q LOHは協調して予後不良に関連している可能性が示された。

A．研究目的

神経芽腫における遺伝子変異とゲノム異常の相互関連を明らかにし、分子病態の全体像を把握するために、日本神経芽腫研究グループの登録症例を含む442例の大規模検体において、既知の神経芽腫関連遺伝子のtarget sequencingおよびゲノムコピー数の網羅的解析を行い、genetic landscapeの作成を試みる。

B．研究方法

まず次世代シーケンサーを用いて、Deep sequencingを行ったが、ターゲット遺伝子として、ALK、ATRX、RAS関連遺伝子PHOX2B、ARID1A/Bの計10個を抽出した。次に、SNPアレイを用いて、網羅的ゲノムコピー数の解を行った。データ解析にはCNAG/AsCNARを用いた。
(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、東京大学の倫理審査委員会で審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（2003年3月）」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

C．研究結果

366人では何らかのゲノム異常が検出され、このうち91例においては、いずれかの遺伝子変異が認められた。最も頻度の高い遺伝子変異はALK変異であり、約9%であった。ゲノム異常により6つのサブグループ(A:ALK+MYCN、B:Other mutation、C:MYCN+1p LOH、D:11q LOH、E:Hyperploidy、F:silent)が検出された。グループA、C、Dにはstage 4が有意に多く、またグループDは年長児が、グループEには年少児が多く含まれた。

D．考察

MYCN、ALKおよび1pLOH、11q LOHは協調して予後不良に関連している可能性が示され、他の遺伝子異常は予後や腫瘍の進展に影響しないことが判明した。

E．結論

大規模検体によるgenetic landscapeの作成は、分子病態を理解する上で有用であった。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表

1) Hoshino A, Nomura K, Hamashima T, Isobe T, Seki M, Hiwatari M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Kanegane H. Aggressive transformation of anaplastic large cell lymphoma with increased number of ALK-translocated chromosomes. *Int J Hematol.* 101:198-202,2015

2) Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J, Yabe H, Goto H, Adachi S, Hayakawa A, Takeshita Y, Sawada A, Atsuta Y, Kato K. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for infant acute lymphoblastic leukaemia with KMT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the paediatric acute lymphoblastic leukaemia working group of the Japan Society for Haematopoietic Cell Transplantation. *Br J Haematol.* 168:564-70, 2015

3) Koh K, Tomizawa D, Moriya Saito A, Watanabe T, Miyamura T, Hirayama M, Takahashi Y, Ogawa A, Kato K, Sugita K, Sato T, Deguchi T, Hayashi Y, Takita J, Takeshita Y, Tsurusawa M, Horibe K, Mizutani S, Ishii E. Early use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with MLL gene-rearrangement-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 29:290-6, 2015

4) Yasudo H, Ando T, Takeuchi M, Nakano H, Itonaga T, Takehara H, Isojima T, Miura K, Harita Y, Takita

- a J, Oka A. Systemic lupus erythematosus complicated with liver cirrhosis in a patient with Papillon-Lefèvre syndrome. *Lupus*. 23:1523-7, 2014
- 5) Shiozawa Y, Takita J, Kato M, Sotomatsu M, Koh K, Ida K, Hayashi Y. Prognostic significance of leukopenia in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett*. 7:1169-1174, 2014
- 6) Hangai M, Watanabe K, Shiozawa R, Hiwatari M, Ida K, Takita J. Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia with Unusual Multiple Bone Invasions: A case report. *Oncol Lett*. 7:991-993, 2014
- 7) 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*. 15:74:3790-801, 2014
- 8) Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, Kato M, Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma. *Cancer Res*. 74:2742-9, 2014
- 9) Fujishiro J, Sugiyama M, Ishimaru T, Uotani C, Tsuchida S, Takahashi N, Shiozawa R, Takita J, Iwanaka T. Cyclic fluctuation of blood pressure in neonatal neuroblastoma. *Pediatr Int*. 56:934-7, 2014
- 10) Kawashima-Goto S, Imamura T, Seki M, Kato M, Yoshida K, Sugimoto A, Kaneda D, Fujiki A, Miyachi M, Nakatani T, Osone S, Ishida H, Taki T, Takita J, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Hosoi H. Identification of a homozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapsed early T-cell precursor ALL patient. *Int J Hematol*. 2014 Nov 28. [Epub ahead of print]
- 11) Takita J, Chen Y, Kato M, Ohki K, Sato Y, Ohta S, Sugita K, Nishimura R, Hoshino N, Seki M, Sanada M, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S. Genome-wide approach to identify second gene targets for malignant rhabdoid tumors using high-density oligonucleotide microarrays. *Cancer Sci*. 105:258-64, 2014
- 12) Sekine T, Komoda F, Miura K, Takita J, Shimadzu M, Matsuyama T, Ashida A, Igarashi T. Japanese Dent disease has a wider clinical spectrum than Dent disease in Europe/USA: genetic and clinical studies of 86 unrelated patients with low-molecular-weight proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 29:376-84, 2014
- 13) Kato M, Shiozawa R, Koh K, Nagatoshi Y, Takita J, Ida K, Kikuchi A, Hanada R. The effect of the order of total body irradiation and chemotherapy on graft-versus-host disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 36:e9-12, 2014
- 14) Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S. Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth. *J Pediatr Hematol Oncol*. 36:166-8, 2014
- 15) 滝田 順子 :【ビジュアル小児外科疾患のフォローアップ・プログラム・手術直後から遠隔期の問題点まで】 神経芽腫(解説/特集) .小児外科 (0385-6313)46 巻 11 号 Page1159-63(2014.11)
- 16) 滝田 順子 :小児の臨床検査 小児の遺伝子・染色体検査(解説) . 検査と技術 (0301-2611)43 巻 1 号 Page58-62(2015.01)
- 17) 渡邊 健太郎, 加藤 元博, 田中 淳, 中井 まりえ, 関 正史, 林 泰佑, 塩澤 亮輔, 樋渡 光輝, 吉田 健一, 小川 誠司, 松坂 恵介, 深山 正久, 滝田 順子, 岡明 . 高用量シクロフォスファミドによるHLA一致同胞間骨髓幹細胞移植後に致死的心毒性をきたした一例(原著論文/症例報告) 日本造血細胞移植学会雑誌3巻4号 Page120-3(2014.10)
- 18) 滝田 順子 :次世代シーケンサーによる小児血液、腫瘍疾患における研究の進展 小児固形腫瘍における治療標的の探索(解説) 日本小児血液・がん学会雑誌 (2187-011X)51 巻 3 号 Page278-84(2014.09)
- 19) 滝田 順子 . 【小児の治療指針】 血液・腫瘍 悪性リンパ腫(解説/特集) . 小児科診療 (0386-9806)77巻増刊 Page486-8(2014.04)

20) 滝田 順子: 【急性リンパ性白血病(ALL)】 小児 ALL の予後因子と治療(解説/特集) 血液内科 (2185-582X)68 巻 2号 Page203-9(2014.02)

21) 滝田 順子: 急性リンパ性白血病に対するゲノム解析の成果 . 血液内科 . 69:713-9, 2014

22) 滝田 順子 : 急性リンパ性白血病 (ALL). 血液フロンティア 24:55-63, 2014

23) 滝田 順子: 神経芽腫の次世代シーケンサーによる解析 . 小児外科 47:145-9, 2015

2. 学会発表

(海外)

1) Seki M, Kato M, Oyama R, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Arakawa Y, Kishimoto H, Miyano S, Oka A, Hanada R, Ogawa S, Koh K, Takita J. Genome-wide analysis of T cell acute lymphoblastic leukemia with subsequent development of Langerhans cell histiocytosis. International Society of Paediatric Oncol. (9th Biennial Childhood Leuk Sympo), April 28-29, 2014

2) Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kato M, Hiwataari M, Sanada M, Hanada R, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Genetic Landscapes of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Pediatric Academic Societies and Aisan Society for Pediatric Research (2014), May 3-6, 2014

3) Hiwatari M, Seki M, Kato M, Yoshida K, Ogawa S, Takita J. Analysis for Neuroblastoma Tumors to Reveal Novel Target Using Next-Generation RNA Sequencing , Advances in Neuroblastoma Research (2014), May 13-16, 2014

4) Isobe T, Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Sato Y, Kato M, Hama A, Tanaka Y, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Oka A, Takita J. Genome-wide approach to identify gene targets of pancreaticoblastoma. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncol. October 22-25, 2014

5) Hoshino N, Seki M, Yoshida K, Kato M, Nishimura R, Miyano S, Hayashi Y, Oka A, Iwanaka T, Ogawa S, Takita J. Integrated analyses of epigenetic regulatory genes in neuroblastoma. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, October 22-25, 2014

6) Seki M, Shimamura T, Yoshida K, Sato Y, Nishimura R, Kato M, Nagae G, Oka A, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Genome-wide epigenetic and copy number analyses in rhabdomyosarcoma. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, October 22-25, 2014

7) Kato M, Hasegawa D, Koh K, Inagaki J, Kato K, Goto H, Takita J, Yabe H, Sawada A, Atsuta Y, Kato K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective study from the pediatric all working group of the JSHCT. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, October 22-25, 2014

8) Soejima T, Sato I, Takita J, Koh K, Maeda M, Ida K, Kamibeppu K. The influences of school reentry support on relationships that adolescents with cancer share with peers and teachers. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, October 22-25, 2014

(国内)

(国内)

1) 眞下秀明, 塩澤亮輔, 渡邊健太郎, 加藤元博, 樋渡光輝, 藤代準, 滝田順子, 岩中督. APC遺伝子異常を有する肝芽腫再発の1例. 関東甲信越地区小児がん登録研究会, 2014年3月21日, 東京

2) 関正史, 西村力, 吉田健一, 加藤元博, 樋渡光輝, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子, 岡明. RNAシーケンス解析による横紋筋肉腫における新規転座の検索. 第117回日本小児科学会, 平成26年4月11日~13日

3) 西村力, 吉田健一, 白石友一, 関正史, 眞田昌, 岡明, 林泰秀, 宮野悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いた横紋筋肉腫の遺伝子変異全体図. 第117回日本小児科学会, 平成26年4月11日~13日

4) 星野論子, 西村力, 関正史, 加藤元博, 吉田健一, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 岡明, 滝田順子. 全エクソーム解析を用

いた肝芽腫における網羅的ゲノム解析．第117回日本小児科学会，平成26年4月11日～13日

5) 吉田美沙，関正史，星野論子，樋渡光輝，加藤元博，吉田健一，小川誠司，林泰秀，滝田順子，岡明．次世代シーケンサーを用いた神経芽腫における11q領域の責任遺伝子探索．第117回日本小児科学会，平成26年4月11日～13日

6) 瓜生久美子，関正史，加藤元博，星野論子，樋渡光輝，中川原章，林泰秀，小川誠司，滝田順子，岡明．神経芽腫120検体におけるゲノム異常と予後解析．第117回日本小児科学会，平成26年4月11日～13日

7) 塩澤亮輔，渡邊健太郎，樋渡光輝，加藤元博，滝田順子，岡明．当院でのテイクプラニン標準投与における血中濃度解析．第117回日本小児科学会，平成26年4月11日～13日

8) 樋渡光輝，渡邊健太郎，塩澤亮輔，加藤元博，滝田順子，岡明．再発を繰り返すランゲルハンス組織球症の1例．第117回日本小児科学会，平成26年4月11日～13日

9) 塩澤亮輔，関正史，星野論子，吉田健一，吉田美沙，瓜生久美子，加藤元博，小川誠司，滝田順子，岡明．次世代シーケンサーによる小児胚細胞腫瘍の変異解析．第73回日本癌学会学術総会，平成26年9月25日～27日

10) 瓜生久美子，西村力，吉田健一，関正史，星野論子，吉田美沙，加藤元博，樋渡光輝，林泰秀，田尻達郎，中川原章，小川誠司，滝田順子．神経芽腫大規模検体におけるgenetic landscapeと予後解析．第73回日本癌学会学術総会，平成26年9月25日～27日

11) 吉田美沙，関正史，加藤元博，瓜生久美子，星野論子，西村力，樋渡光輝，吉田健一，岡明，小川誠司，林泰秀，滝田順子．神経芽腫における11q領域に関連した責任遺伝子探索．第73回日本癌学会学術総会，平成26年9月25日～27日

12) 星野論子，関正史，吉田健一，加藤元博，白石友一，佐藤悠佑，千葉健一，宮野悟，林泰秀，岩中督，岡明，小川誠司，滝田順子．エクソーム解析とトランスクリプトーム解析を用いた肝芽腫における統合解析．第73回日本癌学会学術総会，平成26年9月25日～27日

13) 富山新太，上北尚正，山口英樹，上野英明，滝田順子，佐々木一樹，中川原章，森健太郎，堺隆一．新規ALK結合蛋白質であるFlotillin-1は、ALKの細胞膜結合の調整節を介してALKシグナルを制御する．第73回日本癌学会学術総会，

平成26年9月25日～27日

14) 関正史，吉田健一，白石友一，佐藤悠佑，島村徹平，千葉健一，田中洋子，花田良二，岡明，宮野悟，林泰秀，小川誠司，滝田順子．胸膜肺芽腫におけるDICER1 RNase III B ドメイン変異のmiRNA産生への影響．第73回日本癌学会学術総会，平成26年9月25日～27日

15) Hiwatari M, Seki M, Shiozawa R, Kato M, Yoshida K, Ogawa S, Takita J. Transcriptome profiling of neuroblastoma by RNA-Seq. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会，平成26年11月28日～30日

16) Hoshino N, Seki M, Yoshida K, Kato M, Sato Y, Kasahara M, Nakazawa A, Miyano S, Hayashi Y, Oka A, Iwanaka T, Takita J. Integrated analysis of clonal evolution in hepatoblastoma with familial adenomatous polyposis. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会，平成26年11月28日～30日

17) Shiozawa R, Seki M, Hoshino N, Yoshida K, Yoshida M, Uryu K, Hiwatari M, Kato M, Ogawa S, Oka A, Takita J. Landscape of genomic alteration of pediatric germ cell tumors. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会，平成26年11月28日～30日

18) Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraiishi Y, Sato Y, Hoshino N, Nagae G, Okuno Y, Hosoi H, Tanaka Y, Okita H, Taguchi T, Hanada R, Oka A, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular clusters in rhabdomyosarcoma. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会，平成26年11月28日～30日

19) Hoshino N, Seki M, Yoshida K, Kato M, Nishimura R, Sato Y, Miyano S, Nagae G, Hayashi Y, Oka A, Aburatani H, Iwanaka T, Ogawa S, Takita J. The role of epigenetic dysregulation in neuroblastoma. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会，平成26年11月28日～30日

20) 渡邊健太郎，加藤元博，張田豊，関口昌央，塩澤亮輔，樋渡光輝，滝田順子，岡明．中心静脈カテーテル関連血流感染（CRBSI）の予防に対する試みとその効果．第56回日本小児血液・がん学会学術集会，平成26年11月28日～30日

21) 磯部知弥，関正史，吉田健一，白石友一，千葉健一，田中洋子，佐藤悠佑，加藤元博，井口晶裕，濱麻人，田中祐吉，

宮野悟, 小川誠司, 岡 明, 滝田順子. 再発膝芽腫のマルチサンプリングによる腫瘍内不均一およびクローン進化の考察.

第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

22) 関口昌央, 加藤元博, 渡邊健太郎, 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 林泰佑, 平田陽一郎, 滝田順子, 岡 明. 重篤な慢性心不全を合併した21トリソミー児のAMKLに対する緩和的化学療法. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

23) 瓜生久美子, 西村力, 吉田健一, 関正史, 星野論子, 吉田美沙, 加藤元博, 樋渡光輝, 岡 明, 林泰秀, 田尻達郎, 中川原章, 滝田順子. 神経芽腫におけるターゲット遺伝子の深々度シークエンス. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

24) 吉田美沙, 関正史, 加藤元博, 瓜生久美子, 星野論子, 西村力, 樋渡光輝, 吉田健一, 岡 明, 小川誠司, 林泰秀, 滝田順子. 神経芽腫におけるATM pathway 関連遺伝子の異常. 第56回日本小児血液・

25) 物井綾香, 関正史, 吉田健一, 佐藤悠佑, 加藤元博, 樋渡光輝, 星野論子, 竹谷健, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 宮野悟, 岡 明, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫再発2例に対する網羅的ゲノム解析. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

26) 木本豪, 加藤元博, 関口昌央, 渡邊健太郎, 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 阿部浩幸, 田中麻理子, 武笠晃文, 滝田順子, 岡 明. 先天性高悪性脳腫瘍の1例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

27) 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 加藤元博, 田中淳, 滝田順子, 岡 明. 慢性活動性EBV感染症の1倍検例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

28) 松野良介, 大貫裕太, 藤田祥央, 花村麻衣子, 塚田大樹, 秋山康介, 外山大輔, 池田祐一, 関正史, 加藤元博, 樋渡光輝, 滝田順子, 磯山恵一. ALK陽性思春期神経芽腫に対するクリゾチニブの治療経験. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

29) 清水啓道, 本多秀俊, 大野能之, 長瀬幸恵, 加藤元博, 樋渡光輝, 滝田順子, 岡 明, 鈴木洋史. 小児がん化学療法に対する病棟薬剤師の取り組み. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

30) 星野顕宏, 野村恵子, 関正史, 樋渡光輝, 吉田健一, 小川誠司, 滝田順子, 金兼弘和. 未分化大細胞型リンパ腫におけるALK転座染色体の過剰を伴った急性転化. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

31) 藤代準, 杉山正彦, 新井真理, 石丸哲也, 吉田真理子, 魚谷千都恵, 宮川亨平, 加藤元博, 滝田順子, 土田晋也, 高橋尚人, 岩中督. 腎静脈浸潤を認めた先天性間葉芽腎腫の一例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

32) 杣津晋平, 合井久美子, 渡邊敦, 犬飼岳史, 蓮田憲夫, 高野邦夫, 近藤哲夫, 中澤温子, 宮地充, 細井創, 滝田順子, 後藤裕明, 杉田莞爾. FGFR-1増幅を伴う治療抵抗性未分化肉腫の1例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

33) 宮川亨平, 藤代準, 高見尚平, 加藤怜子, 出家亨一, 魚谷千都絵, 吉田真理子, 石丸哲也, 新井真理, 杉山正彦, 岩中督, 加藤元博, 渡邊健太郎, 滝田順子, 柴原順二. Congenital and childhood pleomorphic (multinodular) cellular schwannoma の1乳児例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

34) 岩崎美和, 割田陽子, 滝田順子, 加藤元博, 樋渡光輝, 大友英子, 宮里由香里. 小児造血細胞移植後フォローアップ外来の取り組みと課題. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 平成26年11月28日~30日

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

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

候補標的分子の分子生物学的解析

研究分担者 江成 政人 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

神経芽腫の約10%程度において、ALK 遺伝子の遺伝子増幅や変異活性化が起こっていることが知られており、ALK 阻害剤が ALK 陽性神経芽腫の分子標的薬候補として考えられている。また、神経芽腫において、p53 遺伝子の変異はほとんどないことが知られている。そこで、本研究では、ALK 遺伝子の遺伝子増幅や活性化変異を持つ神経芽腫において p53 経路の活性化が ALK 阻害剤耐性を減弱させるか調べた。その結果、ALK 阻害剤や p53 活性化剤単独に比べ、併用処理が ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。更に、特殊な細胞培養用の培地を用いて、がん幹細胞様の細胞をスフェア形成させ、その際の ALK 阻害剤耐性についても調べたところ、ALK 阻害剤と p53 活性化剤との併用が有効であることが分かった。

A．研究目的

ALK 遺伝子は神経芽腫の約10%程度で遺伝子増幅や変異活性化が見られるがん遺伝子で、ALK 阻害剤が ALK 陽性神経芽腫の分子標的薬候補として考えられている。しかしながら、多くの場合 ALK 阻害剤に対する治療抵抗性が問題となるが、その基本的な分子メカニズムやがん幹細胞様性質との関連性など、不明な点が多い。また、ほとんどの神経芽腫において、p53 遺伝子の変異はなくどのようなメカニズムで p53 経路が不活化されているのか詳細にわかっていない。以前の私達の研究から、ALK 融合を持つリンパ腫や肺腺がんにおいて、p53 遺伝子の変異がほとんどなく ALK による p53

のリン酸化が p53 経路を不活化すること、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が、ALK 融合陽性リンパ腫に対して非常に有効であることを見出した。

そのような背景のもと、本研究では、ALK の遺伝子増幅あるいは活性化変異を持つ神経芽腫において、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が、神経芽腫のがん幹細胞様性質を持つ細胞の増殖を効果的に抑制するか検討するとともに、ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性メカニズムを解明することを目的とする。

B．研究方法

ヒト神経芽腫 NB39-nu 細胞及び SHSY-5Y 細胞は10%牛胎児血清(FBS)

と抗生物質ペニシリン及びソトレプトマイシンを含む PRMI-1640 培地で、37℃、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。スフェア形成能のアッセイ系には、20 ng/ml 上皮成長因子 (EGF)、10 ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 及び B27 添加物を含む DMEM/F-12 培地を用い、NB39-nu 細胞及び SHSY-5Y 細胞を低細胞結合プレート中で培養した。ALK 阻害剤には、Crizotinib、CH5424802 及び TAE684 を用い、様々な濃度で神経芽腫由来の細胞を処理した。一方、p53 活性化剤には、Nutlin-3a を用い、単剤あるいは ALK 阻害剤と併用で細胞を処理した。細胞生存率の測定には、WST-8 をベースとした Cell counting kit を用いた。(倫理面への配慮)

臨床由来の検体を使用しておらず、該当しない。

C . 研究結果

ALK 遺伝子の遺伝子増幅を持つ神経芽腫 NB39-nu 細胞において、p53 活性化剤 Nutlin-3a が ALK 阻害剤に対する薬剤耐性を軽減させるか調べた。その結果、ALK 阻害剤や p53 活性化剤単剤と比較して、併用処理が NB39-nu 細胞の ALK 阻害剤耐性を著しく減弱させることがわかった。また、ALK 遺伝子の活性化変異を持つ神経芽腫 SHSY-5Y 細胞においても、同様な結果を得た。次に、がん幹細胞様形質の特徴としてスフェア形成能の有無が用いられている。そこで、上記神経芽

腫由来の細胞におけるスフェア形成能の実験系の構築を試みた。様々な培養条件を用いて検討したところ、20 ng/ml 上皮成長因子 (EGF)、10 ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 及び B27 添加物の存在下、NB39-nu 細胞及び SHSY-5Y 細胞共にスフェア形成能を示した。そのスフェア形成のアッセイ系を用いて、がん幹細胞様形質を持つ細胞塊を形成させ、ALK 阻害剤耐性における p53 活性化剤の影響について調べた。2次元平面培養の時と同様、この実験系を用いた解析からも p53 活性化剤が ALK 阻害剤耐性を軽減させるのに有効であることがわかった。

D . 考察

本研究において、p53 活性化剤である Nutlin-3a が ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を軽減させることがわかった。特にがん幹細胞様性質を持つ神経芽腫に対しても ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が相乗効果を示し、ALK 陽性神経芽腫に対してきわめて有効であることが示唆された。しかしながら、ALK 陽性神経芽腫において p53 経路がどのようにして不活化しているのか、併用処理がなぜ有効なのかについての分子メカニズムや神経芽腫における ALK 阻害剤耐性の分子メカニズム等理解に乏しく、今後の解析が必要であろう。

E . 結論

以上の結果、p53 活性化は、がん幹細胞様性質を持つ ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を軽減させ、ALK 阻害剤と p53 活性化剤の併用が ALK 陽性神経芽腫に対し、きわめて有効的な治療法になり得ることが期待できる結果を導き出した。

G . 研究発表

1. 論文発表

1) Ryo otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Matsushima-Hibiya, Makoto Miyazaki, Fumio Tashiro, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Takahiro Ohiya, Uun Yokota, Hitoshi Nakagawa, Yoichi Taya, and Masato Enari: TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, 18691-18696, 2014

2) Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Koh Furuta, Yoko Shimada, Hideaki Ogiwara, Shunichi Watanabe, Hiroshi Nokihara, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nammo, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Curtis C. Harris, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida and Takashi Kohno: Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung

Adenocarcinoma. **Clinical Cancer Reserch.** 20, 3087-3093, 2014

3) Chihiro Otsubo, Ryo Otomo, Makoto Miyazaki, Yuko Matsushima-Hibiya, Takashi Kohno, Reika Iwakawa, Fumitaka Takeshita, Hirokazu Okayama, Hitoshi Ichikawa, Hideyuki Saya, Tohru Kiyono, Takahiro Ochiya, Fumio Tashiro, Hitoshi Nakagama, Jun Yokota, and Masato Enari: TSPAN2 is Involved in cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression. *Cell Reports*, 7, 527-538, 2014

2. 学会発表

1) TSPAN2 is a factor responsible for promotion of invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. Makoto Miyazaki, Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、
2014年11月25日

2) TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Makoto Miyazaki, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、
2014年11月25日

3) CD74-*NRG1* はがん幹細胞性を促進する可能性のある腫瘍性タンパク質である。Tkahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsnori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu

Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第37回日本分子生物学会年会、ポスター発表、横浜、2014年11月25日

4) Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. Takashi Nakaoku, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Hideaki Ogiwara, Hiroshi Nokihara, Hirokazu Okayama, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida, Takashi Kohno. 第73回日本癌学会学術総会、口頭発表、横浜、2014年9月26日

5) CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties. Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. 第73回日本癌学会学術総会、ポスター発表、横浜2014年9月27日

6) INACTIVATION OF P53 PATHWAY IN ALK FUSION-POSITIVE TUMORS THROUGH DIRECT TYROSINE PHOSPHORYLATION OF P53: Masato Enari. the 16th International p53 Workshop, ポスター発表、sweden, 2014年6月16日

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
分担研究報告書

ヒトおよびマウス神経芽腫がん幹細胞のTranscriptome解析：
神経芽腫腫瘍検体のaCGHによるゲノム変異の網羅的解析

研究分担者 大平 美紀 千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室 室長

研究要旨

本分担研究では、神経芽腫の進行例に対する新たな治療法開発を目的とした発がん分子機構の解明のために、研究班各グループから候補遺伝子のスクリーニング用に作製された神経芽腫細胞株やスフェア化細胞を対象として、マイクロアレイを用いたアレイ CGH 法によるゲノム変化の網羅的解析と遺伝子発現プロファイルを担当する。H26 年度は 3 種類の神経芽腫細胞株を対象に、スフェア化前後の遺伝子発現プロファイルの変化を 8x60K 遺伝子発現アレイを用いて解析した。GSEA 遺伝子アノテーション解析、パスウェイ解析から、スフェア化時に発現が上昇するものとして、神経分化マーカー遺伝子群や神経特異的チロシンキナーゼレセプター遺伝子等が、発現が抑制されるものとして TP53 により転写制御を受けるアポトーシス関連遺伝子群やヘッジホッグファミリー遺伝子等が抽出された。今後は神経堤細胞へ分化させた iPS 細胞等を対象とした解析を予定している。

A．研究目的

近年の化学療法の進展により、小児がんの予後は飛躍的に向上したものの、一部の小児がんについては依然として予後不良であり、早期層別化と新たな治療法の開発が望まれる。代表的な難治性小児がんの一つ、神経芽腫の進行例では、*MYCN* がん遺伝子の増幅や *ALK* チロシンキナーゼ遺伝子の異常などのゲノム異常が知られているが、次世代シーケンサーによる解析から見いだされる遺伝子変異の数は、成人がんに比べると非常に少ないことがわかってきた。そこで、このような“遺伝子変異を伴わないがん”のサブセットの神経芽腫について、エピゲノム・トランスクリプトーム解析を中心に施行し、これにゲノム解析、プロテオーム解析を加えたマルチオミックス解析を行い、その発がん分子機構を解明することを目的とする。本分担研究では、これまでに取

得した神経芽腫臨床検体における遺伝子発現やゲノム異常等の分子プロファイルのデータをもとに、遺伝子変異を伴わないタイプの神経芽腫の特徴を抽出するとともに、研究班各グループからの候補遺伝子のスクリーニング用に作製された神経芽腫細胞株やスフェア化細胞を対象として、マイクロアレイを用いたアレイ CGH 法によるゲノム変化の網羅的解析と遺伝子発現プロファイルを行い、過去の神経芽腫症例のプロファイルデータベースと比較することにより、治療標的となる候補遺伝子や特異的マーカーの検索を行う。

B．研究方法

1. 解析対象：

神経芽腫細胞株のスフェア化時に特異的な発現を示す遺伝子の抽出：
MYCN 増幅を伴う 3 種類の神経芽腫細胞

株 IMR32、NGP、SMS-SAN について、専用培地を用いてスフェア化し、スフェア化前後の細胞株から抽出された RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

スフェア化に關与する CDX1 遺伝子によって発現が誘導される遺伝子群の検索：スフェア化神経芽腫細胞株で有意に発現レベルが上昇し、その形質獲得に關与が予測される CDX1 遺伝子を 2 種類の神経芽腫細胞株 SH-SY5Y、SK-N-BE に過剰発現させ、細胞より抽出された RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

2. 網羅的遺伝子発現解析：

上記細胞株由来の total RNA 200ng を出発材料に、ヒト遺伝子発現解析アレイ（アジレント社 Human Genome oligo DNA microarray、8x60k フォーマット）を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。Feature Extraction によりハイブリダイゼーション後の数値化を行った後、GeneSpring ソフトウェアを用いて各遺伝子の相対発現量の算出とスフェア化前後、あるいは CDX1 過剰発現時の遺伝子発現レベルの比較を行った。

（倫理面への配慮）

本年度は細胞株を用いた遺伝子発現解析のみを行い、臨床検体を用いた実験ならびに臨床データを用いた解析は行っていない。来年度以降で臨床検体を用いた実験を行う場合は、関連法規ならびに指針を遵守し、事前に倫理審査委員会ならびに実施機関長の承認を得た上で、検体提供者の人権の擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施する。

C . 研究結果

1. 神経芽腫細胞株のスフェア化時に特異的な発現を示す遺伝子の抽出：

神経芽腫がん幹細胞の遺伝子発現の

特徴を把握する目的で、*MYCN* 増幅を伴う 3 種類の神経芽腫細胞株 IMR32、NGP、SMS-SAN を、専用培地を用いてスフェア化し、8x60k アジレント社ヒト遺伝子発現解析用アレイを用いてスフェア化前後の遺伝子発現プロファイルの比較を行った。 $p < 0.001$ 、Fold change > 2 の絞り込み条件とした統計解析により、約 1080 遺伝子が抽出された。GSEA 遺伝子アノテーション解析、パスウェイ解析から、スフェア化時に共通して発現レベルが上昇するものとして、神経分化マーカー遺伝子群や神経特異的チロシンキナーゼレセプター遺伝子等が、発現レベルが抑制されるものとして TP53 により転写制御を受けるアポトーシス関連遺伝子群やヘッジホッグファミリー遺伝子等が抽出された。

2. CDX1 遺伝子によって発現が誘導される遺伝子群の検索：

CDX1 遺伝子は、主任研究者（上條）らのグループによりスフェア化神経芽腫細胞特異的な転写因子として同定された分子である。上記スフェア化細胞 IMR32、NGP、SMS-SAN においても、スフェア化前に比較して、約 160 倍、25 倍、14 倍の発現レベルの増加が確認されている。本研究では、2 種類の神経芽腫細胞株 SH-SY5Y (*MYCN* 増幅なし)、SK-N-BE (*MYCN* 増幅あり) に CDX1 を過剰発現させた際に発現レベルが変化する遺伝子群の抽出を行った。2 種類の細胞株の間で共通に発現レベルに有意な変化があった遺伝子は約 320 種類であった。CDX1 発現レベルと強い正の相関を示す遺伝子群には、幹細胞性ならびに浸潤に關与するといわれる Wnt シグナルファミリー遺伝子の一つが含まれていた。これらについては、今後神経芽腫のスフェア化細胞における意義について検証を進めたい。

D . 考察

今回抽出した遺伝子群の中から特に重要なものを絞り込むため、さらに細胞の種類を加えた解析と、臨床検体の遺伝子発現プロファイルデータベースと患者の転帰情報等の比較解析を進める予定である。

E . 結論

H26 年度は基礎的データの取得を目的に3種類のスフェア化細胞株における遺伝子発現プロファイルの特徴を取得した。今後は神経堤細胞へ分化させた iPS 細胞等を対象とした解析を予定している。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res.* 74(14):3790-801, 2014.
- 2) Oberthuer A, Juraeva D, Hero B, Volland R, Sterz C, Schmidt R, Faldum A, Kahlert Y, Engesser A, Asgharzadeh S, Seeger R, Ohira M, Nakagawara A, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Bénard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Grundy RG, Orthmann M, Shao C, Schwab M, Eils R, Simon T, Theissen J, Berthold F, Westermann F, Brors B, Fischer M. Revised risk estimation and treatment stratification of low- and intermediate- risk neuroblastoma patients by integrating clinical and molecular prognostic markers. *Clin. Cancer Res.* in press.

2. 学会発表

- 1) Ohira M, Kamijo T, Nakamura Y, Takimoto T, Nakagawara A, Takita J, Iehara T, Takahashi H, Tajiri T, Nakagawara A: Japan Neuroblastoma Study Group. Genome-based sub-classification of neuroblastoma: A retrospective study by using 573 neuroblastoma samples obtained in Japan. *Advances in Neuroblastoma Research Congress 2014 (ANR2014)*, Cologne. 5月13日-16日, 2014.
- 2) 大平美紀、辰野健二、堤修一、山本尚吾、中村洋子、上條岳彦、油谷浩幸、中川原章. 神経芽腫難治性サブタイプの網羅的ゲノム解析による予後関連ゲノム異常の検索. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山, 11月28日-30日, 2014.

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

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
「多診療科医師合同シンポジウム 難治性固形腫瘍を考える - 基礎から臨床まで：神経芽腫」 神経芽腫の基礎生物学 Basic Biology of Neuroblastoma (口頭)	上條岳彦	第56回小児血液・がん学会	2014年11月	国内
Tumor sphere specific transcription factor CDX1 regulates stem cell-related gene expression and aggressiveness in neuroblastoma (ポスター)	Hisanori Takenobu, Takehiko Kamijo 他	Advances of Neuroblastoma 2014	2014	国外(ドイツ)
Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulates MYCN/ATM/p53 pathway (ポスター)	Yohko Yamaguchi, Hisanori Takenobu, Takehiko Kamijo 他	Advances of Neuroblastoma 2014	2014	国外(ドイツ)
Functional role of cancer stem cell marker CD133 in tumorigenesis (口演)	Takehiko Kamijo	The 12th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research	2014	国内

<p>Tumor sphere specific transcription factor CDX1 regulates stem cell-related gene expression in neuroblastoma (口演)</p>	<p>Hisanori Takenobu, Osamu Shimozato, Yu-ichi Fujimura, Nobuhiro Akita, Yohko Yamaguchi, Eriko Ikeda, Masatoshi Tagawa, Akira Nakagawara, Haruhiko Koseki, Takehiko Kamijo</p>	<p>第73回日本癌学会学術総会</p>	<p>2014</p>	<p>国内</p>
<p>Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway. (口演)</p>	<p>Yohko Yamaguchi, Hisanori Takenobu, Miki Ohira, Akira Nakagawara and Takehiko Kamijo</p>	<p>第73回日本癌学会学術総会</p>	<p>2014</p>	<p>国内</p>
<p>RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma depending on the ploidy status and age of patients (口演)</p>	<p>Masayuki Haruta, Takehiko Kamijo, Akira Nakagawara, and Yasuhiko Kaneko</p>	<p>第73回日本癌学会学術総会</p>	<p>2014</p>	<p>国内</p>
<p>Regulation of asymmetric cell division in human neuroblastoma stem-like cells (口演)</p>	<p>Hideki Izumi, Takehiko Kamijo, Yasuhiko Kaneko</p>	<p>第73回日本癌学会学術総会</p>	<p>2014</p>	<p>国内</p>
<p>Surgical Strategy for Mediastinal Neuroblastic Tumors in Children: a Single Institution Experience. (ポスター)</p>	<p>S Fumino, T Furukawa, S Aoi, K Higuchi, K Sakai, T Iehara, H Hosoi, T Tajiri.</p>	<p>Germany. (Advances in Neuroblastoma Research.)</p>	<p>2014 May 13-16 Koln,</p>	<p>国外</p>

<p>Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in rat models of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. (口頭)</p>	<p>K Sakai, O Kimura, T Furukawa, K Higuchi, J Wakao, K Kimura, S Fumino, S Aoi, K Masumoto, T Tajiri.</p>	<p>Canada. (The 47th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons.)</p>	<p>2014 May 24-29</p>	<p>国外</p>
<p>Validity and reliability of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from 2 territorial centers in Japan (ポスター)</p>	<p>S Fumino, K Kimura, T Iehara, M Nishimura S Nakamura R Souzaki, A Nishie, T Taguchi, H Hosoi, T Tajiri.</p>	<p>Tront, Canada. (46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology.)</p>	<p>2014 Oct 21-26</p>	<p>国外</p>
<p>THE NEW GUIDELINE FROM THE INTERNATIONAL NEUROBLASTOMA RISK GROUP (INRG) PROJECT HAS PROFOUND EFFECTS ON CLINICAL TRIALS WHICH EMPLOYED IMAGE DEFINED RISK FACTORS (ポスター)</p>	<p>A Yoneda, M Nishikawa, M Inoue, H Soh, Y Tazuke, H Yamanaka, M Nomura, K Deguchi, R Matsuura, M Fukuzawa. T Tajiri, T Iehara, A Nakagawara</p>	<p>Cologne, Germany (Advances in Neuroblastoma Research 2014)</p>	<p>5/13-16</p>	<p>国外</p>
<p>CHARACTERISTICS OF IMAGE DEFINED RISK FACTORS (IDRFs) IN PATIENTS ENROLLED THE LOW RISK PROTOCOL (JNB-L-10) FROM THE JAPAN NEUROBLASTOMA STUDY GROUP (JNBSG) (ポ</p>	<p>A. Yoneda, T. Tajiri, T. Iehara, M. Kitamura, A. Nakazawa, H. Takahashi, T. Takimoto, A.</p>	<p>Toronto, Canada (SIOP (46th))</p>	<p>10/22-25</p>	<p>国外</p>

スター)	Nakagawara			
Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. ポスター	富山新太、上北尚正、堺隆一	Advances in Neuroblastoma Research 2014	平成26年4月	国外
間質線維芽細胞との相互作用を標的としたスキルス胃癌治療薬の探索、口演	山口英樹、堺隆一	第23回日本がん転移学会学術集会	平成26年7月	国内
スキルス胃癌の浸潤・腹膜播種へのFGFシグナルの関与、ポスター	白木原琢哉、堺隆一	第23回日本がん転移学会学術集会	平成26年7月	国内
小細胞肺癌における足場非依存性増殖シグナルの解析、ポスター	上北尚正、堺隆一	第23回日本がん転移学会学術集会	平成26年7月	国内
Ras-ERKシグナルによるCDCP1発現誘導を介した癌の浸潤・転移機構、口演	上北尚正、堺隆一	第73回日本癌学会学術総会	平成26年9月	国内

がん細胞による浸潤突起形成の分子機構と転移における役割、口演	山口英樹、堺隆一	第73回日本癌学会学術総会	平成26年9月	国内
転移関連タンパク質 CDCP1の切断による分泌とその機能、ポスター	中島克彦、上北尚正、黒澤仁、堺隆一	第73回日本癌学会学術総会	平成26年9月	国内
新規 ALK 結合蛋白質である Flotillin-1 は、ALK の細胞膜結合の調整を介して ALK シグナルを制御する、口演	富山新太、上北尚正、山口英樹、上野英明、滝田順子、佐々木一樹、中川原章、森健太郎、堺隆一	第73回日本癌学会学術総会	平成26年9月	国内
スキルス胃がんの浸潤・腹膜播種への FGF シグナルの関与、ポスター	白木原琢哉、堺隆一	第73回日本癌学会学術総会	平成26年9月	国内
Regulation of oncogenic signaling in neuroblastoma through binding partners of anaplastic lymphoma kinase, 口演	堺隆一	第11回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス	平成26年11月	国内
Induction of aberrant DNA methylation by chronic inflammation, and its application to cancer risk diagnosis and prevention (口頭)	牛島俊和	Epigenetics in Development and Diseases Conference 9th Asian Epigenomics Meeting	August, 2014	国外

The RNA aptamer Against Midkine Suppresses neuroblastoma Xenograft Growth by Attenuating Midkine-Notch2 Pathway(口頭)	Kishida S, Kadomatsu K	ANR2014	2014	国外
Elucidation of mechanisms underlying fate determination of neuroblastoma in MYCN-Tg mice.(ポスター)	Tubota S, Kishida S, Kadomatsu K	ANR2014	2014	国外
Genome-wide analysis of T cell acute lymphoblastic leukemia with subsequent development of Langerhans cell histiocytosis. (ポスター)	Seki M, Kato M, Oyama R, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Arakawa Y, Kishimoto H, Miyano S, Oka A, Hanada R, Ogawa S, Koh K, Takita J	International Society of Paediatric Oncology (9th Biennial Childhood Leukemia Symposium)	April 28-29, 2014	国外
Genetic Landscapes of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. (口頭)	Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kato M, Hiwatari M, Sanada M, Hanada R, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J	Pediatric Academic Societies and Aisan Society for Pediatric Research (2014)	May 3-6, 2014	国外

Analysis for Neuroblastoma Tumors to Reveal Novel Target Using Next-Generation RNA Sequencing , (ポスター)	Hiwatari M, Seki M, Kato M, Yoshida K, Ogawa S, Takita J.	Advances in Neuroblastoma Research (2014),	May 13-16, 2014	国外
Genome-wide approach to identify gene targets of pancreatoblastoma. (ポスター)	Isobe T, Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Sato Y, Kato M, Hama A, Tanaka Y, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Oka A, Takita J.	46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology	October 22-25, 2014	国外
Integrated analyses of epigenetic regulatory genes in neuroblastoma. (口頭)	Hoshino N, Seki M, Yoshida K, Kato M, Nishimura R, Miyano S, Hayashi Y, Oka A, Iwanaka T, Ogawa S, Takita J.	46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology	October 22-25, 2014	国外
Genome-wide epigenetic and copy number analyses in rhabdomyosarcoma. (ポスター)	Seki M, Shimamura T, Yoshida K, Sato Y, Nishimura R, Kato M, Nagae G, Oka A, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J.	46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology	October 22-25, 2014	国外

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective study from the pediatric all working group of the JSHCT. (ポスター)	Kato M, Hasegawa D, Koh K, Inagaki J, Kato K, Goto H, Takita J, Yabe H, Sawada A, Atsuta Y, Kato K.	46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology	October 22-25, 2014	国外
The influences of school reentry support on relationships that adolescents with cancer share with peers and teachers. (ポスター)	Soejima T, Sato I, Takita J, Koh K, Maeda M, Ida K, Kamibeppu K.	46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology	October 22-25, 2014	国外
APC 遺伝子異常を有する肝芽腫再発の 1 例. (口頭)	眞下秀明, 塩澤亮輔, 渡邊健太郎, 加藤元博, 樋渡光輝, 藤代準, 滝田順子, 岩中督.	関東甲信越地区小児がん登録研究会	2014 年 3 月 21 日	国内
RNA シーケンス解析による横紋筋肉腫における新規転座の検索. (口頭)	関正史, 西村力, 吉田健一, 加藤元博, 樋渡光輝, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子, 岡明.	第 117 回日本小児科学会	平成 26 年 4 月 11 日 ~ 13 日	国内
次世代シーケンサを用いた横紋筋肉腫の遺伝子変異全体図. (口頭)	西村力, 吉田健一, 白石友一, 関正史, 真田昌, 岡明, 林泰秀, 宮野悟, 小川誠司, 滝田順子.	第 117 回日本小児科学会	平成 26 年 4 月 11 日 ~ 13 日	国内

全エクソーム解析を用いた肝芽腫における網羅的ゲノム解析。(口頭)	星野論子, 西村力, 関正史, 加藤元博, 吉田健一, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 岡明, 滝田順子	第117回日本小児科学会	平成26年4月11日~13日	国内
次世代シーケンサーを用いた神経芽腫における11q領域の責任遺伝子探索。(口頭)	吉田美沙, 関正史, 星野論子, 樋渡光輝, 加藤元博, 吉田健一, 小川誠司, 林泰秀, 滝田順子, 岡明.	第117回日本小児科学会	平成26年4月11日~13日	国内
神経芽腫120検体におけるゲノム異常と予後解析。(口頭)	瓜生久美子, 関正史, 加藤元博, 星野論子, 樋渡光輝, 中川原章, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子, 岡明	第117回日本小児科学会	平成26年4月11日~13日	国内
当院でのテイコプラニン標準投与における血中濃度解析。(ポスター)	塩澤亮輔, 渡邊健太郎, 樋渡光輝, 加藤元博, 滝田順子, 岡明.	第117回日本小児科学会	平成26年4月11日~13日	国内
再発を繰り返すランゲルハンス組織球症の1例(ポスター)	樋渡光輝, 渡邊健太郎, 塩澤亮輔, 加藤元博, 滝田順子, 岡明.	第117回日本小児科学会	平成26年4月11日~13日	国内
次世代シーケンサーによる小児胚細胞腫瘍の変異解析。(口頭)	塩澤亮輔, 関正史, 星野論子, 吉田健一, 吉田美沙, 瓜生久美子, 加藤元博, 小川誠司, 滝田順子, 岡	第73回日本癌学会学術総会,	平成26年9月25日~27日	国内

	明.			
神経芽腫大規模検体における genetic landscape と予後解析。(口頭)	瓜生久美子, 西村力, 吉田健一, 関正史, 星野論子, 吉田美沙, 加藤元博, 樋渡光輝, 林泰秀, 田尻達郎, 中川原章, 小川誠司, 滝田順子.	第73回日本癌学会学術総会,	平成26年9月25日~27日	国内
神経芽腫における11q領域に関連した責任遺伝子探索。(ポスター)	吉田美沙, 関正史, 加藤元博, 瓜生久美子, 星野論子, 西村力, 樋渡光輝, 吉田健一, 岡明, 小川誠司, 林泰秀, 滝田順子.	第73回日本癌学会学術総会,	平成26年9月25日~27日	国内
エクソーム解析とトランスクリプトーム解析を用いた肝芽腫における統合解析。(口頭)	星野論子, 関正史, 吉田健一, 加藤元博, 白石友一, 佐藤悠佑, 千葉健一, 宮野悟, 林泰秀, 岩中督, 岡明, 小川誠司, 滝田順子.	第73回日本癌学会学術総会,	平成26年9月25日~27日	国内
新規ALK結合蛋白質であるFlotillin-1は、ALKの細胞膜結合の調整節を介してALKシグナルを制御する(口頭)	富山新太, 上北尚正, 山口英樹, 上野英明, 滝田順子, 佐々木一樹, 中川原章, 森健太郎, 堺隆一.	第73回日本癌学会学術総会,	平成26年9月25日~27日	国内

胸膜肺芽腫における DICER1 RNase III B ドメイン変異の miRNA 産生への影響。(ポスター)	関正史, 吉田健一, 白石友一, 佐藤悠佑, 島村徹平, 千葉健一, 田中洋子, 花田良二, 岡明, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子.	第73回日本癌学会学術総会,	平成26年9月25日~27日	国内
Transcriptome profiling of neuroblastoma by RNA-Seq. (口頭)	Hiwatari M, Seki M, Shiozawa R, Kato M, Yoshida K, Ogawa S, Takita J.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会,	平成26年11月28日~30日	国内
Integrated analysis of clonal evolution in hepatoblastoma with familial adenomatous polyposis. (口頭)	Hoshino N, Seki M, Yoshida K, Kato M, Sato Y, Kasahara M, Nakazawa A, Miyano S, Hayashi Y, Oka A, Iwanaka T, Takita J.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会,	平成26年11月28日~30日	国内
Landscape of genomic alteration of pediatric germ cell tumors. (口頭)	Shiozawa R, Seki M, Hoshino N, Yoshida K, Yoshida M, Uryu K, Hiwatari M, Kato M, Ogawa S, Oka A, Takita J.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会,	平成26年11月28日~30日	国内

<p>Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular clusters in rhabdomyosarcoma. (口頭)</p>	<p>Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraishi Y, Sato Y, Hoshino N, Nagae G, Okuno Y, Hosoi H, Tanaka Y, Okita H, Taguchi T, Hanada R, Oka A, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会 学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>
<p>The role of epigenetic dysregulation in neuroblastoma. (口頭)</p>	<p>Hoshino N, Seki M, Yoshida K, Kato M, Nishimura R, Sato Y, Miyano S, Nagae G, Hayashi Y, Oka A, Aburatani H, Iwanaka T, Ogawa S, Takita J.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会 学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>
<p>中心静脈カテーテル関連血流感染 (CRBSI) の予防に対する試みとその効果. (口頭)</p>	<p>渡邊健太郎, 加藤元博, 張田豊, 関口昌央, 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 滝田順子, 岡明.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会 学術集会</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>

<p>再発腭芽腫のマルチサンプリングによる腫瘍内不均一およびクローン進化の考察。(口頭)</p>	<p>磯部知弥, 関正史, 吉田健一, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 佐藤悠佑, 加藤元博, 井口晶裕, 濱麻人, 田中祐吉, 宮野悟, 小川誠司, 岡明, 滝田順子.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>
<p>重篤な慢性心不全を合併した21トリソミー児のAMKLに対する緩和的化学療法。(口頭)</p>	<p>関口昌央, 加藤元博, 渡邊健太郎, 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 林泰佑, 平田陽一郎, 滝田順子, 岡明.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>
<p>神経芽腫におけるターゲット遺伝子の深々度シーケンス。(口頭)</p>	<p>瓜生久美子, 西村力, 吉田健一, 関正史, 星野論子, 吉田美沙, 加藤元博, 樋渡光輝, 岡明, 林泰秀, 田尻達郎, 中川原章, 滝田順子.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>
<p>神経芽腫におけるATM pathway 関連遺伝子の異常。(口頭)</p>	<p>吉田美沙, 関正史, 加藤元博, 瓜生久美子, 星野論子, 西村力, 樋渡光輝, 吉田健一, 岡明, 小川誠司, 林泰秀, 滝田順子.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>

<p>神経芽腫再発2例に対する網羅的ゲノム解析。(口頭)</p>	<p>物井綾香, 関正史, 吉田健一, 佐藤悠佑, 加藤元博, 樋渡光輝, 星野論子, 竹谷健, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 宮野悟, 岡明, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>
<p>先天性高悪性脳腫瘍の1例。(口頭)</p>	<p>木本豪, 加藤元博, 関口昌央, 渡邊健太郎, 塩澤亮輔, 樋渡光輝, 阿部浩幸, 田中麻理子, 武笠晃丈, 滝田順子, 岡明.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>
<p>慢性活動性EBV感染症の1倍検例。(ポスター)</p>	<p>塩澤亮輔, 樋渡光輝, 加藤元博, 田中淳, 滝田順子, 岡明.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>
<p>ALK陽性思春期神経芽腫に対するクリゾチニブの治療経験。(ポスター)</p>	<p>松野良介, 大貫裕太, 藤田祥央, 花村麻衣子, 塚田大樹, 秋山康介, 外山大輔, 池田祐一, 関正史, 加藤元博, 樋渡光輝, 滝田順子, 磯山恵一.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>
<p>小児がん化学療法に対する病棟薬剤師の取り組み。(ポスター)</p>	<p>清水啓道, 本多秀俊, 大野能之, 長瀬幸恵, 加藤元博, 樋渡光輝, 滝田順子, 岡明, 鈴木洋史.</p>	<p>第56回日本小児血液・がん学会学術集会,</p>	<p>平成26年11月28日~30日</p>	<p>国内</p>

未分化大細胞型リンパ腫におけるALK転座染色体の過剰を伴った急性転化． （ポスター）	星野顕宏，野村恵子，関正史，樋渡光輝，吉田健一，小川誠司，滝田順子，金兼弘和．	第56回日本小児血液・がん学会 学術集会，	平成26年11月28日～30日	国内
腎静脈浸潤を認めた先天性間葉芽腎腫の一例．（ポスター）	藤代準，杉山正彦，新井真理，石丸哲也，吉田真理子，魚谷千都恵，宮川亨平，加藤元博，滝田順子，土田晋也，高橋尚人，岩中督．	第56回日本小児血液・がん学会 学術集会，	平成26年11月28日～30日	国内
FGFR-1増幅を伴う治療抵抗性未分化肉腫の1例． （ポスター）	杉津晋平，合井久美子，渡邊敦，犬飼岳史，蓮田憲夫，高野邦夫，近藤哲夫，中澤温子，宮地充，細井創，滝田順子，後藤裕明，杉田莞爾．	第56回日本小児血液・がん学会 学術集会，	平成26年11月28日～30日	国内
Congenital and childhood plexiform (multinodular) cellular schwannoma の1乳児例．（ポスター）	宮川亨平，藤代準，高見尚平，加藤怜子，出家亨一，魚谷千都絵，吉田真理子，石丸哲也，新井真理，杉山正彦，岩中督，加藤元博，渡邊健太郎，滝田順子，柴原順二．	第56回日本小児血液・がん学会 学術集会，	平成26年11月28日～30日	国内
小児造血細胞移植後フォローアップ外来の取り組みと課題．（口頭）	岩崎美和，割田陽子，滝田順子，加藤元博，樋渡光輝，大友英子，宮	第56回日本小児血液・がん学会 学術集会，	平成26年11月28日～30日	国内

	里由香里.			
TSPAN2 is a factor responsible for promotion of invasion and metastasis in lung adenocarcinoma.ポスター発表	Makoto Miyazaki, Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari.	第37回日本分子生物学会年会 (横浜)	2014年11月25日	国内
TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion ポスター発表	Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Makoto Miyazaki, Yuko Hibiya, Fumio Tashiro, Masato Enari	第37回日本分子生物学会年会 (横浜)	2014年11月25日	国内
CD74-NRG1 はがん幹細胞性を促進する可能性のある腫瘍性タンパク質である ポスター発表	Tkahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsnori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh	第37回日本分子生物学会年会 (横浜)	2014年11月25日	国内

<p>Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma 口頭発表</p>	<p>Takashi Nakaoku, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Masato Enari, Hideaki Ogiwara, Hiroshi Nokihara, Hirokazu Okayama, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida, Takashi Kohno</p>	<p>第73回日本癌 学会学術総会 (横浜)</p>	<p>2014年9月26日</p>	<p>国内</p>
<p>CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties 口頭発表</p>	<p>Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, <u>Masato Enari</u>, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh</p>	<p>第73回日本癌 学会学術総会 (横浜)</p>	<p>2014年9月27日</p>	<p>国内</p>
<p>INACTIVATION OF P53 PATHWAY IN ALK FUSION-POSITIVE TUMORS THROUGH DIRECT TYROSINE PHOSPHORYLATION OF P53 ポスター発表</p>	<p>Masato Enari</p>	<p>the 16th International p53 Workshop (sweden)</p>	<p>2014年6月16日</p>	<p>国外</p>

<p>Genome-based sub-classification of neuroblastoma:A retrospective study by using 573 neuroblastoma samples obtained in Japan</p>	<p>Ohira M, Kamiyo T, Nakamura Y, Takimoto T, Nakagawa A, Takita J, Iehara T, Takahashi H, Tajiri T, Nakagawara A: Japan Neuroblastoma Study Group.</p>	<p>Advances in Neuroblastoma Research Congress ドイツ・ケルン</p>	<p>2014/5/15</p>	<p>国外</p>
<p>神経芽腫難治性サブタイプの網羅的ゲノム解析による予後関連ゲノム異常の検索</p>	<p>大平美紀, 辰野健二, 堤 修一, 山本尚吾, 中村洋子, 上條岳彦, 油谷浩幸, 中川原 章:</p>	<p>第 56 回日本小児血液・がん学会 学術集会 岡山</p>	<p>2014/11/30</p>	<p>国内</p>

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
Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway.	Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T(corresponding author).	Eur J Cancer.	2014	国外
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 Lett.	2014	国外
Receptor-type protein tyrosine phosphatase k (PTPRK) directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation.	Shimozato O, Waraya M, Nakashima K, Souda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N,	Oncogene	2014 Jun 2. doi: 10.1038/onc.2014.141. [Epub ahead of print].	国外

	Nakagawara A, Ozaki T, Kamijo T(corresponding author).			
Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers.	Sun Y, Furihata T, Ishii S, Nagai M, Harada M, Shimozato O, Kamijo T, Motohashi S, Yoshino I, Kamiichi A, Kobayashi K, Chiba K.	Clin Transl Med.	2014 Nov 18;3:37. doi: 10.1186/s40169-014-0037-y. eCollection 2014.	国外
肝芽腫の診断と治療	上條岳彦、檜山英三	「最新肝癌学」	2014	国内
小児固形腫瘍のがん幹細胞	上條岳彦	小児外科、47 巻 第 2 号 123-128	2015	国内

<p>Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma</p>	<p>Janette M, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K</p>	<p>BioMed Cancer</p>	<p>2014</p>	<p>国内</p>
<p>日本小児外科学会悪性腫瘍委員会:小児の外科的悪性腫瘍, 2012年登録症例の全国集計結果の報告</p>	<p>米倉竹夫、田尻達郎、伊勢一哉、小野 滋、大植孝治、佐藤智行、杉藤公信、菱木知郎、平井みさ子、文野誠久、本多昌平、風間理郎、杉山正彦、中田光政、仲谷健吾、脇坂宗親、近藤知史、上原秀一郎、鬼武美幸、木下義晶</p>	<p>日小外会誌</p>	<p>2014</p>	<p>国内</p>

Efficacy of preoperative transcatheter arterial chemoembolization combined with systemic chemotherapy for treatment of unresectable hepatoblastoma in children	M Hirakawa,A Nishie,Y Asayama,N Fujita,K Ishigami,T Tajir,T Taguchi,H Honda.	Jpn J Radiol	2014	国外
Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in a rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia.	K Sakai, O Kimura, T Furukawa,S Fumino, K Higuchi,J Wakao,K Kimura,S Aoi,K Masumoto, T Tajiri	J Pediatr Surg	2014	国外
腹部腫瘍により発見された Herlyn-Werner-Wunderlich 症候群の 1 例	竹内雄毅、樋口恒司、坂井宏平、文野誠久、青井重善、古川泰三、木村修、田尻達郎	日本小児外科学雑誌	2014	国内
胸壁悪性軟部肉腫に対する肋骨合併切除・胸郭再建術	樋口恒司、木村修、古川泰三、文野誠久、青井重善、坂井宏平、土屋邦彦、家原知子、細井創、田尻達郎	小児外科	2014	国内

腸間膜リンパ管腫切除術	文野誠久、金聖和、坂井宏平、樋口恒司、青井重善、古川泰三、木村修、田尻達郎	小児外科	2014	国内
胆汁うっ滞 先天性胆道拡張症	文野誠久、加藤久尚、樋口恒司、出口英一、田尻達郎	周産期医学	2014	国内
膵・胆管合流異常の診断の最前線：膵・胆管合流異常における DIC-CT の診断意義	文野誠久、坂井宏平、東真弓、青井重善、古川泰三、田尻達郎	胆と膵	2014	国内
第 11 節 小児固形悪性腫瘍における遺伝子解析による悪性度診断と遺伝子治療 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発	田尻達郎	遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発	2014	国内
QOL を重視した小児外科医療の進歩	田尻達郎	京都小児科医学会報	2014	国内
小児外科医療の進歩～QOL 向上を目指して～	田尻達郎	京都小児科医学会報	2014	国内
Two Cases of Neuroblastoma Comprising Two Distinct Clones.	Yamazaki F, Nakazawa A, Osumi T, Shimojima N, Tanaka T, Nakagawara	Pediatric Blood Cancer.	2014	国外

	A, Shimada H.			
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.	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 et al.	Cancer Res.	2014	国外
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,	PLoS Genet.	2014	国外

	Haraguchi S, Takatori A, Nakagawara A.			
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, Shimajima N, Tanaka T, Nakagawara A, Shimada	Pediatr. Blood Cancer.	2014	国外

	H.			
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 in neuroblastoma tumorigenesis depending on the	Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y.	Cancer Letters.	2014	国外

ploidy status and age of patients.				
Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association.	Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A et al.	Cancer Res.	2014	国外
Receptor-type protein tyrosine phosphatase directly 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

<p>Revised risk estimation and treatment stratification of low- and intermediate-risk neuroblastoma patients by integrating clinical and molecular prognostic markers.</p>	<p>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</p>	<p>Clin. Cancer Res. 2014</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
--	---	-------------------------------	-------------	-----------

	F, Brors B, Fischer M.			
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

Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults. A report from the International Neuroblastoma Risk Group Project.	Mosse YP, Deyell RJ, Berthold F, Nakagawara A, Ambros PF, Monclair T, Cohn SL, Pearson AD, London WB, Matthay KK.	Pediatr. Blood Cancer.	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	2015	国外
Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells.	Yamaguchi H, Yoshida H, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M, Sakai R	Cancer Sci	平成 26 年 1 月	国外
Saracatinib imparis the peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells resistant to Met and FGFR inhibitors.	Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K, Sakai R	PlosOne	平成 26 年 5 月	国外

Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association.	Tomiyama A,Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K,Yamaguchi H, Sakai R	Cancer Res	平成 2 6 年 7 月	国外
Oncogenic Ras/ERK signaling activates CDCP1 to promote tumor invasion and metastasis.	Uekita t.Fujii S, Miyazawa Y, Iwakawa R, Narisawa-Sai to M,Nakashima K, Tsuta K,Tsuda H,Kiyono T,Yokota J,Sakai R	Mol Cancer Res	平成 2 6 年 1 0 月	国外
Identification of co-existence of DNA methylation and H3K27me3 specifically in cancer cells as a promising target for epigenetic therapy	Takeshima H, Wakabayashi M, Hattori N, Yamashita S and Ushijima T.	Carcinogenesis	4-Dec-14	国外
Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer	Hattori N and Ushijima T.	Biochem biophys Res Commun	4-Sep-14	国外

Cancer epigenetics: Now harvesting fruit and seeding for common diseases	Ushijima T.	Biochem Biophys Res Commun	5-Dec-14	国外
Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies	Kiyonari S, Kadomatsu K	Expert Opin Drug Discov.10(1):53-62	2015	国外
The nucleolar protein PES1 is a marker of neuroblastoma outcome and is associated with neuroblastoma differentiation.	Nakaguro M, Kiyonari S, Kishida S, Cao D, Murakami-To nami Y, Ichikawa H, Takeuchi I, Nakamura S, Kadomatsu K.	Cancer Sci.	2014	国外
Inactivation of SMC2 shows a synergistic lethal response in MYCN-amplified neuroblastoma cells.	Murakami-To nami Y, Kishida S, Takeuchi I, Katou Y, Maris JM, Ichikawa H, Kondo Y, Sekido Y, Shirahige K, Murakami H, Kadomatsu K	Cell Cycle,13(7):1115-31	2014	国外
A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary	Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, Kadomatsu K	PLoS One. 9(1):e86813	2014	国外

neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model.				
Involvement of midkine in neuroblastoma tumourigenesis.	Kishida S, Kadomatsu K.	Br J Pharmacol. 171(4):896-904,	2014	国外
Midkine: an emerging target of drug development for treatment of multiple diseases	Muramatsu T, Kadomatsu K	Br J Pharmacol.171(4):811-3	2014	国外
Therapeutic potential of midkine in cardiovascular disease	Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P	Br J Pharmacol. 171(4):936-44	2014	国外
Aggressive transformation of anaplastic large cell lymphoma with increased number of ALK-translocated chromosomes.	Hoshino A, Nomura K, Hamashima T, Isobe T, Seki M, Hiwatari M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Kanegane H.	Int J Hematol. 101:198-202	2015	国外

<p>Early use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with MLL gene-rearrangement-positive acute lymphoblastic leukemia.</p>	<p>Koh K, Tomizawa D, Moriya Saito A, Watanabe T, Miyamura T, Hirayama M, Takahashi Y, Ogawa A, Kato K, Sugita K, Sato T, Deguchi T, Hayashi Y, Takita J, Takeshita Y, Tsurusawa M, Horibe K, Mizutani S, Ishii E.</p>	<p>Leukemia. 29:290-6</p>	<p>2015</p>	<p>国外</p>
<p>Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for infant acute lymphoblastic leukaemia with KMT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the paediatric acute lymphoblastic leukaemia working group of the Japan Society for Haematopoietic Cell Transplantation.</p>	<p>Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J, Yabe H, Goto H, Adachi S, Hayakawa A, Takeshita Y, Sawada A, Atsuta Y, Kato K.</p>	<p>Br J Haematol. 168:564-70.</p>	<p>2015</p>	<p>国外</p>

Identification of a homozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapsed early T-cell precursor ALL patient.	Kawashima-Goto S, Imamura T, Seki M, Kato M, Yoshida K, Sugimoto A, Kaneda D, Fujiki A, Miyachi M, Nakatani T, Osone S, Ishida H, Taki T, Takita J, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Hosoi H.	Int J Hematol.	2014 Nov 28. [Epub ahead of print]	国外
Cyclic fluctuation of blood pressure in neonatal neuroblastoma.	Fujishiro J, Sugiyama M, Ishimaru T, Uotani C, Tsuchida S, Takahashi N, Shiozawa R, Takita J, Iwanaka T.	Pediatr Int. 56:934-7	2014	国外
Systemic lupus erythematosus complicated with liver cirrhosis in a patient with Papillon-Lefèvre syndrome.	Yasudo H, Ando T, Takeuchi M, Nakano H, Itonaga T, Takehara H, Isojima T, Miura K,	Lupus. 23:1523-7	2014	国外

	Harita Y, Takita J, Oka A.			
Prognostic significance of leukopenia in childhood acute lymphoblastic leukemia.	Shiozawa Y, Takita J, Kato M, Sotomatsu M, Koh K, Ida K, Hayashi Y.	Oncol Lett. 7:1169-74	2014	国外
Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia with Unusual Multiple Bone Invasions: A case report.	Hangai M, Watanabe K, Shiozawa R, Hiwatari M, Ida K, Takita J.	Oncol Lett. 7:991-3	2014	国外
Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association.	Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R.	Cancer Res. 15:74:3790-801	2014	国外

<p>Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma.</p>	<p>Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, Kato M, Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J.</p>	<p>Cancer Res. 2014; 74:2742-9</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>
<p>Genome-wide approach to identify second gene targets for malignant rhabdoid tumors using high-density oligonucleotide microarrays.</p>	<p>Takita J, Chen Y, Kato M, Ohki K, Sato Y, Ohta S, Sugita K, Nishimura R, Hoshino N, Seki M, Sanada M, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S.</p>	<p>Cancer Sci. 2014; 105:258-64</p>	<p>2014</p>	<p>国外</p>

Japanese Dent disease has a wider clinical spectrum than Dent disease in Europe/USA: genetic and clinical studies of 86 unrelated patients with low-molecular-weight proteinuria.	Sekine T, Komoda F, Miura K, Takita J, Shimadzu M, Matsuyama T, Ashida A, Igarashi T.	Nephrol Dial Transplant. 29:376-84.	2014	国外
The effect of the order of total body irradiation and chemotherapy on graft-versus-host disease.	Kato M, Shiozawa R, Koh K, Nagatoshi Y, Takita J, Ida K, Kikuchi A, Hanada R.	J Pediatr Hematol Oncol. 36:e9-12	2014	国外
Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth.	Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S.	J Pediatr Hematol Oncol. 36:166-8	2014	国外
小児の臨床検査 小児の遺伝子・染色体検査(解説)	滝田 順子	検査と技術 (0301-2611)43巻 1号 Page58-62	2015	国内

【ビジュアル小児外科疾患のフォローアップ・プログラム-手術直後から遠隔期の問題点まで】 神経芽腫(解説/特集)	滝田 順子	小 児 外 科 (0385-6313)46巻 11 号 Page1159-63	2014	国内
高用量シクロフォスファミドによる HLA 一致同胞間骨髄幹細胞移植後に致死的心毒性をきたした一例(原著論文/症例報告)	渡邊 健太郎, 加藤 元博, 田中 淳, 中井 まりえ, 関 正史, 林 泰佑, 塩澤 亮輔, 樋渡 光輝, 吉田 健一, 小川 誠司, 松坂 恵介, 深山 正久, 滝田 順子, 岡明.	日本造血細胞移植学会雑誌 3 巻 4 号 Page120-3	2014	国内
次世代シーケンサーによる小児血液、腫瘍疾患における研究の進展 小児固形腫瘍における治療標的の探索(解説)	滝田 順子	日本小児血液・がん学会雑誌 (2187-011X)51 巻 3 号 Page278-84	2014	国内
【小児の治療指針】血液・腫瘍 悪性リンパ腫(解説/特集).	滝田 順子	小 児 科 診 療 (0386-9806)77巻 増刊 Page486-8	2014	国内
【急性リンパ性白血病(ALL)】 小児 ALL の予後因子と治療(解説/特集)	滝田 順子	血 液 内 科 (2185-582X)68 巻 2 号 Page203-9	2014	国内
急性リンパ性白血病に対するゲノム解析の成果	滝田 順子	血 液 内 科 . 69:713-9	2014	国内

急性リンパ性白血病 (ALL).	滝田 順子	血液フロンティア 24:55-63	2014	国内
神経芽腫の次世代シ-ンサーによる解析.	滝田 順子	小児外科 47:145-9	2015	国内
TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion	Ryo otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Matsushima-Hibiya, Makoto Miyazaki, Fumio Tashiro, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Takahiro Ohiya, Uun Yokota, Hitoshi Nakagawa, Yoichi Taya, and Masato Enari	Proseedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	2014 Dec 30:111(52):18691-18696	国外

<p>Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma</p>	<p>Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Hitoshi Ichikawa, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, <u>Masato Enari</u>, Koh Furuta, Yoko Shimada, Hideaki Ogiwara, Shunichi Watanabe, Hiroshi Nokihara, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nammo, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Curtis C. Harris, Young Hak Kim, Michiaki Mishima, Jun Yokota, Teruhiko Yoshida and Takashi</p>	<p>Clinical Cancer Reserch</p>	<p>2014 Jun 15:20(12):3087-309 3</p>	<p>国外</p>
--	--	------------------------------------	--	-----------

	Kohno			
TSPAN2 is Involved in cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression	Chihiro Otsubo, Ryo Otomo, Makoto Miyazaki, Yuko Matsushima-Hibiya, Takashi Kohno, Reika Iwakawa, Fumitaka Takeshita, Hirokazu Okayama, Hitoshi Ichikawa, Hideyuki	Cell Reports	2014 Apr 24:7(2):527-538	国外

	Saya, Tohru Kiyono, Takahiro Ochiya, Fumio Tashiro, Hitoshi Nakagama, Jun Yokota, and Masato Enari			
Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association.	Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R.	Cancer Res. 74(14):3790-801, 2014	2014/5/15	国外

<p>Revised risk estimation and treatment stratification of low- and intermediate-risk neuroblastoma patients by integrating clinical and molecular prognostic markers.</p>	<p>Oberthuer A, Juraeva D, Hero B, Volland R, Sterz C, Schmidt R, Faldum A, Kahlert Y, Engesser A, Asgharzadeh S, Seeger R, Ohira M, Nakagawara A, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Bénard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Grundy RG, Orthmann M, Shao C, Schwab M, Eils R, Simon T, Theissen J, Berthold F, Westermann</p>	<p>Clin. Cancer Res., in press</p>	<p>2014/9/17</p>	<p>国外</p>
--	--	------------------------------------	------------------	-----------

	F, Brors B, Fischer M.			
--	---------------------------	--	--	--