

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591269

研究課題名（和文）網羅的統合ゲノム解析による神経芽腫の病態関連遺伝子の探索

研究課題名（英文）Comprehensive genome analyses of neuroblastoma

研究代表者

大平 美紀 (OHIRA MIKI)

千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノムセンター・がんゲノム研究室・室長

研究者番号：20311384

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、神経芽腫の網羅的ゲノムコピー数異常解析と遺伝子発現解析のデータを基礎に、エピゲノム解析とマイクロRNA発現解析を組み合わせ、予後に強く関連するゲノムパターンの抽出と新規神経芽腫関連遺伝子の検索を行った。これらの分子情報は腫瘍リスク分類システムの構築と、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 a childhood tumor originating from progenitor cells of the sympathetic nervous system. The tumor displays a broad spectrum of clinical behavior, ranging from spontaneous regression to fatal progression despite intensive therapy. We have been collecting molecular signatures of each tumor subset, such as genomic copy number changes and mRNA expression profiles, to clarify molecular mechanism of oncogenesis and progression of neuroblastoma. In this study, we further conducted the analyses to find epigenetic changes occurred in aggressive neuroblastomas as well as miRNA expression profiling of the tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学（ゲノム医科学）

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：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

癌の治癒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。腫瘍の性質に合わせた最適な治療戦略決定のための正確な腫瘍リスク分類システムの構築と、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が急務である。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では予後良好群ならびに予後不良群の神経芽腫サブセットを対象として、これまでに蓄積してきた神経芽腫の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データに、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でよりさらに発展させ、予後に強く関連するゲノムパターンの抽出と新規神経芽腫関連遺伝子の同定と解析を行う。

3. 研究の方法

1) マイクロRNA発現解析

解析対象は、臨床施設にて同意取得後千葉県がんセンター研究所に研究用に供与された神経芽腫組織から調製したtotal RNAである。まず約470種類のマイクロRNAを搭載したマイクロRNAチップを用いて、48症例（予後良好群19例、予後不良群16例、中間予後群13例）由来腫瘍RNAの発現プロファイルを行い、予後良好群、予後不良群間で発現レベルに差のあるプローブを検索した。同じ48検体について神経芽腫由来遺伝子発現チップによるmRNA発現解析を行い、約5000遺伝子についての発現データを取得した。各症例の生存期間に基づく統計解析により、診断後3年時点での患者予後に関して強く関連するマイクロRNAならびにmRNAの検索を行なった。マイクロRNAが発現調節する遺伝子の候補はTargetScanおよびPicTarデータベースに対して検索し、発現レベルが関連する遺伝子群を発現チップデータより抽出した。

2) エピゲノム解析

神経芽腫細胞株12種類について5-aza-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理によりDNAの脱メチル化を行い、回収した細胞よりtotal RNAを調製ののち、5-aza-dC未処理細胞由来のRNAとともに神経芽腫由来遺伝子発現チップを用いた発現解析を行った。脱メチル化処理前後の各遺伝子の発現レベルを比較し、有意

差があるものを抽出した。また、細胞株のゲノムDNAを調製し、Bisulfate法によるゲノムメチル化の有無の検証を行なった。解析対象の遺伝子については、プロモーター領域をクローニングし、Bisulfate処理前後の塩基配列を決定した。また、100例の神経芽腫症例由来腫瘍組織からゲノムDNAとRNAを調製し、定量的発現解析とBisulfate法によるゲノムメチル化の有無の検証を行なった。

4. 研究成果

1) マイクロRNA発現解析

約470種類のマイクロRNAを搭載したマイクロRNAチップを用いて典型的な予後良好群19例、予後不良群16例を含む48症例の発現プロファイルを行い、両群間で発現レベルに有意に差のあるプローブを抽出した。これらの予後に関連するマイクロRNAが発現調節すると予想される遺伝子の候補をデータベースより抽出するとともに、同じ48検体について神経芽腫由来遺伝子チップを用いた発現解析を行い、得られた約5000遺伝子のデータの中で発現レベルが両群で有意に異なる遺伝子群と比較した。上記により抽出したマイクロRNAが発現調節すると推測される遺伝子群のうち、実際の発現パターンが一致するものを抽出したところ約50遺伝子が候補として絞り込まれ、さらに約20の遺伝子が再現性をもって抽出された。発現差の大きい上位遺伝子群にはMYCNなど神経芽腫予後に強く関連する遺伝子が上位に選択され、マイクロRNAの発現が神経芽腫の予後に強く関連する重要な遺伝子群の発現調節を行っていることが改めて示された。さらに、同様の手法により、診断後3年時点での患者予後に関して強く関連するマイクロRNAを79種類抽出した。17種類の予後不良群で高発現するマイクロRNAのうち治療抵抗性と強く関連が示唆されている1qにマップされるものが5種含まれていた。一方、62種類の予後不良群で低発現のマイクロRNAのうち、進行神経芽腫の腫瘍でゲノム欠失が高頻度に見られる1p、19q、14qにマップされるものがそれぞれ5種、6種、9種含まれていた。今後は絞り込んだマイクロRNAについて定量PCRを進め、予後診断マーカーとして使用可能かどうかの検証と、他の予後因子との関連性の検討と予後マーカーとしての最適な組み合わせ法の吟味を行う。

2) エピゲノム解析

神経芽腫細胞株12種類についてDNAの脱メチル化前後の細胞由来RNAに対して神経芽腫由来DNAチップを用いた発現解析を行った。脱メチル化処理前後の各遺伝子の発現レベルが6種類以上の細胞株で異なるものを約100遺伝子選択し、同じ細胞株のゲノムDNAを用いたBisulfate法によるゲノムメチル化の有無の検証を行った。遺伝子発現解析から予後良好群で有意に高い発現レベルを示す遺伝子を中心に3つの遺伝子に絞り込み、細胞株を用いたBisulfateシーケンシングを行ったところ、うち1つの遺伝子で予後不良群腫瘍DNAにおけるゲノムメチル化を検出した。この遺伝子についてプロモーター領域のCpGアイランドのメチル化の有無を詳細に解析するとともに、100例の神経芽腫症例由来腫瘍組織を用いたゲノムメチル化の有無の検証を行なったところ、この遺伝子はmRNA発現レベル、ゲノムメチル化レベルともに神経芽腫の予後に強く相関しており(p<0.01)、新しい予後マーカーとなりうる事が示唆された。本遺伝子の機能についてはこれまでにほとんど報告がないため、今後は同遺伝子の神経芽腫細胞における機能解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Ohira M, Nakagawara A. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. *Cancer Sci*. 査読有, Vol.101, No.11, 2010, pp. 2295-2301.
- ② Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Masumoto K, Ohira M, Nakagawara A, Taguchi T. Concordance for neuroblastoma in monozygotic twins: case report and review of the literature. *J Pediatr Surg*. 査読有, Vol.45, No.12, 2010, pp. 2312-2316.
- ③ De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeek J, Van Maerken T, De Paep A, Laureys G, Schulte JH, Schramm A, Van Den Broecke C, Vermeulen J, Van Roy N, Beiske K, Renard M, Noguera R, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Kogner P, Martinsson T, Nakagawara A, Ohira M, Caron H, Eggert A, Cools J, Versteeg R, Speleman F. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed *ALK* mutation spectrum in tumors with *MYCN* amplification. *Clin Cancer Res*. 査読有, Vol.16, No.17, 2010, pp. 4353-4362.
- ④ Shi Y, Takenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Jiang LL, Kamijo T. HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 査読有, Vol.46, No.12, 2010, pp. 2324-2334.
- ⑤ Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamijo T. Bmi1 is a MYCN target gene and regulates tumorigenesis via repression of *KIF1B* β and *TSLC1* in neuroblastoma. *Oncogene* 査読有, Vol.29, No.18, 2010, pp. 2681-2690.
- ⑥ De Preter K, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris J, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A, Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schute J, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent datasets using a multi-gene signature. *Clin Cancer Res*. 査読有, Vol.16, No.5, 2010, pp. 1532-1541.
- ⑦ Suzuki I, Takenouchi T, Ohira M, Oba S, Ishii S. Robust model selection for classification of microarrays. *Cancer Inform*. 査読有, Vol.7, No.25, 2009, pp. 141-157.
- ⑧ Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y, Ozaki T, Isogai E, Kamijo T, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, Nakagawara A. High expression of *ncRAN*, a novel non-coding RNA mapped to 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Int J Oncol*. 査読有, Vol.34, No.4, 2009, pp. 931-938.
- ⑨ Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Sakai R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 査読有, Vol.28, No.5, 2009, pp. 662-673.
- ⑩ Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson D, Pinkel D, Feuerstein B, Nakagawara A. Novel risk stratification of

patients with neuroblastoma by genomic signature which is independent of molecular signature. *Oncogene* 査読有、Vol.27, No.4, 2008, pp. 441-449.

- ⑪ Li Y, Ozaki T, Kikuchi H, Yamamoto H, Ohira M, Nakagawara A. A novel HECT-type E3 ubiquitin protein ligase NEDL1 enhances the p53-mediated apoptotic cell death in its catalytic activity-independent manner. *Oncogene* 査読有、Vol.27, No.26, 2008, pp. 3700-3709.
- ⑫ Arai H, Ozaki T, Niizuma H, Nakamura Y, Ohira M, Takano K, Matsumoto M, Nakagawara A. ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma induced in response to retinoic acid. *Oncology Rep*, 査読有、Vol.19, No.6, 2008, pp. 1381-1388.
- ⑬ Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. Loss of imprinting of *IGF2* correlates with hypermethylation of the *H19* differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 査読有、Vol.99, No.11, 2008, pp. 1891-1899.
- ⑭ Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A. Expression of *TSLC1*, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is down-regulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int J Cancer* 査読有、Vol.123, No.9, 2008, pp. 2087-2094.
- ⑮ Hossain S, Ozaki T, Wang H, Nakagawa A, Takenobu H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma. *Oncogene* 査読有、Vol.27, No.46, 2008, pp. 6075-6082.
- ⑯ Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, Ozaki T, Nakagawara A. KIF1Bbeta functions as a haploidinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J Biol Chem*, 査読有、Vol.283, No.36, 2008, pp. 24426-24434.
- ⑰ Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A,

Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa A. Novel oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 査読有、Vol.455, No.7215, 2008, pp. 971-974.

- ⑱ Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Ohira M, Shinjo M, Kishida S, Kadomatsu K. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci*, 査読有、Vol.99, No.10, 2008, pp. 2070-2074.
- ⑲ Abe M, Watanabe N, McDonell N, Takato T, Ohira M, Nakagawara A, Ushijima T. Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology*, 査読有、Vol.74, No.1-2, 2008, pp. 50-60.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 大平美紀 他10名, Clinical application of genomic signature including ALK mutation to the new tumor risk classification for neuroblastoma. 米国癌学会総会(AACR)2010, 2010年4月18日, 米国・ワシントンDC
- ② 大平美紀 他10名, Risk stratification of neuroblastoma by genomic signature including ALK abnormality. 国際神経芽腫学会2010(ANR2010), 2010年6月24日, スウェーデン・ストックホルム
- ③ 大平美紀 他5名, Genomic and expression profiles specifically characterize therapy-resistant aggressive neuroblastomas. 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月23日, 大阪
- ④ 大平美紀 他7名, 神経芽腫のカスタム化遺伝子発現ミニチップのclinical validationと腫瘍リスク分類構築における意義の検討. 第52回日本小児血液学会総会・第26回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 2010年12月18日, 大阪
- ⑤ 大平美紀 他10名, High expression of ncRAN, a long non-coding RNA mapped to 17q25, is associated with aggressiveness and poor prognosis of neuroblastoma. 米国癌学会総会(AACR)2009, 2009年4月20日, 米国・デンバー
- ⑥ 大平美紀 他10名, マイクロアレイに基づく神経芽腫のリスク分類システムの構築. 第16回日本遺伝子診療学会, 2009年8月1日, 札幌
- ⑦ 大平美紀 他8名, 遺伝子発現プロファイル

に基づく神経芽腫の予後予測ミニチップシステム. 日本人類遺伝学会第54回大会, 2009年9月26日, 東京・品川

⑧大平美紀 他8名, Clinical application of genomic signature including *ALK* mutation to the new tumor risk classification system for neuroblastoma. 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月2日, 横浜

⑨大平美紀 他10名, ゲノム異常パターンに基づく神経芽腫の新規リスク分類の構築-*ALK*遺伝子異常とゲノムコピー数異常の統合解析. 第51回日本小児血液学会総会・第25回日本小児がん学会学術集会 合同開催, 2009年11月27日, 千葉・舞浜

⑩大平美紀 他16名, Practical application and validation of a customized expression microarray-based diagnostic system toward the new risk classification of neuroblastoma. 第13回国際神経芽腫学会 Advances in Neuroblastoma Research (ANR)2008, 2008年5月23日, 千葉・幕張

⑪大平美紀 他10名, Integrated analysis of genome copy number aberrations and its application for risk stratification for neuroblastoma. 第67回日本癌学会学術総会, 2008年10月29日, 名古屋

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

李 元元 (LI YUANYUAN)
千葉県がんセンター (研究所)・がん治療開発グループ・がん先進治療開発研究室・特別研究員
研究者番号: 00392259

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