

令和元年6月12日現在

機関番号：82402

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19623

研究課題名（和文）iPSにより発生過程をトレースした難治性がん発癌モデル作成とマルチオミックス解析

研究課題名（英文）iPS-derived differentiation-related tumor models and multi-omics analysis

研究代表者

上條 岳彦（Kamijo, Takehiko）

埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）・臨床腫瘍研究所・所長

研究者番号：90262708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：iPSにより発生過程をトレースした神経芽腫発癌モデル系を構築するために、正常及び疾患 iPS（Li-Fraumeni 症候群由来 iPS）を用いた。これまでに正常人からのiPSをiPS研究所から3株、Li-Fraumeni症候群（LFS）の患者由来iPSを培養した。このiPSからNCCへの分化誘導系を確立し、>90%以上のNCC陽性率を得たことをFACSでのマーカーp75発現で確認した。iPSから誘導したNCCに対してMYCNを導入し、多数の悪性形質転換クローンを得た。免疫不全マウスにてXenograft形成をおこない、マルチオミックス解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MYCN遺伝子を時間的（iPSからの分化誘導のタイムコース）・空間的（iPSからの神経堤細胞および交感神経細胞への分化誘導）に誘導する系は、神経芽腫がん機構の解析に大きな進歩をもたらし、かつ新たな治療標的検出につながる研究と考えられる。更に、MYCN遺伝子発現異常による難治性がん（神経芽腫、脳腫瘍、小児腫瘍）の治療法を開発するためにも有用であり、従来の腫瘍細胞での遺伝子発現やトランスジェニックマウスでは不可能であった遺伝子発現誘導システムを構築して解析する研究である。

研究成果の概要（英文）：We established 3 wild-type and 1 Li-Fraumeni syndrome patient-derived neural crest cells (NCC) from iPS cells and confirmed the differentiation by FACS analysis using NCC marker p75 antibody, suggesting > 90 % differentiation. We performed multi-omics analysis including transcriptome, DNA methylome, and ChIP sequence of histone codes to study the differentiation mechanism related to tumorigenesis. Transformation of the NCCs were successfully performed by MYCN oncogene expression and soft agar colony formation experiments. Tumor formation in immune-deficient mice was studied and omics analysis is ongoing.

研究分野：発がん機序解析

キーワード：iPS 小児がん 神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

MYCNはMYCファミリーに属するがん遺伝子で、神経系の腫瘍並びに小児腫瘍で発癌・悪性化に重要な役割を示している。神経芽腫ではMYCN増幅は重要な予後不良因子として広く知られている。また、予後不良のPontine GliomaにはMYCN増加群があり(Nature Genet. 2014)、髄芽腫では、SHHタイプにてMYCN遺伝子の発現が誘導されている。また小児悪性腫瘍である腎芽腫、横紋筋肉腫でもMYCN増幅例が知られている。

神経芽腫は小児固形がんでは脳腫瘍に次いで症例数が多く、難治例では5年生存率30%台と予後不良である。神経芽腫の遺伝子変異は網羅的に解析されたが、MYCN増幅が25%、ALK変異が7%(MYCN増幅と重複あり)、ATRX変異が5%程度であり、他の遺伝子変異は非常に少ない。MYCNがん遺伝子は神経芽腫の明らかなドライバーがん遺伝子であり、MYCN増幅は予後不良のバイオマーカーとして広く認識されている。しかしMYCNおよびMYCを直接の標的とした治療法の開発は、MYCファミリー分子共通の課題として残されたままである。小児がんの発癌機序を考慮するうえで、発生過程の特有の時期におけるイベントが非常に重要であることはいくつかの事例によって示されている。例えば、乳児白血病は約7割で11q23転座と呼ばれる染色体異常が見られ、胎児期に発症し、一般に予後不良である。また、WT1遺伝子が胎生期の特有の時期(E11.5)による不活化でがん抑制遺伝子として機能し、Igf2 upregulationと協調してWilms腫瘍発がんをもたらすことが時間的にWT1 lossを制御する遺伝子改変マウスで示されている(J Clin Invest. 2011)。神経芽腫についても、個体発生を追随しつつ、そこからの逸脱が原因となる可能性が高く、その逸脱の分子機構はエピゲノム異常である可能性が高いことを後述のように我々は見出している。さらに、年齢による神経芽腫の病態の違いは、がん発生のタイミングの重要性を示唆している。従って、神経芽腫治療のための分子標的開拓にはこのがんの発生機構解明こそが重要であり、がん発生に関わる分子群に治療標的を見出す戦略は合理的である。

我々は神経芽腫の難治化にかかわる神経芽腫がん幹細胞のエピゲノム・トランスクリプトーム変化をマウスモデル(MYCN TGマウス)と、ヒト神経芽腫がん幹細胞モデル(MYCN増幅Tumor Sphere)の2つの系で検討した(平成26-27年度革新的がん医療実用化研究事業)。Tumor Sphereにおいては、腫瘍特有のポリコーム(PcG)群の発現増加と、GSEA解析によるPcG下流遺伝子群の変化を見出し、ポリコームはヒトおよびマウスがん幹細胞のがん幹細胞性と関連する標的分子候補と考えられた。難治神経芽腫の原因発がん遺伝子産物MYCNはヒストンアセチル化を制御し、ポリコームの転写を誘導するので、MYCNに対する治療法開発ががん幹細胞において重要なポリコームの制御にも有効であると考えられる。MYCN自体は転写因子であり、抗体開発は不適である。また、分子構造上薬剤の開発が難しく、これらの分子の機能を直接抑える薬剤はまだ実用化されていない。MYCNTGマウスは存在するが、MYCN誘導時期を制御できず、またヒトiPSモデルはない。MYCNによって活性化される下流の分子特にポリコームに関与する分子を標的にした治療薬の開発が必要と考えられ、このために発生過程をトレースする発がんモデルがこの開発に重要である。

2. 研究の目的

MYCN遺伝子発現異常による難治性がん(神経芽腫、脳腫瘍、小児腫瘍)の治療法を開発するために、従来の腫瘍細胞での遺伝子発現やトランスジェニックマウスでは不可能であった遺伝子発現誘導システムを構築して解析する。神経芽腫などでは、正常発生過程からのMYCN発現を伴う逸脱が発がん発生に繋がると考えられる。本研究では、正常発生過程をトレース(再現)し、各分化段階[多能性幹細胞(iPS)、前駆細胞(Neural Crest Cell)、分化細胞(sympathetic nerve cell)]にMYCNを時間的空間的に制御して発現させ、その表現型解析やエピゲノム解析などを施行して、これらを統合する。本研究によって、発生段階のどの時点でのMYCN誘導がどのようなエピゲノムなどの変化を起こして発癌に至るのかを明らかにできる。そして、分子標的を絞り込み、新規阻害剤および治療法開発の基盤を構築することを目的とする。このプロジェクトは従来のMYCN TGマウスまたは培養細胞株では得られないより正確な発がん機構の解析によって、高い精度で標的分子・経路を同定し、低分子化合物のフェノタイプスクリーニングのツールとしての活用、リード化合物取得の基盤取得が期待される。

3. 研究の方法

3-1. 培養および分化誘導方法

iPSはNeural Crest Cell分化誘導とマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析とメチローム解析を既に実施しているhiPSCs(414C2 and 201B7)を用いる。201B7は理研iPSバンクから入手する。414C2はCiRAに提供を依頼する。iPS培養はSNL feeder cellsを用い、Primate ES cell medium (ReproCELL, Tokyo, Japan) supplemented with 4 ng/ml recombinant human FGF2 (WAKO, Osaka, Japan)で行う。正常iPS培養はすでに行っている。

疾患由来iPS細胞として、Li-Fraumeni症候群由来iPSを用い、p53変異下でMYCNがん遺伝子を誘導する。これを用いたMYCN遺伝子誘導発現実験によって、MYCNによるアポトーシス誘導の軽減・発癌効率の向上が期待される。MTAを既に締結しており、送付依頼中である。

さらに、MYCN増幅NBで高頻度に見られる1p欠損を再現するために、1p36欠損症の方から疾患由来iPSを樹立し、これを用いてMYCN遺伝子誘導発現実験を行う。1p36欠損のさまざまな程度のiPSを用いることによって染色体1p部位の各がん抑制遺伝子の発がん機構における役割を

解析するソースとなることが期待される。平成 29 年度は CiRA 中畑龍俊博士に iPS 作成を依頼する。

Neural crest 細胞 (Neural Crest Cell: NCC) への分化は PlosOne; DOI:10.1371/journal.pone.0112291 に基づき、マトリゲルコート培養皿にて Feeder Free mTeSR1 培地 2 日+CDM+SB+CHIR 培地 7 日間で誘導し、p75high 細胞をソーティングする。

交感神経細胞 (Sympathetic Nerve Cell: SNC) への分化は PlosOne; DOI:10.1371/journal.pone.0112291 に基づき、Neural crest 細胞を BDNF+GDNF+NGF+NT-3 存在下で 14 日間培養し、b-tubulin と peripherin の発現を確認する。さらに 4~6 週間の培養で Glia 細胞への分化も可能である。

hiPSCs (414C2 and 201B7) と Li-Fraumeni 症候群由来 iPS の 3 株を用いて、まず Neural crest 細胞への分化および交感神経細胞への分化を検証する。

3-2 MYCN 遺伝子誘導法

MYCN 遺伝子誘導 hiPSCs (Cumate-inducible MYCN 414C2 and Cumate-inducible MYCN 201B7) (TAM-ON MYCN 414C2 and TAM-ON MYCN 201B7) と Li-Fraumeni 症候群由来 iPS (TAM-ON MYCN Li-FS iPS) の 6 株を用いて、まず Neural crest 細胞への分化および交感神経細胞への分化を検証する。予備実験により、Neural crest 細胞誘導 9 日間、交感神経細胞誘導 14 日間を指標にそれぞれ p75 と b-tubulin/peripherin の発現を検討し、MYCN を誘導する。

3-3 解析方法

MYCN 誘導後継時的に細胞を観察し、RNA, miRNA, ChIP seq 用固定ゲノム/蛋白、ゲノムを回収してオミックス解析を行う。トランスクリプトーム解析はアジレント社発現解析アレイ SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K を基本的に使用する。

DNA メチル化解析は、イルミナ社 Infinium Methylation アッセイを用いて CpG サイトレベルでメチル化の定量を行う。

ChIP seq 解析は、ゲノム・蛋白をホルマリン固定後に Covaris 社 DNA Shearing システム M220 を用いて安定した再現性の高い DNA の断片化を行う。その後 H3K27me3 抗体 (ポリコーン結合部位)、H3K27Ace 抗体 (スーパーエンハンサー部位)、H3K4me3 抗体 (転写活性化部位) で precipitation を行い、次世代シーケンス解析をイルミナ社 NextSeq などを用いて行う。

この Infinium Methylation アッセイの結果とアジレント社アレイ発現解析の結果と ChIPseq の解析結果を統合して解析する。

MYCN 誘導後継時的に網羅的解析を行う一方、誘導後の iPS, NCC, SNC を軟寒天培養およびコーゲン・ゲル培養等の 3D 培養法、Xenograft 等で形質転換クローンを取得する。

誘導前細胞 (iPS; NCC; SNC) ; MYCN 誘導細胞 (iPS; NCC; SNC)、MYCN 誘導後形質転換 NB クローン (iPS; NCC; SNC で取得された形質転換クローン) にて行ったトランスクリプトーム解析、DNA メチル化解析、ChIP seq 解析、ゲノム解析の結果を統合して、神経芽腫 MYCN 発癌に必要な経路の変化を同定する。

4. 研究成果

iPS により発生過程をトレースしたヒト時間 的空間的 MYCN 誘導神経芽腫発癌モデル系を構築するために、正常及び疾患 iPS を用いた。疾患由来 iPS 細胞として、Li-Fraumeni 症候群由来 iPS を用い、p53 変異下で MYCN がん遺伝子を誘導した。Neural crest 細胞 (Neural Crest Cell: NCC) および交感神経細胞 (SNC) への分化系は確立された系を用いた。

これまでに正常人からの iPS を iPS 研究所から 3 株、Li-Fraumeni 症候群 (LFS) の患者由来 iPS を iPS 研究所から 1 株入手し、iPS としての培養保存、この iPS から NCC への分化は PlosOne に基づき、>90%以上の陽性率を得た。これらの iPS/NCC4 ペアのトランスクリプトーム・メチローム・ChIPseq を行い解析中である。

iPS に対して MYCN 遺伝子をトランスポゾンに導入し、誘導を行った。MYCN 発現は確認できたが、悪性形質転換は得られなかった。そこで誘導した NCC に対してがん遺伝子 MYCN を導入すると多数の悪性形質転換クローンを得ることができた。これらのクローンは足場非依存性増殖が可能であり、NCC 細胞培養が必要であったフィブロネクチンに非依存になった。また、これらのクローンでの MYCN 遺伝子高発現を RT-PCR およびウェスタンブロットングで確認した。これまで報告が無かった多能性幹細胞由来の正常細胞を MYCN で形質転換した神経芽腫モデルが得られたと考えられる。現在、p75 レセプター、GD2、CD24、CD140b 等の表面マーカー蛋白を FACS 解析中である。また、免疫不全マウスにて Xenograft 形成を施行中である。これらのクローンのトランスクリプトーム・メチローム・ChIPseq を実施し、MYCN による神経芽腫発癌のエピゲノム機構を明らかにする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Zhenghao Li, Hisanori Takenobu, Amallia Nuggetsiana Setyawati, Nobuhiro Akita, Masayuki Haruta, Shunpei Satoh, Yoshitaka Shinno, Koji Chikaraishi, Kyosuke Mukae, Jesmin Akter, Ryuichi P. Sugino, Atsuko Nakazawa, Akira Nakagawara, Hiroyuki Aburatani, Miki Ohira, **Takehiko Kamiyo**
EZH2 regulates neuroblastoma cell differentiation via NTRK1 promoter epigenetic

modifications

ONCOGENE, 2018 May;37(20):2714-2727. doi: 10.1038/s41388-018-0133-3.

2. Hishiki T, Matsumoto K, Ohira M, **Kami jo T**, Shichino H, Kuroda T, Yoneda A, Soejima T, Nakazawa A, Takimoto T, Yokota I, Teramukai S, Takahashi H, Fukushima T, Kaneko T, Hara J, Kaneko M, Ikeda H, Tajiri T, Nakagawara A; Japan Childhood Cancer Group Neuroblastoma Committee (JNBSG).

Results of a phase II trial for high-risk neuroblastoma treatment protocol JN-H-07: a report from the Japan Childhood Cancer Group Neuroblastoma Committee (JNBSG).

Int J Clin Oncol. 2018 Apr 26. October Volume 23, Issue 5, pp 965-973 doi: 10.1007/s10147-018-1281-8.

3. Masayuki Haruta, Ryuichi Sugino, Tsugumichi Koshinaga, Tetsuya Takimoto, Yasuhiro Yamada, **Takehiko Kami jo**, Yasuhito Arai, Yukichi Tanaka, Masahiro Fukuzawa, Takaharu Oue, Hajime Okita, Yasuhiko Kaneko

Combined Genetic and Chromosomal Characterization of Wilms Tumors Identifies Chromosome 12 Gain as a Potential New Marker Predicting a Favorable Outcome, Neoplasia. 2019 Jan;21(1):117-131. doi: 10.1016/j.neo.2018.10.007.

4. Saito M, Okumura K, Isogai E, Araki K, Tanikawa C, Matsuda K, **Kami jo T**, Kominami R, Wakabayashi Y.

A polymorphic variant in p19Arf confers resistance to chemically-induced skin tumors by activating the p53 pathway.

J Invest Dermatol. 2019 Jan 23. pii: S0022-202X(19)30032-6. doi: 10.1016/j.jid.2018.12.027.

5. Izumi H, Li Y, Shibaki M, Mori D, Yasunami M, Sato S, Matsunaga H, Mae T, Kodama K, **Kami jo T**, Kaneko Y, Nakagawara A.

Recycling endosomal CD133 functions as an inhibitor of autophagy at the pericentrosomal region.

Sci Rep. 2019 Feb 19;9(1):2236. doi: 10.1038/s41598-019-39229-8.

6. Yuanyuan Li, Miki Ohira, Yong Zhou, Teng Xiong, Wen Luo, Chao Yang, Xiangchun Li, Zhibo Gao, Yohko Nakamura, **Takehiko Kami jo**, Yasuhiko Kaneko, Takeshi Taketani, Junichi Ueyama, Tatsuro Tajiri, Hongyan Zhang, Jian Wang, Huanming Yang, Ye Yin, and Akira Nakagawara. Genomic Analysis-Integrated Whole-exome Sequencing of Neuroblastomas Identifies Genetic Mutations in Axon Guidance Pathway. Oncotarget. 2017 May 23;8(34):56684-56697. doi: 10.18632/oncotarget.18079. eCollection 2017 Aug 22.

7. Koji Chikaraishi Hisanori Takenobu Ryuichi P. Sugino Kyosuke Mukae Jesmin Akter Masayuki Haruta Masafumi Kurosumi Takaho A Endo Haruhiko Koseki Naoki Shimojo Miki Ohira **Takehiko Kami jo**,

CFC1 is a cancer stemness-regulating factor in neuroblastoma.

Oncotarget. 2017 Jul 11;8(28):45046-45059. doi: 10.18632/oncotarget.18464.

PMID: 28620148 in press as a priority paper

8. Sun Y, Harada M, Shimojato O, Souda H, Takiguchi N, Nabeya Y, **Kami jo T**, Akita H, Anzai N, Chiba K, Furihata T.

Cancer-type OATP1B3 mRNA has the potential to become a detection and prognostic biomarker for human colorectal cancer.

Biomark Med. 2017 Jun 8. doi: 10.2217/bmm-2017-0098.

9. Zhendong Su, Satoshi Kishida, Shoma Tsubota, Kazuma Sakamoto, Dongliang Cao, Shinichi Kiyonari, Miki Ohira, **Takehiko Kami jo**, Atsushi Narita, Yinyun Xu, Yoshiyuki Takahashi, and Kenji Kadomatu. Neurocan, an extracellular chondroitin sulfate proteoglycan, stimulates neuroblastoma cells to promote malignant phenotypes. Oncotarget. 2017 May 23;8(34):56684-56697. doi: 10.18632/oncotarget.18079.

10. Kumiko Uryu, Riki Nishimura, Keisuke Kataoka, Yusuke Sato, Atsuko Nakazawa, Hiromichi Suzuki, Kenichi Yoshida, Masafumi Seki, Mitsuteru Hiwatari, Tomoya Isobe, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Satoru Miyano, Katsuyoshi Koh, Ryoji Hanada, Akira Oka, Yasuhide Hayashi, Miki Ohira, **Takehiko Kami jo**, Hiroki Nagase, Tetsuya Takimoto, Tatsuro Tajiri, Akira Nakagawara, Seishi Ogawa, and Junko Takita. Identification of the Genetic and Clinical Characteristics of Neuroblastomas using Genome-wide Analysis. Oncotarget. 2017 Nov 18;8(64):107513-107529. doi: 10.18632/oncotarget.22495

[学会発表] (計 5 件)

1. Genome and epigenome profiling of high stage neuroblastoma, Poster Miki Ohira, Ryuichi Sugino, Hisanori Takenobu, Zhenghao Li, Masayuki Haruta, Genta Nagae, Claire Renard-Guillet, Akira Nakagawara, Hiroyuki Aburatani, Takehiko Kami jo AACR2018, McCormick Place North/South, Chicago, Illinois, USA 国外.

2. CDX1 regulates neuroblastoma stemness through MYC pathway modulation and

reprogramming gene activation Poster

Hisanori Takenobu, Miki Ohira, Ryuichi Sugino, Koji Chikaraishi, Kyosuke Mukae, Nobuhiro Akita, Masayuki Haruta, Akira Nakagawara, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki, Takehiko Kamijo

ANR2018, San Francisco 国外.

3. Reevaluation of PDGFR α signal in neuroblastoma: high expression and a new nonsynonymous mutation, Poster

Shunpei Satoh, Miki Ohira, Hisanori Takenobu, Akira Nakagawara, Takehiko Kamijo

ANR2018, San Francisco 国外.

4. Genomic characterization of high-risk/ultra-high-risk neuroblastomas found in 610 patients registered in Japan Children's Study Group Neuroblastoma Committee (JCCG-JNBSG), Poster

Miki Ohira, Takehiko Kamijo, Ryuichi P Sugino, Masayuki Haruta, Hisanori Takenobu Tetsuya Takimoto, Atsuko Nakazawa, Tomoro Hishiki, Kimikazu Matsumoto, Hiroyuki Shichino, Toshikazu Ushijima, Tomoko Iehara, Yohko Nakamura, Hiroki Nagase, Junko Takita, Akihiro Yoneda, Takashi Fukushima, Tatsuro Tajiri, Akira Nakagawara, Japan Children's Cancer Group Neuroblastoma Committee (JCCG-JNBSG)

ANR2018, San Francisco 国外.

5. CFC1 is a cancer stemness-regulating factor in neuroblastoma. Poster

Chikaraishi K, Takenobu H, Sugino RP, Mukae K, Akter J, Haruta M, Kurosumi M, Endo TA, Koseki H, Shimojo N, Ohira M, Kamijo T.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://www.pref.saitama.lg.jp/saitama-cc/kenkyujo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 大平 美紀

ローマ字氏名: Miki Ohira

所属研究機関名: 埼玉県立がんセンター

部局名: 臨床腫瘍研究所

職名: 主幹

研究者番号 (8 桁): 20311384

研究分担者氏名: 杉野 隆一

ローマ字氏名：Ryuichi Sugino
所属研究機関名：埼玉県立がんセンター
部局名：臨床腫瘍研究所
職名：技師
研究者番号（8桁）：90749516

(2)研究協力者

研究協力者氏名：迎 恭輔
ローマ字氏名：Kyoussuke Mukai

研究協力者氏名：竹信 尚典
ローマ字氏名：Hisanori Takenobu

研究協力者氏名：山田 泰広
ローマ字氏名：Yasuhiro Yamada

研究協力者氏名：Akter Jesmin
ローマ字氏名：Akter Jesmin

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。