

16-17 神経芽腫進展の診断基準確立・分子機構解析とそれに基づく診断・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

難治性神経芽腫の克服を目的として、神経芽腫の診断法および新しい治療法開発のためのターゲット分子の同定と機能解析を中心に研究を進め、以下の成果を得た。(1) 予後に相関するゲノム異常の網羅的同定とともに、発現マイクロアレイを用いた MYCN ターゲット遺伝子の大量同定とそれらによる神経芽腫細胞の分化制御における意義を明らかにした。(2) 神経芽腫進展を制御する新規な重要遺伝子として、受容体シグナルによる制御機構における ShcC 下流ターゲットの同定と解析、同じく BMCC1 の GAP 機能による神経細胞分化の制御機構、新規受容体遺伝子 NLRR1 の機能、1p にマップされる神経芽腫抑制遺伝子 KIF1B の細胞周期制御の破綻によるアポトーシス誘導などを明らかにし、治療法開発のターゲットとなりうることを示した。(3) MYCN トランスジェニックマウスが MK を高発現することを見だし、発がんへの関与と治療のターゲットとなりうる可能性について検討を始めた。

研究者名および所属施設

分担研究課題

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
中川原 章	千葉県がんセンター・研究所・所長	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
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	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
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	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
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	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 遺伝子情報による神経芽腫の性状予測と治療強度の層別化の可能性-clonal evolution に関する検討
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
堀川洋子	国立病院機構 呉医療センター、小児科、臨床研究部	1 研究目的 近年の小児固形腫瘍に対する集学的治療法の進歩にもかかわらず、散発性神経芽腫の大部分は進行性かつ難治性であり、その進展の分子機構に基づいた新しい診断法、治療法の開発が待たれている。そこで、今年度は、全国の神経芽腫検体の中央バンク化の促進に伴う基盤整備と

* 1 : 平成 17 年 4 月 1 日～平成 18 年 3 月 31 日

1 6-1 7 神経芽腫進展の診断基準確立・分子機構解析とそれに基づく診断・治療法の確立

研究をさらに推進するとともに、現在進められている新たな国際的リスク分類に対応できる分子診断および病理診断体制の強化を図る。また、新たな予後診断法として、遺伝子発現およびゲノム異常を迅速に効率よく同定するためのマイクロアレイ法の開発を実用化へ向けて展開する。さらに、難治性神経芽腫の分子標的探索を目的として、ゲノム解析に基づいて同定された神経芽腫関連新規遺伝子 KIF1B および BMCC1 の機能解析、神経芽腫の増殖・転移・浸潤を制御する受容体チロシンキナーゼ (Trk, ALK, Ret) シグナルにおける ShcA, ShcC の機能解析、神経芽腫の予後を決定する最も重要な MYCN 遺伝子の機能を抑制する方法の開発を、in vitro および in vivo の系を用いて行い、新しい治療法の開発へ展開する。

2 研究方法

(1) ゲノムおよび遺伝子発現の網羅的解析

アフィメトリックス社の SNPs アレイを用いた。

(2) 遺伝子機能の解析

通常の方法を用いた。遺伝子発現の抑制には siRNA を使用した。

(3) トランスジェニックマウス

MYCN トランスジェニックマウスを米国 ATCC から購入した。

3 研究成果

(1) 神経芽腫のリスク分類に向けたゲノム的手法による新しい分子診断法の開発

従来の予後因子に加え、DNA マイクロアレイ、アレイ CGH (comparative genomic hybridization) を用いて、予後予測に強く関連する領域および候補遺伝子を新たに同定した。また、11q 欠失領域に、神経芽腫細胞株の発育を抑制する遺伝子を見いだした。ゲノム異常の同定には、病理組織切片を用いた FISH 法も導入し、リスク分類に必要な 1p36, 11q 欠失、MYCN 増幅の迅速診断法の確立を試みた。さらに、11q 欠失領域に新たながん抑制候補遺伝子を同定した。

(2) 網羅的解析法による MYCN ターゲット遺伝子の同定と機能的制御機構の解明

MYCN 増幅のある多数の神経芽腫細胞株とその増幅のない複数の細胞株を対象に MYCN-siRNA を細胞内導入し、MYCN 発現低下に伴う遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。その結果、MYCN 高発現が神経芽腫の分化抑制に直接的に関わっていることが示唆された。

(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

予後を大きく左右する MYCN を siRNA を用いて発現を低下させたところ、増殖の抑制だけでなく、付着性の増大、神経突起の伸長等の形態変化を引き起こし、MYCN が神経芽腫細胞の分化抑制に関わっていることが示唆された。また、神経芽腫細胞株で高頻度にチロシンリン酸化を受けるドッキング分子 ShcC が、腫瘍で広範に発現する ShcA と対照的に、その SH2 ドメインを介してヌードマウスの造腫瘍能や接着非依存性増殖能に対し著明な抑制効果を持つことを明らかにした。さらに、その作用には Fyn などのチロシンキナーゼ活性および Cas を含む基質蛋白質のリン酸化を抑制する経路に関わっていることが示唆された。一方、ShcA と ShcC はともに神経芽腫の運動能・転移能を促進する方向に働くことが確認された。また、ShcC のドミナントネガティブ型の過剰発現系によりリン酸化シグナルをブロックすると、下流の Erk 経路や PI3K-Akt 経路が著名に抑制されて、細胞運動能や浸潤能の低下がみられた。一方、神経芽腫 cDNA library から新規に同定された BMCC1 は、TrkA 受容体の活性化によりリン酸化され、神経芽腫細胞の増殖と神経突起伸長を抑制することが明らかとなった。BMCC1 は EGF 受容体とも結合することが明らかになり、NGF や EGF による神経分化の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、分子標的探索としては、1p36.2 ホモ欠失領域から同定した KIF1B-beta の機能解析から、本遺伝子が神経芽腫の抑制遺伝子であることを明らかにした。さらに、予後の悪い神経芽腫で有意に高発現している NLRR1 について新たに解析を進め、本受容体蛋白質は高度に O-リンク型の糖鎖修飾を受けており、機能が全く不明の orphan receptor であることが明らかとなった。

(4) 難治性神経芽腫に対する遺伝子治療法の開発

神経芽腫の新しい治療法開発のために、MYCN トランスジェニックマウスを用いた系を確立した。これから発生してくる神経芽腫は Midkine (MK) を高発現していた。腫瘍発生に MK 発現が必要条件であるのかどうか、現在 MK ノックアウトマウスとの掛け合わせを行っている。また、この系を用いて、MK をターゲットとした治療法の開発を検討中である。

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。

1 6-1 7 神経芽腫進展の診断基準確立・分子機構解析とそれに基づく診断・治療法の確立

- 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も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. Chapter 5. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg, pp41-53.
2. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
3. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
4. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* 228:5-11, 2005
5. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A, Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* 24:3385-3396, 2005
6. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* 228:29-35, 2005
7. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* 7:337-350, 2005
8. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* 280:16665-16675, 2005
9. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Kuroda H, Ohira M, Nakagawara A, Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR. *J. Clin. Oncol.* 23: 5205-5210, 2005
10. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 167:213-222, 2005
11. Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.* 65:4587-4597, 2005
12. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T, Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. Aberrant methylation of *FBN2* correlates with progression of human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 50:43-49, 2005
13. Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23-H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 96:653-660, 2005
14. Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci.* 96:729-737, 2005
15. Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene* 24:7156-7169, 2005
16. Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogen* 25:917-928, 2006
17. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* 46:285-291, 2006
18. Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Lett.* 580:627-632, 2006
19. Isono K, Nemoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawara A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Moll. Cell. Biol.* 26:2758-2771, 2006
20. Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic *BMCCI*, a novel gene with the *BNIP2*

1 6-1 7 神経芽腫進展の診断基準確立・分子機構解析とそれに基づく診断・治療法の確立

and *Cdc42GAP* homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene* (in press)

21. Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* (in press)
22. Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, Ohira M, Ando S, Iida T., Nakajima T, Nakagawara A, Kimura H. 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. Sato, W., Takei, Y., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Kadomatsu, K.*, Muramatsu, T. Midkine antisense oligodeoxyribonucleotide inhibits renal damage induced by ischemic reperfusion *Kidney Int.* 67, 1330-1339 (2005). (*, corresponding author)
2. Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuasa, K., Sato, W., Muramatsu, T. Morpholino antisense oligomer targeting human midkine: its application for cancer therapy. *Int. J. Cancer* 114, 490-497 (2005).
3. Hayashi, K., Banno, H., Kadomatsu, K.*, Takei, Y., Komori, K., Muramatsu, T. Antisense oligodeoxyribonucleotide as to the growth factor midkine suppresses neointima formation induced by balloon injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H2203-2209 (2005). (*, corresponding author)
4. Takada, J., Ooboshi, H., Ago, T., Kitazono, T., Yao, H., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Ibayashi, S., Iida, M. Postischemic gene transfer of midkine, a neurotrophic factor, protects against focal brain ischemia. *Gene Ther.* 12, 487-493 (2005).
5. Kawashima, H., Petryniak, B., Hiraoka, N., Mitoma, J., Huckaby, V., Nakayama, J., Uchimura, K. Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Lowe, J.B., Fukuda, M. N-Acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-1 and -2 cooperatively control lymphocyte homing through L-selectin ligand biosynthesis in high endothelial venules. *Nat. Immunol.* 6, 1096-1104 (2005).
6. Kosugi, T., Yuzawa, Y., Sato, W., Kawai, H., Matsuo, S., Takei, Y., Muramatsu, T., Kadomatsu, K. Growth factor midkine is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am. J. Pathol.* 168, 9-19 (2006).
7. Takei, Y., Kadomatsu, K. In vivo delivery technique of nucleic acid compounds using atelocollagen: its use in cancer therapeutics targeted at the heparin-binding growth factor midkine. *Gene Ther. Mol. Biol.* in press. Review.

(分担研究者：堺 隆一)

- 1 Miyake, I., Hakomori, Y., Misu, Y., Nakadate, H., Matsuura, N., Sakamoto, M. & Sakai, R. Domain-specific function of ShcC docking

protein in neuroblastoma cells. *Oncogene* 24: 3206-3215, 2005

- 2 Azuma, K., Tanaka, M., Uekita, T., Inoue, S., Yokota, J., Ouchi, Y. & Sakai, R. Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* 24: 4754-4764, 2005
- 3 Miyamoto, Y., Chen, L., Sato, M., Sokabe, M., Nabeshima, T., Pawson, T., Sakai, R. & Mori, N. Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 25: 1826-1835, 2005
4. Osajima-Hakomori, Y., Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Nakagawa, A. & Sakai, R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* 167: 213-222, 2005
- 5 Seo, S., Asai, T., Saito, T., Suzuki, T., Morishita, Y., Nakamoto, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Kawazu, M., Yamagata, T., Sakai, R., Mitani, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., Chiba, S. & Hirai, H. Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J. Immunol.* 175: 3492-3501, 2005
- 6 Tanaka, M., Kamata, R. & Sakai, R. Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contract formation. *EMBO J* 24: 3700-3711, 2005.
- 7 Tanaka, M., Kamata, R. & Sakai, R. EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J. Biol. Chem.* 280: 42375-42382, 2005

(分担研究者：市川 仁)

1. Zou, J., Ichikawa, H., Blackburn, M. L., Hu, H. M., Zielinska-Kwiatkowska, A., Mei, Q., Roth, G. J., Chansky, H. A., and Yang, L., The oncogenic TLS-ERG fusion protein exerts different effects in hematopoietic cells and fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 6235-6246 (2005).
2. Shen, Y., Jia, Z., Nagele, R. G., Ichikawa, H., Goldberg, G. S., Src utilizes Cas to suppress Fhl1 in order to promote nonanchored growth and migration of tumor cells. *Cancer Res.*, 66, 1543-1552 (2006).

(分担研究者：檜山英三)

1 6-1 7 神経芽腫進展の診断基準確立・分子機構解析とそれに基づく診断・治療法の確立

1. Hiyama E, et al. Molecular and biological heterogeneity in neuroblastoma. *Current Genomics*, 6:319-332,2005
 2. Hayashidani Y, Hiyama E, et al. Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozymes targeting human telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase in pancreatic carcinoma cells. *Hiroshima J. Med. Sci.* 54:21-27,2005
 3. Shay JW, Hiyama E, et al. Telomerase and Lung Cancer. *In: HI Pass, DP Carbone, DH Johnson, JD Minna, AT Turrisi III (eds.), Lung Cancer: Principles and Practice.* 3rd ed. Vol.1 pp.160-171, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2005
 4. Matsuo T, Hiyama E, et al. Postradiation malignant fibrous histiocytoma and osteosarcoma of a patient with high telomerase activities. *Anticancer Res*, 25: 2951-2955, 2005
 5. Miyazu YM, Hiyama E, et al. Telomerase expression in non-cancerous bronchial epithelia is a possible marker of early development of lung cancer. *Cancer Res*, 65: 9623-9627, 2005
 6. Matsuo T, Hiyama E, et al. Telomerase Activity in Giant Cell Tumors of Bone. *Annals of Surgical Oncology*, (in press)
 7. Shimokuni T, Hiyama E, et al. Chemosensitivity prediction in esophageal squamous cell carcinoma: Novel marker genes and efficacy formulae using their expression data. *Int J Oncol.* (in press)
 8. Yamaoka H, Hiyama E, et al. Diagnostic and Prognostic impact of beta-catenin alterations in pediatric liver tumors. *Oncology Reports* (in press)
 9. Komatsu K, Hiyama E, et al. Prediction of individual response to platinum/pacritaxel combination using novel marker genes in ovarian cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*, (in press)
- (分担研究者：大喜多 肇)
1. J Matsui, N Kiyokawa, H Takenouchi, T Taguchi, K Suzuki, Y Shiozawa, M Saito, W-R Tang, YU Katagiri, H Okita, J Fujimoto. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* 19, 573-581, 2005
 2. YU Katagiri, N Kiyokawa, K Nakamura, H Takenouchi, T Taguchi, H Okita, A Umezawa, J Fujimoto. Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2. *Biochem Biophys Res Commun.*332(4), 1004-1011. 2005
 3. M Horinaga, H Okita, J Nakashima, K Kanao, M Sakamoto, M Murai. Clinical and pathologic significance of activation of signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer. *Urology.* 66(3):671-5. 2005
 4. M Maeda, A Tsuda, S Yamanishi, Y Uchikoba, Y Fukunaga, H Okita, J Hata Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney in a child *Pediatric Blood and Cancer*, 2006, in press