

16 - 17 神経芽腫進展の分子機構に基づく診断・治療法の確立

主任研究者 千葉県がんセンター 中川原 章

研究成果の要旨

生後6ヶ月時に行われていた神経芽腫マスキングが休止となり、自然退縮傾向を有する乳児神経芽腫が激減した反面、難治性神経芽腫の予後は依然として30%と極めて不良である。この難治性神経芽腫の予後を改善すべく、我々は神経芽腫組織バンクの基盤整備を行い、遺伝子診断および中央病理診断の基盤作りを行った。また、DNAチップによる網羅的遺伝子発現解析を行い、予後を分ける遺伝子を多数同定するとともに、少数遺伝子のみによる予後予測のための実用化チップを開発し、その臨床試験を開始した。あわせて、神経芽腫の悪性度に影響を与える重要遺伝子の機能解析を行い、それらの機能を明らかにするとともに、それらを分子標的とした治療法の開発も視野に入れた検討を行った。さらに、神経芽腫に対する新しい遺伝子治療の可能性についても検討した。このように、神経芽腫のトランスレーショナルリサーチの基盤を確立し、新しくスタートする全国統一の神経芽腫グループスタディと連携してよりよい治療法の確立を目指す。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名
中川原 章	千葉県がんセンター・研究所・所長
堺 隆一	国立がんセンター研究所・細胞増殖因子研究部・部長
門松 健治	名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座分子生物学・教授
市川 仁	国立がんセンター研究所・腫瘍発現解析プロジェクト・プロジェクトリーダー
檜山 英三	広島大学自然科学研究支援開発センター・教授
大喜多 肇	国立成育医療センター研究所、発生・分化研究部、機能分化研究室・室長

総括研究報告

1 研究目的

小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度の高い腫瘍のひとつである神経芽腫は、生後6ヶ月時のマスキリーニ

ングが休止した現在、進行例が多く、その予後は今なお不良である。この難治性神経芽腫の予後を改善するためには、基礎的な基盤研究を充実させ、新しい研究成果に基づいた正確な診断と予後予測、そして新しい治療法の開発が緊急の課題である。そこで、本研究では、1) 腫瘍バンクの連携と病理組織分類の再評価によって正確な組織診断情報を提供できる体制を作る。2) 正しい臨床病理情報に基づき、遺伝子や蛋白質レベルでの発現解析を行うとともに予後決定に関わる因子を解析し、分子レベルでの新しい予後診断を確立する。3) 転写調節やシグナル伝達の面から神経芽腫進展を制御する分子メカニズムを明らかにすることにより、病態に基づいた新しい治療法を開発する。4) 難治性神経芽腫に対する遺伝子治療法を開発する。以上の4つを目的とした。本研究により、従来の国内における神経芽腫研究の基盤となる腫瘍組織の供給法を見直し、遺伝子・蛋白質・病理レベルでの総合的な情報交換をすることによって、これらの情報が有機的に統合された診断システムの確立と分子病態に基づいた画期的な新しい治療法の開発が可能になるものと期待される。

分担研究課題

16・17 神経芽腫進展の分子機構に基づく診断・治療法の確立

神経芽腫の予後に関わる遺伝子の同定とその臨床応用に関する研究

神経芽腫進展のシグナル伝達の解析

神経芽腫の遺伝子治療法開発

マイクロアレイを用いた神経芽腫の予後に関わる遺伝子の解析

遺伝子診断、組織バンクの確立と新しい診断法の開発

神経芽腫の新しい分子病理診断法の開発

2 研究成果

(1) 神経芽腫組織バンクの確立と病理診断および遺伝子診断体制の強化

我が国における神経芽腫のトランスレーショナルリサーチ研究の基盤を確立するため、主任研究者の中川原は、神経芽腫組織バンクと遺伝子診断を行う体制を整備した。すなわち、各小児医療施設において手術摘出された神経芽腫組織から DNA, RNA を抽出し、重要な予後予測因子である *MYCN* がん遺伝子増幅、DNA 核型、*TrkA* 遺伝子発現など、分子生物学的予後因子の検査を行うとともに、平成 16 年度には、血清中 Midkine 値の定量検査を加えた。また、分担研究者の檜山も、西日本地区を対象に同様の組織バンクと遺伝子診断システムを作り、*MYCN* 遺伝子増幅、染色体増減、DNA 核型等の検査体制を確立した。また、分担研究者の大喜多は、中央病理診断を行うためのシステム作りを行い、国際神経芽腫病理診断 (INPC) を我が国に導入・定着させるための準備を行った。さらに、スタンプ標本やホルマリン固定パラフィン切片を用いた fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により神経芽腫の染色体異常を安定的に検出する方法の確立を試みた。これらの神経芽腫診断体制の確立は、現在進められている全国統一神経芽腫グループスタディの骨格を強固にし、それを支えていく重要な基盤となるものと期待される。

(2) 神経芽腫の網羅的発現解析と診断チップの臨床応用の試み

主任研究者の中川原は、神経芽腫組織より抽出した 5,300 個の cDNA をマイクロアレイ化し、約 140 例の神経芽腫に由来する RNA をハイブリダイズさせ、予後に関わる遺伝子の抽出を行った。さらに、実用化チップを開発するために、上位にランクされた 200 個の遺伝子のみを搭載したミニチップを開発し、臨床試験の段階にまで到達した。一方、分担研究者の市川は、Affymetrix 社の HG-U133A マイクロアレイ (22,215 probe sets) を用いて 59 症例の神経芽腫臨床検体のマイクロアレイ解析を

行った。その結果、1) 予後良好腫瘍と予後不良腫瘍の間で大きく遺伝子発現が異なり、予後不良腫瘍においては神経内分泌細胞への分化が強く抑制されていること、2) 予後不良腫瘍のなかでは、*MYCN* 遺伝子増幅のある腫瘍とない腫瘍の間の遺伝子発現の差は極めて小さく、*MYCN* 自身を含む一部の遺伝子に限られること、3) *MYCN* 遺伝子増幅のない予後不良腫瘍においても、Myc 転写因子群の標的遺伝子の高発現が見られること等を明らかにした。また、*MYCN* の発現を強く抑制できる siRNA を作製し、新しい治療法の開発研究も試みた。分担研究者の檜山は、48 例の神経芽腫を対象に、SNPs アレイを用いた網羅的検索を行った。これら DNA チップを用いた神経芽腫の予後予測システムの開発は、今後より一層国際的にも競争の激しい領域になることが予想される。

(3) 神経芽腫進展を制御する分子メカニズムの解明と治療の分子標的の検索

分担研究者の堺は、神経芽腫の生物学的特性を制御する一連のシグナル分子の機能解析に引き続き、変異を加えた ShcC を作製して、神経芽腫培養細胞における ShcC の機能的役割をさらに深く解析した。その結果、ALK-ShcC を介する pathway がこうした腫瘍細胞の細胞周期の進行に関与していることが示唆された。現在、さらに SH2 結合分子を詳細により解析することにより、この腫瘍抑制作用のメカニズムを解明しようと試みている。また、主任研究者の中川原は、神経芽腫細胞株の 1 番染色体短腕 1p36.2 のホモ欠失領域より発見された新規がん抑制候補遺伝子 *KIF1B* の機能的解析を行った。アデノウイルスベクターを用いて細胞内遺伝子導入したところ、*KIF1B-β* を過剰発現した細胞は分裂期においてのみ細胞死を起こした。また、アンチセンスによりその発現を恒常的に抑制した SH-SY5Y 細胞は、ヌードマウスに巨大な腫瘍を形成した。したがって、*KIF1B-β* は機能的ながん抑制遺伝子であることが明らかとなった。さらに、予後良好な神経芽腫において高発現する新規遺伝子として同定した *BMCC1* は、COOH-端に BCH ドメインを有し、機能的に GAP 活性を有することが明らかになった。また、CDC42 と物理的に結合し、その機能を抑制した。さらに、*BMCC1* は *TrkA* 受容体の活性化によりリン酸化を受け、そのシグナルを細胞骨格系へ送る役割を担っているものと思われる。したがって、*BMCC1* は、神経芽腫細胞の増殖、分化、細胞死を制御する重要な分子であり、これを標的とすることで、新しい治療法が開発が可能になるものと考えられた。

(4) 難治性神経芽腫に対する遺伝子治療法の開発

16・17 神経芽腫進展の分子機構に基づく診断・治療法の確立

分担研究者の門松は、神経芽腫細胞に高発現するミッドカイン (MK) を治療の分子標的と設定し、MK がエンドサイトーシス後に細胞質へ何らかの機構で確かに移行すること、そして細胞質あるいは核へ移行した MK がプロテアゾームによって分解されることを明らかにした。また、治療法の開発として、MK に対するモルフォリノ骨格のアンチセンスが安定性・安全性に優れ、治療効果があることを明らかにした。一方、siRNA を用いた癌治療を目指し、VEGF siRNA を局所投与したところ、ヒト前立腺癌細胞のヌードマウス皮下腫瘍に対する著しい抑制効果が得られた。VEGF siRNA の抗腫瘍効果は血管新生抑制によるものであった。これらの試みは、小児がんの中でも最も難治性である神経芽腫の克服へ向けて極めて重要な役割を担うものと期待される。

3 倫理面への配慮

1) 研究目的のみの検体の使用については、各施設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 (2001 年 3 月)」を順守することを条件に承認される。

2) 動物実験は各所属施設の定める動物実験倫理規定に従って、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をとまなう実験への十分な配慮のもとに、慎重に進める。

3) ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) は取り扱わない。

研究成果の刊行発表

外国語論文

(主任研究者：中川原 章)

1. Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. In *NGF and Related Molecules in Health and Disease*, Ed. By Luigi Aloe and Laura Calza, Progress in Brain Research Vol. 146, 2004, Elsevier Science Publisher, pp233-242.
2. Nakagawara A, Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue: Neural development and cancer. *Cancer Lett.* 204:23-224, 2004.
3. Miyazaki K, Nakagawara A., et al. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 11327-11335, 2004.
4. Hamano S, Nakagawara A., et al. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of *Nbla10449/hNLRR-1* and *Nbla10677/hNLRR-3* with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int. J. Oncol.* 24:1457-1466, 2004
5. Ohtori S, Nakagawara A., et al. Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene abrrative in neuroblastoma. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:504-514, 2004.
6. Wang YQ, Nakagawara A., et al. Elevated expression of DNA polymerase k in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.* 25:161-165, 2004.
7. Ando K, Nakagawara A., et al. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:25549-25561. 2004.
8. Hiyama E, Nakagawara A., et al. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 91:972-979, 2004.
9. Yamada S, Nakagawara A., et al. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the *Plk1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 23:5901-5911, 2004.
10. Takahashi M, Nakagawara A., et al. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene

16・17 神経芽腫進展の分子機構に基づく診断・治療法の確立

- ING1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. **Oncol Rep.** 12:811-816, 2004.
11. Kato C, Nakagawara A., et al. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. **Int. J. Cancer** 112:365-375, 2004.
 12. Nakagawara A. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In **Neuroblastoma**, Eds. S. Cohn & N-K. Cheung, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg. (in press)
 13. Kramer S, Nakagawara A., et al. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. **Oncogene** 24:938-944, 2005
 14. Abe M, Nakagawara A., et al. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. **Cancer Res.** 65:828-834, 2005
 15. Ohira M, Nakagawara A., et al. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. **Cancer Lett.** (in press)
 16. Lin L, Nakagawara A., et al. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. **Oncogene** (in press)
 17. Ozaki T, Nakagawara A., et al. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. **Cancer Lett.** (in press)
 18. Ohira M, Nakagawara A., et al. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. **Cancer Cell** (in press)
 19. Hanamoto T, Nakagawara A., et al. Identification of protein kinase A catalytic subunit (PKA-C) as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. **J. Biol. Chem.** (in press)
 20. Aoyama M, Nakagawara A., et al. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. **Cancer Res.** (in press)
 21. Chen H, Nakagawara A., et al. Aberrant methylation of *FBN2* correlates with progression of human non-small cell lung cancer. **Lung Cancer** (in press)
 22. Chen H, Nakagawara A., et al. Aberrant methylation of *RASGRF2* and *RASSF1A* in human non-small cell lung cancer. **Oncol. Rep.** (in press)
- (分担研究者：門松健治)
1. Yu, L., Kadomatsu, K., et al. Insertion of an exogenous promoter in the E1A regulatory region of adenovirus does not disturb viral replication despite reduced E1A transcription. **Cancer Lett.** 203, 51-57 (2004).
 2. Kobayashi, H., Kadomatsu, K., et al. Tissue distribution of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during mouse pregnancy. **J. Histochem. Cytochem.** 52, 113-22 (2004).
 3. Kobayashi, H., Kadomatsu, K., et al. Expression of glucose transporter 4 (GLUT4) in the human pancreatic islet of Langerhans. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 314, 1121-1125 (2004).
 4. Kuno, N., Kadomatsu, K., et al. Ovarian mature cystic teratoma with a highly differentiated homunculus: a case report. **Birth Defect Res. Part A Clin. Mol. Teratol.** 70, 40-46 (2004).
 5. Suzuki, N., Kadomatsu, K., et al. Proteasomal degradation of the nuclear targeting growth factor midkine. **J. Biol. Chem.** 279, 17785-17791 (2004).
 6. Chang, H., Kadomatsu, K., et al. Basigin expression and regulation in mouse ovary during the sexual maturation and development of corpus luteum. **Mol. Reprod. Dev.** 68, 135-141 (2004).
 7. Yu, L., Kadomatsu, K., et al. Midkine promoter-driven suicide gene expression and -mediated adenovirus replication produced cytotoxic effects to immortalised and tumour cells. **Eur J Cancer.** 40, 1787-1794 (2004).
 8. Uchimura, K., Kadomatsu, K., et al. N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 regulates expression of L-selectin ligands and lymphocyte homing. **J. Biol. Chem.** 279, 35001-35008 (2004).
 9. Takei, Y., Kadomatsu, K., et al. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. **Cancer Res.** 64, 3365-3370 (2004).
 10. Yu, L., Kadomatsu, K., et al. Midkine promoter can mediate transcriptional activation of a fused suicide gene in a broader range of human breast cancer compared with c-erbB-2 promoter. **Oncology** 66,143-149 (2004).
 11. Kawai, H., Kadomatsu, K., et al. Lack of the growth factor midkine enhances survival against cisplatin-induced renal damage. **Am. J. Pathol.** 165, 1603-1612 (2004).
 12. Chen, S., Kadomatsu, K.*, et al. Effects of flanking genes on the phenotypes of mice deficient in basigin/CD147. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 324, 147-153 (2004). (*, corresponding author)
 13. Sakakima, H., Kadomatsu, K., et al. (2004) Midkine expression in rat spinal motor neurons following sciatic nerve injury. **Brain Res. Dev. Brain Res.** 153, 251-260.
 14. Sato, W., Kadomatsu, K.*, et al. Midkine antisense oligodeoxynucleotide inhibits renal damage induced by ischemic reperfusion **Kidney Int.** 67, 1330-1339

16・17 神経芽腫進展の分子機構に基づく診断・治療法の確立

(2005). (*, corresponding author)

15. Takei, Y., Kadomatsu, K., et al. Morpholino Antisense Oligomer Targeting Human Midkine: Its Application for Cancer Therapy. **Int. J. Cancer** 114, 490-497 (2005).
16. Hayashi, K., Kadomatsu, K.*, et al. Antisense oligodeoxyribonucleotide as to the growth factor midkine suppresses neointima formation induced by balloon Injury. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** in press. (*, corresponding author)
17. Takada, J., Kadomatsu, K., et al. Postischemic gene transfer of midkine, a neurotrophic factor, protects against focal brain ischemia. **Gene Ther.** 12, 487-493 (2005)

(分担研究者：堺 隆一)

1. Tanaka, M., Sakai, R., et al. Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. **EMBO J** 23, 1075-1088, 2004
2. Azuma, K., Sakai, R., et al. Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane. **FEBS Lett.** 577, 339-344, 2004
3. Miyamoto, Y., Sakai, R., et al. Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. **J. Neurosci.** 25, 1826-1835, 2005
4. Miyake, I., Sakai, R., et al. Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. **Oncogene** 2005 in press
5. Azuma, K., Sakai, R., et al. Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. **Oncogene** 2005 in press
6. Osajima-Hakomori, Y., Sakai, R., et al. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. **Am. J. Pathol.** 2005 in press

(分担研究者：市川 仁)

1. Inoue, S., Ichikawa, H., et al. (2004): Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. **J. Biol. Chem.** 279, 38701-38709.
2. Alexander, D. B., Ichikawa, H., et al. (2004): Normal cells control the growth of neighboring transformed cells independent of gap junctional communication and Src activity. **Cancer Res.** 64, 1347-1358.
3. Yasuda, J., Ichikawa, H., et al. (2004): Nemo-like kinase suppresses a wide range of transcription factors, including nuclear factor- κ B. **Cancer Sci.** 95, 52-57.

(分担研究者：檜山英三)

1. Hiyama, E., et al. Telomerase detection in the diagnosis

and prognosis of cancer. *Cytotechnology*, in press.

2. Hiyama, E., et al. Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. **Pediatr Surg Int**, 20, 33-38, 2004.
3. Hiyama, E., et al. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. **Br J Cancer**, 91: 972-979, 2004.
4. Yokoo, S., Hiyama, E., et al. Slow-down of age-dependent telomere shortening is executed in human skin keratinocytes by hormesis-like-effects of trace hydrogen peroxide or by anti-oxidative effects of pro-vitamin C in common concurrently with reduction of intracellular oxidative stress. **J Cell Biochem**, 93: 588-597, 2004.
5. Yamada, S., Hiyama, E., et al. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas the corresponding normal livers: identification of high expression of the PLK1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. **Oncogene**, 23: 5901-5911, 2004.
6. Kumazaki, T., Hiyama, E., et al. Differential gene expressions during immortalization of normal human fibroblasts and endothelial cells transfected with human telomerase reverse transcriptase gene. **Int J Oncol**, 24: 1435-1442, 2004

(分担研究者：大喜多 肇)

1. Kiyokawa N, T, Okita H., et al. Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma. **Modern Pathol** 17: 423-429, 2004.
2. Tang W, Okita H., et al. Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I chain. **Hybridoma Hybridom** 23: 187-191, 2004.
3. Takenouchi H, Okita H., et al. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. **J Cell Sci** 117: 3911-3922, 2004.
4. Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Okita H., et al. Deficiency of BLNK hampers PLC- γ 2 phosphorylation and Ca^{2+} influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. **Immunology** 112: 575-582, 2004.
5. Matsui J, Okita H., et al. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. **Leukemia Research** (in press).