

# 小児癌由来cDNAチップを用いた正常個体発生の遺伝子発現ネットワークの網羅的解析

●大平 美紀 ◆磯貝 恵理子 ◆中川原 章

千葉県がんセンター 生化学研究部

## ＜研究の目的と進め方＞

小児の腹部腫瘍である神経芽腫は、発生初期の神経堤細胞由来の神経芽細胞が交感神経系に向かって分化成熟していく過程で発症する（図1）。予後不良群と良好群に分けられ、後者では腫瘍細胞はしばしば正常に分化し、自然退縮する現象が見られる。各群の神経栄養因子への反応性から、神経発生において予後良好群は分化の最終段階を反映しており、また予後不良群はより早期の、神経堤から遊走分化している途中の未熟な細胞を反映するものと考えられる。

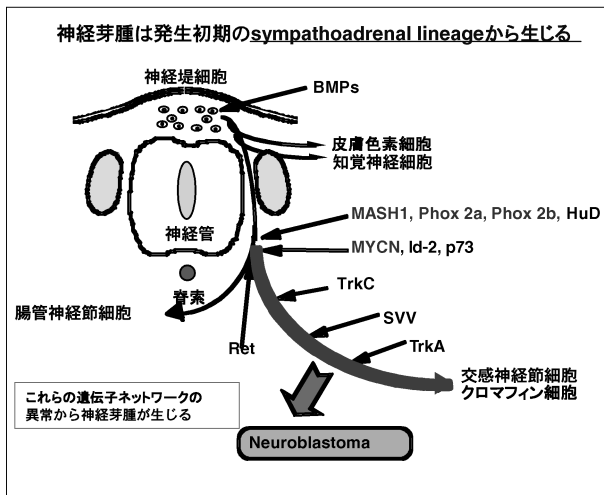


図1 神経芽腫は発生時のsympathoadrenal lineageから生じる

そこで本研究では、神経発生に関わる遺伝子発現ネットワークを大規模に解析することを目指し、神経芽腫に発現する遺伝子群の大量クローニングと、そのDNAチップの作製を行う。神経堤細胞から交感神経への正常な分化には、BMP2/4、bHLH転写因子であるMASH1、MYCNや、ホメオボックス転写因子のPHOX2A/2B等が重要な働きをしていることが明らかにされつつあるが、その遺伝子発現ネットワークについては未だ不明点が多い（総説、文献7）。本研究では、上記の神経芽腫から作製したDNAチップを用い、アデノウイルスベクター等を用いて神経芽腫細胞株に導入したMASH1、MYCN、PHOX2A/2B等により経時的に転写制御される遺伝子群を大量同定し、それらのネットワークを明らかにする。さらに、神経芽腫の分化・増殖能が異なるサブセット間で発現量の異なる遺伝子群についても同チップを用いて探索するとともに、それらの下流遺伝子の同定を行い、上記の転写因子により制御される遺伝子との関連性および神経芽腫における機能について詳細に解析する。神経芽腫の予後因子としてMYCNがん遺伝子やTrkAが良く知られているが、これらの遺伝子の中から臨床に結びつく新たな遺伝子が同定されることも期待される。

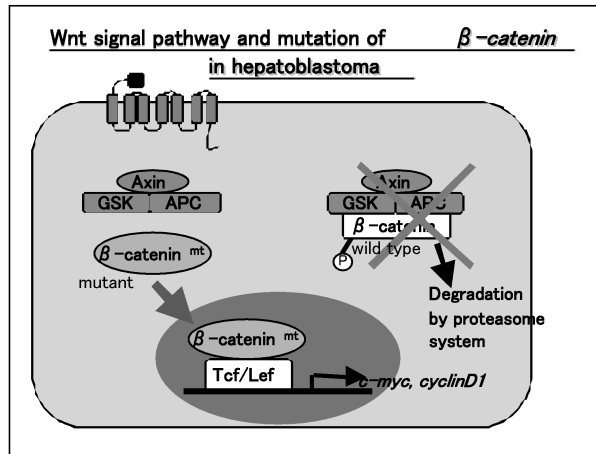


図2 肝芽腫では高頻度にb-cateninの変異がみられる

同様に、やはり胎児性腫瘍である肝芽腫は、当研究室の解析から、その約40%に $\beta$ -cateninの変異が見られ、肝発生にWntシグナルが重要な働きをしていることが示唆される（図2）。肝芽腫由来の遺伝子ソースは、肝発生における分子メカニズムの解明への利用が期待される。さらに腎芽腫からの遺伝子ソースも併せて構築し、神経芽腫由来遺伝子群と合わせることで発生初期に働く遺伝子に富む小児癌チップを作製し、神経、肝、腎の発生分化に関わる遺伝子群の同定および解析を目指す。

## ＜研究開始時の研究計画＞

神経・肝の発生分化における遺伝子発現ネットワークの解明と、神経芽腫・肝芽腫の発生および疾患メカニズムの解明を目指し、以下を行う。

- 1) 胎児性腫瘍由来遺伝子ライブラリーの作製  
オリゴキャッピング法により神経芽腫、肝芽腫、腎芽腫由来のcDNAライブラリーを作製する。
- 2) 胎児性腫瘍由来遺伝子のDNAチップ作製  
上記ライブラリーより得られたcDNAを搭載した独自の小児癌由来DNAチップを作製する。
- 3) 神経芽腫サブセット特異的遺伝子の探索とその解析  
神経芽腫の予後良好群および予後不良群の間で発現量に差のある遺伝子を探索する。
- 4) 神経発生関連転写因子群の遺伝子ネットワーク解析  
bHLH転写因子MASH1、MYCN、ホメオボックス転写因子PHOX2A、PHOX2Bを発現ベクターに組み込み、それぞれ神経芽腫細胞株に導入し、経時的な発現誘導系を構築する。上記DNAチップを用いて、発現量に変動が見られる遺伝子を探索し、上記遺伝子産物により転写調節を受ける遺伝子を同定する。
- 5) 肝芽腫特異的遺伝子の探索とその解析  
上記遺伝子ライブラリーから、肝芽腫と、それに対応する非癌部の間で発現の異なる遺伝子を探索する。

## 6) 小児癌遺伝子ソースの臨床における活用

3)-5)から同定した遺伝子について、神経芽腫あるいは肝芽腫の病態との関連について詳細な解析を行い、臨床での応用を行う。

### 〈研究期間の成果〉

#### 1) 胎児性腫瘍由来遺伝子ライブラリーの作製

神経栄養因子NGFに反応し、正常な分化能を持つ神経芽腫予後良好群と、増殖能が亢進し分化が抑制されている予後不良群の腫瘍組織からオリゴキャッピングcDNAライブラリー（平均インサート長：約2.5kb）を作製し、10,000クローンをランダムに単離した。（オリゴキャッピングcDNAライブラリーの作製は、東京大学医科学研究所・菅野純夫博士、鈴木稔博士のご援助を頂いた。）すべてのクローンについて両端シーケンシングを行い、データベースに対する相同性検索を行った結果、既知配列にあたらない新規クローンは約4割含まれていた。予後良好群と予後不良群の間でライブラリー中に高頻度に出現する既知遺伝子は明らかに異なっており、両者の生物学的性質の違いが遺伝子発現プロファイルに反映されていることが予想された（文献1、5、6）。異なるサブセットを材料として用いることで、神経系の遺伝子をより網羅することができると考えられた。

同様の方法により、やはり胎児性腫瘍である肝芽腫、腎芽腫由来の遺伝子ソースを構築した。前者では、b-cateninに変異がある肝芽腫、変異のない肝芽腫、及び非癌部の3つを出発材料とし、約12,000のオリゴキャッピングcDNAを単離した（文献9）。また後者では、腎芽腫および対応する小児腎非癌部から約12,000個のcDNAクローンを単離し、両端塩基配列の決定を終えた。本研究の小児癌遺伝子ソースには新規遺伝子が多量に含まれており、in situ hybridization等の結果（後述）から胎児期に特異的に発現する遺伝子が豊富に発現していることが示された。

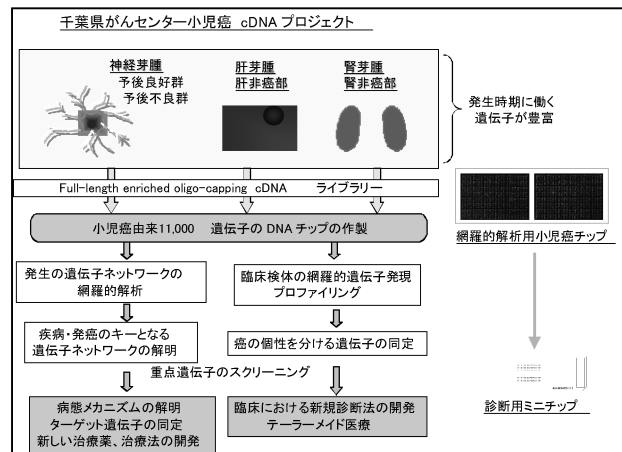
#### 2) 胎児性腫瘍由来遺伝子のDNAチップ作製

上記ライブラリーより得られたクローンの両端塩基配列の解析から、神経芽腫、肝芽腫、腎芽腫のライブラリーにはそれぞれ約5,000の独立遺伝子が含まれることが判明した。まず各腫瘍組織の遺伝子発現プロファイルに用いるため、腫瘍に特化した独自のDNチップを作製した。また、3種のライブラリー間の重複を除くと、小児癌遺伝子ライブラリーの独立遺伝子は約11000個であった。そこで、小児癌由来11000個のcDNAを搭載した小児癌由来DNAチップを作製し、網羅的に発生時期の遺伝子を解析できる体制を整備した。スポットティング法は均一で再現性の高い方法であるインクジェット方式を採用した。

続いて遺伝子ソースに対する独自データベースの構築を進めた。小児癌由来の11,000遺伝子を搭載したチップを用いて、16種類のヒト各種組織RNAを用いた発現プロファイリングを行い、各遺伝子の組織特異性を検討した。これまでに神経系組織特異的に発現を示す遺伝子を156個同定した。このうち29種類については特に成人及び胎児脳に限定した発現が見られた。これらのうち機能未知のものについてマウスホモログを単離し、マウス胎仔切片を用いたin situ hybridizationを進めている。また、4種類の神経芽腫細胞に対してレチノイン酸およびBMP処理により神経分化あるいは細胞死を誘導させ、処理前後の遺伝子発現プロファイリングを終えた。

#### 3) 神経芽腫サブセット特異的遺伝子の探索とその解析

神経芽腫の予後良好群および予後不良群の間で、発現量が有意に異なる遺伝子を各群16症例ずつを用いた半定量RT-PCRにより検索した（文献1、6）。予後良好群ライブラリーからの1842種類の遺伝子について検討を行ったところ、305種類の遺伝子において両群における発現量が異なっていた。このうち101種類は未知遺伝子であった。一部については定量real-time PCRにより差を確認した。予後良好群で高く不良群で低い発現を示す遺伝子群には、シナプス小胞輸送に関わる遺伝子（RABなど）や、神経堤由来細胞の分化増殖に関与する転写因子（TFAP2B）、接着分子、ホメオティック転写因子等のファミリーが多くみられ、これらは神経分化マーカーの新たな候補となると考えられた（文献6）。



サブセット間の遺伝的背景の違いは主にNGF受容体TRKAや癌遺伝子MYCNに制御されていると予想されるので、これらの神経細胞死/増殖シグナル伝達システムの一員として働く分子が含まれていると期待される。194個の差が見られた新規遺伝子の機能についても神経の分化増殖シグナルの経路に関与して来る可能性があり、今後の解析が必要と考えられた。これらの半定量PCRの結果は、新たな神経分化関連遺伝子の同定に結びつくと共に、その後のチップ実験を行う際に良いコントロールとなり、また、それぞれの方法の比較検討においても、非常に有用であった。

さらに、上記のような遺伝子を大量に検索するため、神経芽腫由来5,340種類の遺伝子を搭載したDNAチップを用いて、136症例の神経芽腫臨床検体を解析し、2つのサブセット間で顕著に異なる発現を示す757個の遺伝子を同定した。これまでに我々は、このような遺伝子の中からエンドセリン転換酵素様遺伝子（文献4）、Tubulin Tyrosine Ligase（文献10）、新規Neuronal Leucine-Rich RepeatファミリーNLRR3（文献8）、アポトーシス関連と予想されるBNIPドメイン遺伝子(BMCC1)、新規NEDD4型ユビキチンE3リガーゼ(NEDL1,2)（文献11）を同定し、神経芽腫における機能解析を行ってきた。これらの遺伝子は予後良好な神経芽腫で有意に高い発現を示し、神経分化に関わることが示唆されたほか、NEDL1については家族性筋萎縮性側索硬化症の病態に強く関わっていることが判明した。また、LIM-only proteinファミリーの一つであるLMO3について詳細な解析を行った（文献14）。LMO3は増殖能の強い神経芽腫で有意に発現が上昇しており、basic helix-loop-helix蛋白質であるHEN2と結合することにより、神経芽腫において細胞増殖を亢進させoncogene様に機能することが判明した。またこれら2つ

の遺伝子の高発現が神経芽腫の予後の悪さと強く相関し、新たな予後因子として利用できることを示した。これらの遺伝子は神経芽腫の予後とも強く相関し、新規の予後マーカーとしても利用できることがわかった。このように、神経発生に重要と考えられる遺伝子の探索と絞り込みを進めた。

#### 4) 神経発生関連転写因子群の遺伝子ネットワーク解析

神経堤細胞から交感神経への正常な分化・増殖に関わるbHLH転写因子MASH1と、その下流のホメオドメイン転写因子PHOX2A/2Bをアデノウイルスベクターに組み込み、2種類の神経芽腫細胞株で経時的に発現させ、小児癌チップを用いた遺伝子発現解析を行った。PHOX2A/2Bの過剰発現では、下流とされるRet、DBH、THの発現は変化せず、MASH1の発現が誘導された。すなわち神経芽腫ではPHOX2A/2Bの下流の神経分化につながる発現ネットワークがブロックされ、正常では発生初期に一過性にのみ発現するMASH1が、PHOX2A/2Bにより恒常的に高い発現を維持され、交感神経細胞の増殖亢進が起こっていることが明らかになった。

この他約200個の新規の下流遺伝子候補を同定した。

神経の分化増殖を担っているとされ、神経芽腫予後不良タイプで高頻度に増幅が見られるMYCN遺伝子については、テトラサイクリン除去によりMYCNが発現誘導される神経芽腫細胞株を用いた。これまでにMYCNにより発現制御を受ける新規遺伝子を4種類同定した。これら遺伝子の上流にMYCN結合配列も確認した。これらは神経芽腫サブセット間で発現が異なる遺伝子として既に同定していたものでもあった（前項参照）。

#### 5) 肝芽腫特異的遺伝子の探索とその解析

b-cateninに変異がある肝芽腫、変異のない肝芽腫、及び非癌部の3つを出発材料として合計約12,000 cDNAクローンからなる遺伝子ソースを調製し、約5,000の独立遺伝子のチップ作製を行った。また、半定量RT-PCRによる癌部と非癌部の間で発現に差のある遺伝子のスクリーニングを行い、PLK1などの87個の遺伝子を同定した（文献9参照）。

#### 6) 小児癌遺伝子ソースの臨床における活用

本研究で作製したチップを臨床に役立てるため、神経芽腫症例の遺伝子発現プロファイル解析から、患者予後と強く相関する上位70遺伝子を抽出し、これに基づくweight vote法による予後予測アルゴリズムを構築するとともに、leave-two-out法（leave-one-out法の二重化）によって妥当性の検証も行った。当然ながら、これらの予後関連遺伝子群は多くの上記サブセット特異的遺伝子を含んでいた。さらに予後に関わる上位200遺伝子を搭載した神経芽腫診断用チップを新たに作製し、独立な腫瘍サンプルの解析と予後予測を行ったところ、予測アルゴリズムは約89%の正解率を示した（文献12、13参照）。現在本チップの臨床応用に向けての最終評価を行っている。このように本研究では、成果を迅速に臨床に還元するため、抽出した遺伝子について臨床サンプルを用いて評価するシステムを整備している。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

神経芽腫、肝芽腫、腎芽腫由来の遺伝子ソースおよびDNAチップは国内外でもユニークなものであり、また解析可能な小児癌臨床サンプル数（神経芽腫：約1500、肝芽腫：約200）も国内外で随一である。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

研究はほぼ順調に進めることができた。

#### 〈今後の課題〉

本研究の遺伝子ソースに対する様々な公知の遺伝子オントロジー情報のリンクが次の課題である。特に小児癌由来遺伝子ライブラリーには機能未知のものが多く含まれており、それらの機能解明のヒントとなる情報を効率よくドメイン検索、発現パターン解析などで付加してゆきたい。また、本研究では、神経芽腫の異なるサブセットや肝芽腫及び正常肝の遺伝子発現プロファイリングを行ってきた過程で、発現差を示す遺伝子を大量に同定してきた。今後も各遺伝子に神経分化への関与や細胞増殖への関与等の実験に裏打ちされた独自のアノテーションを付加するとともに、情報処理の専門家との共同により公知データベースの情報を統合させる予定である。これらの情報は発生の遺伝子発現ネットワークを理解する際に重要なヒントとなるとともに、疾病関連遺伝子の解析において、ポストゲノム時代における次世代のゲノム研究の良いモデルケースとなると期待される。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文/プロシーディング

1: 0601301607

Ohira M, Shishikura T, Kawamoto T, Inuzuka H, Morohashi A, Takayasu H, Kageyama H, Takada N, Takahashi M, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Kuma H, Nozawa I, Nakagawara A.

Hunting the subset-specific genes of neuroblastoma: expression profiling and differential screening of the full-length-enriched oligo-capping cDNA libraries. *Med Pediatr Oncol.* 35(6):547-9 (2000).

2: 0601301613

Ichimiya S, Nimura Y, Kageyama H, Takada N, Sunahara M, Shishikura T, Nakamura Y, Sakiyama S, Seki N, Ohira M, Kaneko Y, McKeon F, Caput D, Nakagawara A.

Genetic analysis of p73 localized at chromosome 1p36.3 in primary neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol.* 36(1):42-4 (2001).

3: 0601301619

Chen YZ, Hayashi Y, Wu JG, Takaoka E, Maekawa K, Watanabe N, Inazawa J, Hosoda F, Arai Y, Ohki M, Mizushima H, Morohashi A, Ohira M, Nakagawara A, Liu SY, Hoshi M, Horii A, Soeda E.

A BAC-based STS-content map spanning a 35-Mb region of human chromosome 1p35-p36. *Genomics* 74(1):55-70 (2001).

4: 0404082206

Kawamoto T, Ohira M, Hamano S, Hori T, Nakagawara A.

High expression of the novel endothelin-converting enzyme genes, Nbla03145/ECEL1alpha and beta, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Int J Oncol.* 22(4):815-22 (2003).

5: 0404082220

Ohira M, Morohashi A, Nakamura Y, Isogai E, Furuya K, Hamano S, Machida T, Aoyama M, Fukumura M, Miyazaki K, Suzuki Y, Sugano S, Hirato J, Nakagawara A.

Neuroblastoma oligo-capping cDNA project: toward the understanding of the genesis and biology of neuroblastoma. *Cancer Lett.* 197(1-2):63-8 (2003). Review.

6: 0404062031

Ohira M, Morohashi A, Inuzuka H, Shishikura T, Kawamoto T, Kageyama H, Nakamura Y, Isogai E, Takayasu H, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Goto T, Sato S, Nakagawara A.

Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets. *Oncogene* 22(35):5525-36 (2003).

7: 601272054

Nakagawara A, Ohira M.

Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model. *Cancer Lett.* 204(2):213-24 (2004). Review.

8: 601272109

Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A.

Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLR) family genes and inverse association of expression of Nbla10449/hNLR-1 and Nbla10677/hNLR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int J Oncol.* 24(6):1457-66 (2004).

9: 601272125

Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Hirata T, Goto T, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A.

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(35):5901-11 (2004).

10: 601281650

Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A.

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(3):365-75 (2004).

11: 601281900

Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A.

NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279:11327-35 (2004).

12: 601281700

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(4):337-50 (2005).

13: 601281722

Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A.

A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* 228(1-2):5-11 (2005). Review.

14: 601281745

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(1):4587-97 (2005).

2) データベース/ソフトウェア

神経芽腫由来遺伝子5,340個を搭載したチップの詳細についてNCBI Gene Expression Omnibus (accession number GSE2283) にて公開している。