

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591562

研究課題名(和文) 統合ゲノム解析による難治性神経芽腫の病態関連遺伝子の探索

研究課題名(英文) Comprehensive genome analysis of aggressive neuroblastoma

研究代表者

大平 美紀(Ohira, Miki)

千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノム研究室・室長

研究者番号：20311384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児の代表的な腹部固形腫瘍である神経芽腫には、しばしば自然退縮を起こす予後良好タイプがある一方で、1歳以降に生じ、非常に予後不良な難治例も存在する。本研究では、多様な臨床像を示す神経芽腫について最適な治療戦略を構築することを目的に、腫瘍のゲノムコピー数異常、エピゲノム異常、マイクロRNAを含む遺伝子発現パターンなどの分子プロファイル解析を行い、悪性化腫瘍に強く関連する分子的特徴を探索した。進行神経芽腫の予後に強く関連するマーカーの候補が複数見いだされ、これらは今後難治性神経芽腫の早期診断、治療法開発のための標的遺伝子の同定につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Neuroblastoma is one of the most common cancer in children, and is known to exhibit wide ranges of clinical behavior, from spontaneous regression to highly resistant to chemotherapy. In this study, to construct better therapeutic strategies for each tumor subtype, we conducted integrated molecular profiling to find genome copy number aberrations, mRNA/miRNA expression patterns as well as epigenetic changes occurred frequently in aggressive neuroblastomas. A set of markers we found showed significant correlations with patient prognoses and could add new insights to develop a novel diagnostic system or to select suitable clinical treatment by using them.

研究分野：ゲノム医科学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：癌 神経芽腫 マイクロアレイ 遺伝子 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

小児の代表的な腹部固形腫瘍である神経芽腫には、1歳未満で発症し、しばしば自然退縮を起こす予後良好タイプがある一方で、1歳以降に生じ、非常に予後不良な難治例も存在する。近年のがん治療法の進展により、小児癌の治療率は目覚ましく向上したが、進行神経芽腫については5年生存率は約30%と依然として予後不良である。神経芽腫組織でみられる代表的なゲノム異常としては、2pの*MYCN*癌遺伝子の増幅、*ALK*遺伝子の増幅と変異、1p36領域の欠失、11q欠失、17qの増加などが知られているが、1p、11q、17qの領域からの病態関連遺伝子は未だはっきりと同定されていない。また、現在臨床で用いられている神経芽腫の予後マーカーには、病期、診断時年齢、DNAプロイディ、病理組織分類の他、1p36領域の欠失、*MYCN*の増幅などの染色体変化と、*TRKA*遺伝子などの発現レベルがあるが、しばしばこれらの既存予後マーカーでは悪性度予測が困難な中間予後群が存在する。

千葉県がんセンター研究所では、小児の代表的な難治性固形腫瘍である神経芽腫について、約2400検体からなる全国規模の研究用組織バンクが整備されている。また神経芽腫、肝芽腫、腎芽腫の3つの胎児性固形腫瘍から単離された13,000遺伝子を搭載した自家製遺伝子発現解析用DNAチップを製作し、神経芽腫については約250例の遺伝子発現データが蓄積されている。これらのシステムを活用し、これまでに神経芽腫の予後の異なるサブセット間でmRNA発現量に差を示す約700遺伝子を同定した。また、神経芽腫のアレイCGH法によるゲノムコピー数異常の解析から、難治性神経芽腫の一部で*ALK*チロシンキナーゼ遺伝子の遺伝子増幅あるいは遺伝子変異を同定、*ALK*の異常な活性化が腫瘍悪性化に関与することを報告してきた。

予後良好群と不良群の間で発現に差のある700個の遺伝子の染色体マップから、必ずしも遺伝子発現変化がゲノムコピー数変化とリンクしないこと、恐らく遺伝子の転写調節領域のゲノムメチル化などのエピジェネティックな変化も関わっていること、が示唆された。また、特定の遺伝子の3'UTRに結合し、その発現を抑制するマイクロRNAの発現が、がんの病態に関与するという報告が多数示されており、手元にある遺伝子発現データを有効に利用し、マイクロRNAの発現パターンやゲノムメチル化等のエピ

ゲノム解析を行うことにより、新たな神経芽腫の悪性化メカニズムが明らかになる可能性がある。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では上述のように多様な臨床像を示す各サブセットの神経芽腫について最適な治療戦略をたてることを目的に、ゲノムと遺伝子発現プロファイルの観点から悪性化腫瘍に強く関連する分子的特徴を明らかにする。これまでに蓄積してきた神経芽腫組織バンクを解析対象とした網羅的ゲノムコピー数異常解析および遺伝子発現解析の結果を、エピゲノム解析とマイクロRNA発現解析を組み合わせることによりさらに発展させ、分子プロファイルを用いた腫瘍リスク分類の構築、新規治療標的遺伝子の同定とその解析を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 解析対象症例

小児がん臨床施設にて研究使用への同意取得後連結可能匿名化処理され、千葉県がんセンター研究所に供与された神経芽腫腫瘍組織と、そこから調製したDNAとRNAを本研究に使用した。臨床情報、予後情報は2005年に供与施設に対して予後調査を行い、収集した情報を用いた。これらの試料ならびに資料の使用については千葉県がんセンター倫理審査委員会に申請し、承認を受けて行った。

(2) *MYCN*増幅群、1p欠失群、11q欠失群の高密度ゲノムおよび発現アレイ解析

*MYCN*増幅群30例(長期生存例20、死亡例10)を当初の解析対象とした。これらの腫瘍由来DNAを調製し、アジレント社製ゲノムアレイ(244K)を用いたアレイCGH解析を行った。また同症例群由来の腫瘍RNAに対し市販遺伝子チップ(アジレント社製44K遺伝子発現アレイ)ならびに13000遺伝子を搭載した小児癌由来自家製DNAチップを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。結果の検証には、100例の追加症例を用いた定量RT-PCRを行うとともに、過去に当研究室で解析済みの250例の遺伝子発現ならびにゲノム異常データベースも活用した。

(3) マイクロRNA発現解析

約800種類のマイクロRNAを搭載したアジレント社18K miRNAチップを用いて40症例(病期1または2の典型的な予後良好群20

症例、病期 3 または 4 の進行例 20 例) の発現プロファイルを行い、統計解析により患者予後と相関するプローブを抽出した。結果の検証には 120 例の独立症例由来の RNA を対象としたリアルタイム RT-PCR 法を用いた。これらのマイクロ RNA の染色体上の位置と、同症例のゲノム異常パターン (既にデータ取得済み) との相関を検討した。また同 40 症例についてアジレント社 44K 発現チップを用いて mRNA の発現レベルデータも取得し、上記と同様に患者予後に相関する遺伝子の抽出を行った。予後に強く相関するマイクロ RNA については、予想標的遺伝子の候補を TargetScan/PicTar などのデータベースから検索、抽出し、アレイデータ解析ソフト GeneSpring GX を用いて、実際に mRNA 発現レベルが予後と強く相関する遺伝子群と重複するものを検索した。

(4) エピゲノム解析

神経芽腫細胞株 12 種類を脱メチル化剤である 5-aza-deoxycytidine 存在下で培養して DNA の脱メチル化を行い、RNA を調製した。未処理細胞の RNA とともに DNA チップを用いた遺伝子発現解析を行い、各遺伝子の発現レベルを比較した。また、メチル化による発現抑制が起きているものを絞り込むため、細胞株のゲノム DNA を調製し、重亜硫酸ナトリウム処理によりメチル化シトシンをウリジンに変換させ、変換前後の配列特異的なプライマーを用いたメチル化特異的 PCR 用のパネルを作製した。メチル化部位の決定には Bisulfite sequence 法を用いた。遺伝子を絞り込んだ後の結果の検証には、プライマリー腫瘍 100 例由来の DNA を Bisulfite 処理し、パイロシーケンサーを用いてメチル化特異的 PCR 産物の配列ごとの定量と数値化を行った。

4. 研究成果

(1) MYCN 増幅群の高密度ゲノムおよび発現アレイ解析と予後に関与する分子マーカーの抽出

典型的難治性タイプの MYCN 増幅群 30 例 (長期生存例 20、死亡例 10) について、244K アレイ CGH と網羅的遺伝子発現解析を行った。アレイ CGH データと、患者予後との相関解析を行ったところ、MYCN 増幅群においては、1p、11q、17q の欠失、増加の有無を組み合わせたゲノムコピー数の特定のパターンが有意に予後に相関していることが示された。この結果の検証のため症例を 300 例追加し、予後因

子としての評価を行った。網羅的遺伝子発現解析からの予後予測マーカーは、MYCN 増幅群に関してその大部分を予後不良と予測するため、この症例群の詳細なリスク分類には性能を発揮できなかったが、このゲノムパターンを導入すると MYCN 増幅症例の中でも特に予後不良な群の予測が可能であることが再現性をもって示された。

一方、長期生存群と早期死亡群の 2 群間で有意差のある複数箇所のゲノム領域と遺伝子発現データを抽出し、マップされる遺伝子の共通性を検討したところ、両者の強い相関は見られなかった。

以上の結果は過去の症例 (登録期間: 1997 年から 2005 年まで) を用いた後方視的解析であり、現状の臨床プロトコルに登録された独立症例を用いた検証とマーカーの評価は引き続き必要であるが、ゲノムコピー数の特定のパターンの予後への強い相関が見いだされ、今後の腫瘍リスク分類への適用が期待される。

(2) 予後関連マイクロ RNA の抽出

約 800 種類のマイクロ RNA に対応するプローブを搭載した miRNA チップを用いて、40 症例 (内訳: 典型的な予後良好群 20 症例、予後不良群 20 例) の発現プロファイル解析を行い、患者予後と発現レベルが有意に相関するマイクロ RNA を 80 種類抽出した ($p < 0.05$)。上位 14 個のマイクロ RNA について、TargetScan データベースから GeneSpring を用いて標的となる遺伝子の候補を抽出したところ、約 4500 遺伝子が抽出された。一方同 40 症例の 42000 プローブの遺伝子発現解析データからは予後と相関する遺伝子が約 890 個抽出された ($p < 0.05$, $FC > 1.5$)。マイクロ RNA からの 4500 遺伝子と上記 890 遺伝子の重複は 136 遺伝子であった。このうち、マイクロ RNA の発現パターンと mRNA 発現レベルが逆相関する遺伝子群は 78 個であり、45 遺伝子が予後不良群で、33 遺伝子が予後良好群で高発現のパターンであった。同症例のゲノム異常パターンとこれらの遺伝子群の相関はほとんど見られなかった。

患者予後に最も相関の高かった 2 種類のマイクロ RNA については、リスク分類マーカーとしての性能を確認するため 120 症例の新規追加独立検体を用いた定量 PCR を行った。これら 2 つのマイクロ RNA は再現性をもって患者予後と強く相関し ($p < 0.0001$)、診断時年齢等の既知予後マーカーに独立な予後因子となることが示された。さらに、予後予測の困

難な MYCN 非増幅型中間予後群においても、よいマーカーとなりうることを示唆された。今後はこれらのマイクロ RNA を神経芽腫細胞株に導入し、遺伝子発現解析を行い、発現レベルが調節される遺伝子群を抽出するとともに、マイクロ RNA を導入した細胞株の増殖能ならびに細胞死における効果について確認する予定である。

2. 予後関連エピゲノム変化の抽出

神経芽腫細胞株を用いた Bisulfite sequence と、100 例の腫瘍検体を用いたメチル化特異的 PCR から絞り込んだ候補遺伝子のうち、予後不良群で発現低下が見られる一つについて、上流プロモーター領域のメチル化特異的 PCR および Bisulfite sequence によりメチル化レベルが上昇していることを確認した。2 種類のプライマーセットを作製し、パイロシーケンサーによる定量 Bisulfite-PCR を 50 例の独立症例について行った。本エピゲノムマーカーは、前述のゲノムコピー数異常あるいはマイクロ RNA 発現マーカーに比して患者予後との相関は低く、検出時のメチル化バックグラウンドも高いため、予後マーカーとしては後者 2 つのマーカーの方が有効であることが示された。神経芽腫では既報の知見 (Asada et al, *Jpn J Clin Oncol* 2013) から、CpG アイランドメチレーターフェノタイプ (CIMP) と呼ばれるグローバルなメチル化レベルが予後と強い相関が見られることが示されており、神経芽腫では遺伝子のプロモーター部位のメチル化レベルより、むしろカドヘリンベータなどの遺伝子本体 (gene body) のメチル化レベルの方が CIMP に強く相関していることがわかってきた。今回抽出した遺伝子についても、プロモーター部位のメチル化レベルより遺伝子発現レベルの方が予後と強く相関しており、また、CIMP による予後マーカーを超えることはできなかった。今後は予後の異なるサブセット毎のグローバルなエピゲノム変化のプロファイルを検出するため、イルミナチップ等を導入することを計画している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Yamaguchi Y, Takenobu H, **Ohira M**, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T. Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated

protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway. *Eur J Cancer* 査読有, 50:1555-1565, 2014.

Suenaga Y, Islam SM, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shibata T, Nakamura Y, **Ohira M**, Haraguchi S, Takatori A, Nakagawara A. NCYM, a cis-antisense gene of MYCN, encodes a *de novo* evolved protein that inhibits GSK3beta resulting in the stabilization of MYCN in human neuroblastomas. *PLoS Genet* 査読有, 10:e1003996, 2014. doi: 10.1371/journal.pgen.1003996.

Hasan MK, Nafady A, Takatori A, Kishida S, **Ohira M**, Suenaga Y, Hossain S, Akter J, Ogura A, Nakamura Y, Kadomatsu K, Nakagawara A. ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci Rep* 査読有, 3:3450, 2013. doi: 10.1038/srep03450.

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* 査読有, 33:2601-2609, 2013.

Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, **Ohira M**, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J Clin Invest* 査読有, 123:2935-2947, 2013.

Asada K, Watanabe N, Nakamura Y, **Ohira M**, Westermann F, Schwab M, Nakagawara A, Ushijima T. Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. *Jpn J Clin Oncol* 査読有, 43:641-645, 2013.

Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, **Ohira M**, Kamijo T, Kondo S, Fujii Y, Nakagawara A. Novel adaptor protein Shf interacts with ALK receptor and negatively

regulates its downstream signals in neuroblastoma. *Cancer Sci* 査読有, 104:563-572, 2013.

Sugimoto T, Gotoh T, Yagyu S, Kuroda H, Iehara T, Hosoi H, Ohta S, Ohira M, Nakagawara A. A MYCN-amplified cell line derived from a long-term event-free survivor among our sixteen established neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett* 査読有, 331:115-121, 2013.

Yamaki T, Suenaga Y, Iuchi T, Alagu J, Takatori A, Itami M, Araki A, Ohira M, Inoue M, Kageyama H, Yokoi S, Saeki N, Nakagawara A. Temozolomide suppresses MYC via activation of Tap63 to inhibit progression of human glioblastoma. *Sci Rep* 査読有, 3:1160, 2013. doi:10.1038/srep01160.

Chand D, Yamazaki Y, Ruuth K, Schönherr C, Martinsson T, Kogner P, Attiyeh EF, Maris J, Morozova O, Marra MA, Ohira M, Nakagawara A, Sandström PE, Palmer RH, Hallberg B. Cell culture and Drosophila model systems define three classes of anaplastic lymphoma kinase mutations in neuroblastoma. *Dis Model and Mech* 査読有, 6:373-382, 2013.

Shum CK, Lau ST, Tsoi LL, Chan LK, Yam JW, Ohira M, Nakagawara A, Tam PK, Ngan ES. Kruppel-like factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage differentiation. *Oncogene* 査読有, 32:4086-4099, 2013.

Kimura H, Nakajima T, Takeuchi K, Soda M, Mano H, Iizasa T, Matsui Y, Yoshino M, Shingyoji M, Itakura M, Itami M, Ikebe D, Yokoi S, Kageyama H, Ohira M, Nakagawara A. ALK fusion gene positive lung cancer and 3 cases treated with an inhibitor for ALK kinase activity. *Lung Cancer* 査読有, 75:66-72, 2012.

Akter J, Takatori, A, Hossain S, Ozaki T, Nakazawa A, Ohira M, Suenaga Y, Nakagawara A. Expression of NLRR3 orphan receptor gene is negatively regulated by MYCN and Miz-1, and its down-regulation is

associated with an unfavorable outcome in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 査読有, 17:6681-6692, 2011.

Takahashi A, Tokita H, Takahashi K, Takeoka T, Murayama K, Tomotsune D, Ohira M, Iwamatsu A, Ohara K, Yazaki K, Koda T, Nakagawara A, Tani K. A novel potent tumour promoter aberrantly overexpressed in most human cancers. *Sci Rep* 査読有, 1: 15, 2011. doi: 10.1038/srep00015.

Isogai E, Ohira M, Ozaki T, Oba S, Nakamura Y, Nakagawara A. Oncogenic LMO3 collaborates with HEN2 to enhance neuroblastoma cell growth through transactivation of *Mash1*. *PLOS One* 査読有, 6:e19297, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0019297.

〔学会発表〕(計 13 件)

大平美紀 他11名, Whole exome sequencing of 101 neuroblastomas with distinct genomic subgroups identified significantly mutated pathways in aggressive tumor subtypes. 米国癌学会小児癌分科会 (AACR Special Conference on Pediatric Cancer At The Crossroads (AACR -PCAC)) 2013, 2013年11月3-6日, 米国・サンディエゴ

大平美紀 他8名, 網羅的ゲノム解析を用いたMYCN非増幅型難治性神経芽腫の予後関連ゲノム異常の検索. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013年11月29日-12月1日. 福岡

大平美紀 他7名, 難治性中間型神経芽腫の予後に関与するゲノムプロファイルの検索. 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3日-5日. 横浜

大平美紀 他10名, Risk classification of neuroblastoma based on genomic profiles: For future tailor-made therapeutic strategies in Japan. 第45回国際小児がん学会 (SIOP2013) 2013年9月25日-28日, 中国・香港

大平美紀 他4名, Prognosis-related miRNA expression profiles of neuroblastoma. 第104回米国癌学会総会

(AACR2013) 2013年4月6日-10日, 米国・ワシントンD.C.

大平美紀 他4名, マイクロRNA発現レベルによる神経芽腫のリスク分類. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年11月30日-12月2日 横浜

大平美紀 他4名, Prognosis prediction of neuroblastoma subsets based on miRNA expression profiles. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日-21日 札幌

大平美紀 他4名, 神経芽腫の予後マーカーとしてのmiRNA発現プロファイル. 第19回日本遺伝子診療学会大会 2012年7月26日-28日 千葉

大平美紀 他3名, Gene expression and genomic aberration signatures cooperatively work to improve tumor risk stratification of neuroblastoma.. Advances in Neuroblastoma Research 2012 (ANR2012) 2012年 6月17日-21日 カナダ・トロント

大平美紀 他4名, miRNA expression levels are strongly correlated with neuroblastoma prognosis. 第2回日中がん研究シンポジウム 2012年5月9日-11日 千葉

大平美紀 他4名, 神経芽腫の予後に関連するマイクロRNA発現パターンの検索. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会 2011年11月25日-27日. 新前橋

大平美紀 他3名, LIM-only protein LM03 は、神経芽腫の発生母地である神経堤細胞において細胞増殖と分化を制御する. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日-5日 名古屋

大平美紀 他4名, 神経芽腫の予後に強く関連するmiRNA発現プロファイルの検索. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日-5日. 名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(なし)

取得状況(なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 美紀 (OHIRA Miki)
千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノムセンター・がんゲノム研究室・室長
研究者番号: 20311384

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中川原 章 (NAKAGAWARA Akira)
千葉県がんセンター・病院長
研究者番号: 50117181