

小児がん由来遺伝子材料を基盤とした疾病関連遺伝子の探索と病態解明への応用

●大平 美紀¹⁾ ◆磯貝 恵理子¹⁾ ◆中川原 章²⁾ ◆大羽 成征³⁾

1) 千葉県がんセンター研究所・臨床ゲノムセンター・がんゲノム研究室 2) 同・がん先進治療開発研究室 3) 京都大学大学院・情報学研究所

<研究の目的と進め方>

小児腹部腫瘍である神経芽腫は、増殖能が強く悪性の予後不良群と、腫瘍細胞が分化し自然退縮する予後良好群の2つのサブセットに分けられる。後者の細胞は、神経栄養因子に反応し神経へ分化することから、正常に近い神経分化増殖機構を保持し、個体発生における神経の分化・細胞死に働く重要な遺伝子の働く場となっていると考えられる。そこで本研究では、このような小児癌由来の未分化な環境下で働く希少な遺伝子ソースを活用し、疾患に結びつく発生時期の重要な遺伝子発現ネットワークと病態メカニズムの解明をめざす。これまでに、神経芽腫、肝芽腫、腎芽腫からの約13,000遺伝子の自家製DNAチップを作製し、200症例の神経芽腫の網羅的遺伝子発現解析から、神経芽腫のサブセット間で発現が異なる700個の遺伝子を同定した。本研究では、約半数が機能未知の遺伝子であるこれらの遺伝子について、様々なスクリーニングによるデータベース構築と解析を進め、神経発生や神経芽腫の病態に強く関わるものを絞り込む。また、これらの遺伝子の小児癌診断チップを作製し、各種臨床因子を取り入れた統計的シミュレーションを行い、臨床応用を目指したシステムの構築を行う。同様の手法を肝芽腫（小児の肝癌）にも応用する。

<2008年度の研究の当初計画>

- ①神経芽腫の予後の異なるサブセット間で発現レベルに差のある約700個の遺伝子について、公知データベースに対する翻訳産物のドメイン検索を行い、データベース化を進める。これまでに蓄積した臓器別や細胞株間の発現パターンや、プライマリー腫瘍における発現パターン、染色体マップなどの情報等から重要と考えられる遺伝子について、神経芽腫などの細胞株を用いた遺伝子導入実験を行い、細胞増殖や細胞死に対する影響を検討する。
- ②神経芽腫臨床検体の5000個の遺伝子発現プロファイルに対して部分教師付き特徴抽出ならびにクロス解析を行う。神経芽腫の各サブセットで発現クラスターを抽出するとともに、神経発生・分化に関与する転写因子群や本研究で絞り込んだ遺伝子と同様のプロファイルを示す遺伝子群の探索を進める。
- ③神経芽腫の予後と強く相関する200個の遺伝子を搭載した診断用チップの臨床における実用化を進める。我々はこれまでに、ゲノムコピー数異常のパターンも遺伝子発現とは独立の因子として神経芽腫の予後に強く相関することを明らかにした。そこで、神経芽腫の遺伝子発現データにゲノムコピー数異常データを加え、新しい診断システムを構築する。また、期待性能と安定性をシミュレーションによって評価する方法の開発を行う。組織バンクのサンプルを用い、診断用発現ミニチップ、ゲノムチップ、および定量PCR解析を組み合わせて、結果の検証を随時進める。

<2008年度の成果>

- ①神経芽腫の予後の異なるサブセット間で発現に差のある700個の遺伝子群から、LMO3、HEN2などの癌遺伝子、神経芽腫の分

化・増殖に関与するBMCC1など16種類以上の遺伝子を新規に同定・解析してきた。今年度は新たに神経芽腫細胞増殖に関与すると予想される2つの遺伝子に注目し解析を進めた。そのうちの1つは、神経芽腫で高頻度に増加することが知られる17番染色体q25領域に座位し、進行神経芽腫において特異的に高発現を示す新規遺伝子であった。小児がん遺伝子ライブラリーにはこの遺伝子のalternative splicing formに対応する2種類のクローン（約2kb）が含まれていた。それぞれのフォームのmRNA発現レベルが予後不良タイプの神経芽腫で有意に高いこと($p<0.001$)、ならびに、cDNAの構造解析とウエスタン解析等の結果からこの遺伝子が新規非コードRNAであることが示唆されたので、我々はこれをncRAN (non-coding RNA expressed in aggressive neuroblastoma)と名付け、さらに細胞増殖における機能を検討した。NIH3T3細胞を用いたmRNAレベルで高発現させたソフトアガーアッセイと、17番染色体がゲノム上で増加した神経芽腫細胞を用いたsiRNAによるmRNAのノックダウン実験の結果から、ncRANのmRNAレベルの高発現は、神経芽腫において細胞増殖亢進に関与していることが示唆された。また、この遺伝子の発現レベルは、神経芽腫の既知の予後因子である病期や診断時年齢ならびにMYCN遺伝子の発現レベルとは独立の新規予後因子となりうることを示された。

- ②癌遺伝子LMO3やMYCNが関わるMASH1などの神経発生・分化関連転写因子群の転写制御機構について解析を進めた。発生初期の神経組織におけるこれらの遺伝子の発現の追跡を目的に、遺伝子導入マウス胚の作製を進行中である。
- ③全国の小児がん臨床施設の協力を得て、独自に開発した神経芽腫の診断チップ（約90%の予測効率、OHIRA et al, Cancer Cell 2005）のclinical validationを進めている。今年度は、新規登録症例を含め約150症例のデータを蓄積し、予後のフォローアップを継続中である。また、システムのさらなる改良のため、本診断チップの次バージョンを作製し、最適な予後関連遺伝子の選択法の検討と予測アルゴリズムの構築を行った。これまでに240症例を用いて蓄積したゲノムコピー数異常データを組み合わせた新しい予後分類のシミュレーションを加えたところ、精度(安定性)向上が期待できることが示された。一方、188例の神経芽腫のゲノムコピー数異常の解析から、2番染色体短腕のがん関連チロシンキナーゼ遺伝子ALKの増幅と変異を見いだした。ALKについては阻害剤の開発が各所で進められており、本遺伝子の変異を持つ症例については、今後阻害剤を導入した新規治療法の開発が期待される。本研究においても、腫瘍リスク分類システムにALK遺伝子変異を取り入れることを念頭に、今後この遺伝子の神経芽腫における意義付けを行う予定である。

<国内外での成果の位置づけ>

臨床との連携による実際のチップ診断システム構築が進んでおり、この取り組みは欧米の先駆となっている。また、本研究の

基盤である小児がん組織バンクと遺伝子ライブラリーの活用も国内外においてユニークなものであり、上記診断システムの実用化が可能であったほか、新たな神経芽腫悪性化に関わる遺伝子を多数見いだした。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

小児癌由来遺伝子ライブラリーには既知の機能ドメインを持たず、機能が明らかでない遺伝子が未だ多く含まれており、それらへのアプローチは非常に難しい。また、遺伝子ライブラリー中のクローンの一部に、配列上 open reading frame が見られない分子が見られるが、本来タンパク質をコードしない非コード RNA 由来かどうかを示すことは実験上非常に困難である。このような分子についての定義や解析法は未だ確立されていないため、公知の非コード RNA のデータベースに対する構造的なホモロジー検索を行う等試行錯誤が必要と考えている。

<今後の課題>

神経ならびに神経芽腫の分化・増殖に関わる LMO3 や MASH1、MYCN 等の転写ネットワークの新たな重要遺伝子を絞り込むとともに、我々の小児がん遺伝子ライブラリーにも多数含まれ、近年がんへの関与が明らかになってきた非コード RNA の発現解析を組み合わせ、新しい疾患メカニズムを明らかにしたい。本年度同定した長い非コード RNA についても、神経芽腫の細胞増殖亢進への関与が示唆され、機能性 RNA として今後さらなる解析が必要と考える。また、これまでに蓄積した腫瘍の遺伝子発現プロファイル、ゲノムコピー数異常の網羅的な情報、臨床情報の3つのデータに対して、マシン学習の手法を導入し、新たながん関連遺伝子の同定・解析とそれらの臨床への応用を目指す。神経芽腫には、転移を伴う強い増殖の後、劇的な細胞死を起こし腫瘍が自然に退縮するタイプが存在する。これらの症例に注目し、遺伝子発現プロファイルからこの特殊なサブタイプに特有な遺伝子の探索を行いたい。

本研究は、引き続き医療への応用を主眼とし、小児がん診断用チップシステムの改良と、全国の小児がん臨床施設との密なネットワークを今後も充実させるほか、国外の研究グループとの情報交換と共同研究を進めていきたいと考えている。

<成果公表リスト>

1)論文/プロシーディング

1. 0901161752

Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y, Ozaki T, Isogai E, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, Nakagawara A. High expression of *ncRAN*, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Int. J. Oncol.* in press, 2009.

2. 0811172140

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. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455: 971-4, 2008.

3. 0811172125

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.* 283: 24426-34, 2008.

4. 0811172109

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* 27: 6075-6082, 2008.

5. 0806271257

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* 123: 2087-94, 2008.

6. 0811172048

Honda S, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Ohira M, Matsunaga T, Yamaoka H, Horie H, Ohnuma N, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y. The methylation status of RASSF1 promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int J Cancer* 123: 1117-25, 2008.

7. 0811172032

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* 27: 3700-9, 2008.

8. 0801300144

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.* 19: 1381-8, 2008.

9. 0710191937

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* 27: 441-449, 2008.

2)データベース/ソフトウェア

NCBI Gene Expression Omnibus データベースにて神経芽腫186症例の遺伝子発現プロファイルと236症例のゲノムコピー数異常データを公開している。(GSE2283, GSE5784)