

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⁾ ◆大羽 成征²⁾ ◆中川原 章¹⁾

1) 千葉県がんセンター 生化学研究部 2) 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科

＜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ユニーク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11,000遺伝子のオリジナル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。しかし、これらの約半数が機能未知の遺伝子であった。そこで本研究では、チップ上の遺伝子に様々な機能アノテーション情報を統合することにより、これらの遺伝子の中から特に神経発生や神経芽腫の病態に強く関わっているものを効率良く絞り込む。同様の手法を肝芽腫（小児の肝癌）にも応用する。

＜2007年度の研究の当初計画＞

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、以下を行うこととした。

- ①チップ化した小児癌由来の11,000遺伝子について、機能未知遺伝子が約3割含まれるため、小児腫瘍組織やマウス胎仔における発現パターンや分化誘導・細胞死誘導時の細胞株を用いた実験系による独自のデータベース構築を進める。
- ②上記のデータベースをもとに、神経芽腫サブセット間ならびに肝芽腫の癌部非癌部間で発現量の異なる遺伝子（それぞれ700個、87個）について、神経発生、肝発生に重要と考えられる遺伝子を絞り込み、臨床検体を用いた発現解析、ゲノム解析を行うとともに、対象遺伝子の機能解析を行う。
- ③神経芽腫臨床検体の遺伝子プロファイルについて部分教師付き特徴抽出法を導入し、様々なクロス解析を行う。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。
- ④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。

＜2007年度の成果＞

- ①小児癌組織由来の13,000遺伝子のチップを用い、a)分化あるいは細胞死の誘導前後の神経芽腫細胞の遺伝子発現、b)神経発生分化に関与するとされる転写因子（MASH1、MYCNなどのbHLH転写因子群およびホメオドメイン転写因子PHOX2A/Bな

ど）を導入した神経芽腫細胞株の経時的な発現プロファイル、c)神経分化型細胞、シュワン型細胞、および中間型の3種類の神経芽腫細胞株の発現プロファイルなどと、特徴抽出法を組み合わせて、独自のデータベースの構築を進めた。

- ②これまでに前述の700個の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遺伝子群から、癌遺伝子様に働くLMO3、HEN2や、神経芽腫の分化・増殖制御に関与する新規遺伝子BMCC1など15種類以上の遺伝子を同定・解析してきた。今年度はデータベース中の遺伝子の染色体マップをもとに、神経芽腫で高頻度に欠失あるいは増加するゲノム領域にある遺伝子群に注目し、機能アノテーションから、新たに神経の細胞増殖調節に関与すると予想される2つの遺伝子をピックアップして解析を進めた。このうち一つは11番染色体に座位し、肺癌のがん抑制遺伝子として報告があるイムノグロブリンスーパーファミリーのメンバーであった。この遺伝子は、増殖能の強い神経芽腫で有意に低い発現を示した(p=0.0073)。そこでこの遺伝子産物の神経芽腫細胞における細胞増殖能を検討したところ、過剰発現下において神経芽腫細胞のコロニー形成能の抑制が見られ、また、ロックダウン時には細胞増殖能の亢進が見られた。肺癌においては腫瘍組織における本遺伝子のプロモーターのゲノムメチル化が発現低下に関与することが既に報告されているが、神経芽腫細胞株および神経芽腫腫瘍組織ではメチル化修飾はほとんど認められなかった。以上のことから、この遺伝子が神経芽腫においてはメチル化以外の別の転写制御を受けていることが示唆された。今後はその転写制御の詳細についての解析や遺伝子変異の検索を行い、病態との関連について解析を進める。

- ③神経発生・分化に関与するbHLH転写因子群MASH1やMYCN等と同様の発現の挙動を示す遺伝子群の探索のなかから、これまでに上記②で予後不良タイプの神経芽腫で発現レベルの高い遺伝子として同定したLMO3（Aoyama et al, Cancer Res. 2005）が含まれていた。そこで本年度はLMO3によって転写制御される下流遺伝子の探索を目的に、神経芽腫細胞株にLMO3遺伝子を導入し、小児癌由来11000遺伝子のチップを用いて非導入細胞株との遺伝子発現プロファイル比較を行った。LMO3過剰発現により発現が上昇する遺伝子群には神経の交感神経系への分化に関わるホメオボックスタンパク質やrasスーパーファミリーがみられ、特に前者はMASH1の転写に密接に関わることから、LMO3が初期神経発生において重要な役割を担っていることが強く示唆された。LMO3と相互作用するHEN2による転写制御についても同様の手法で解析を進めている。これらの転写ネットワークから神経芽腫の増殖維持のメカニズムや病態への関与を明らかにするためのヒントになると期待される。

④全国の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を進めた。これまでに新規80症例についてのデータを蓄積しフォローアップを継続中である。さらに改良を行うため、本診断チップの次バージョンの作製を開始するとともに、最適な予後関連遺伝子の選択法と予測アルゴリズムのシミュレーションを行っている。新しい試みとして既に取得済みのゲノムコピー数異常データ(Tomioka et al, Oncogene 2008)を組み合わせた予後分類のシミュレーションも着手した。神経芽腫の予後との関連において、これまでに解析した112症例の解析結果では、ゲノムコピー数異常パターンは遺伝子発現による予後分類と統計的に独立の因子となりうることを示されたことから、神経芽腫遺伝子発現パターンのみでも高い精度で予後が分類できるが、ゲノムコピー数異常パターンはその予測精度をさらに安定に向上させる可能性が示唆された。今後臨床での精度の高い予後分類に適用するため、これらのゲノム情報を合わせて蓄積し、予後予測プログラムのさらなる向上を図る。

<国内外での成果の位置づけ>

独自の小児癌由来遺伝子ソースから神経芽腫の予後の異なるサブセット間で発現の異なる遺伝子および肝芽腫で特異的に発現する遺伝子を大量に同定し、そのデータベースを構築した。また、国内外でも有数の規模となっている当センターの小児がん組織バンクを背景に、多検体の臨床サンプルの遺伝子発現データおよびゲノムコピー数異常データもデータベースとして一部を既に公開している (NCBI GEO, GSE2283, GSE5784)。これらのデータをもとに統計的に抽出した神経芽腫の予後予測遺伝子 200 個からなる予後診断システムは世界に先駆けて実用化に漕ぎ着けたものであり、世界の神経芽腫の研究コミュニティに遺伝子情報とアルゴリズムが有効に利用されている。以上のように、本研究の遺伝子ソース、診断チップ、予後予測アルゴリズムは全て世界でもユニークなものであり、ゲノム情報の臨床への実際的な応用の1つのモデルとなっている。

<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ないなど未だ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、non-coding RNA 由来と考えられる分子などユニークな遺伝子構造をもつものも多々見つかっており、このような分子についての解析法は未だ確立されてはいないため、試行錯誤が必要である。機能未知の遺伝子の解析については国内外の様々な遺伝子機能データベースや発現ネットワークデータベース等の情報も重要なヒントになると考えられるが、自家製データベースとのリンクは煩雑であり、いかに情報を整理して効率よく得るかが課題である。

<今後の課題>

神経の分化・増殖および神経芽腫細胞の増殖に関わる LMO3, HEN2 や MASH1、MYCN 等の転写ネットワークの新たな重要遺伝子を探索し、病態に関与する鍵分子の特定を目指す。次の取り組みとして、がんへの関与が最近明らかになってきた miRNA の臨床サンプルにおける発現パターン解析を組み合わせ、これまでに蓄積した腫瘍組織の発現プロファイルやゲノム異常パターンと、miRNA の標的遺伝子データベースとを比較することにより、新しい疾患メカニズムを明らかにしたい。また、これらの網羅的な情報と臨床データに最新のマシン学習の手法を取

り入れ、新たな臨床への応用を目指す。さらには、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。これまでに同定した腫瘍サブタイプ特異的遺伝子の解析を進めるとともに、これらの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を検索・解析し、そのメカニズムの解明を目指す。

本研究成果の医療への応用としては、小児がん診断用ミニチップのシステムの改良のため、遺伝子発現およびゲノムコピー数異常パターン等のゲノム情報を最適なアルゴリズムと組み合わせ、これまでに整備した小児がん組織バンクと全国臨床施設との強いネットワークを生かして、臨床現場にて迅速に有効利用できるシステムの開発を行いたい。さらなる改良を目指し、世界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。神経芽腫の予後診断チップをモデルとして、肝芽腫・腎芽腫等の癌やその他の疾患にもノウハウを生かし、実用化を進めたい。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 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.G., Pinkel, D., Feuerstein, B.G., and Nakagawara, A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*, 27, 441-449 (2008)

2. 0710192044
Kurata, K., Yanagisawa, R., Ohira, M., Kitagawa, M., Nakagawara, A., and Kamijo, T. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene*, in press (2008)

3. 0801300144
Arai, H., Ozaki, T., Niizuma, H., Nakamura, Y., Ohira, M., Sugita, K., and Nakagawara, A. ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma and induced in response to retinoic acid. *Oncology Rep.*, in press (2008)

4. 0702141415
Kaneko, S., Ohira, M., Nakamura, Y., Isogai, E., Nakagawara, A., and Kaneko, M. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/ overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 133, 185-192 (2007).

5. 0702141435
Nakamura, Y., Ozaki, T., Niizuma, H., Ohira, M., Kamijo, T., and Nakagawara, A. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.*, 354, 892-898 (2007).

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)