

(平成 23 年度研究報告書)

課題番号 4 神経芽腫の増殖・分化機構の解明による新規治療法の開発

上條 岳彦 千葉県がんセンター(研究所) 発がん研究グループ

## 研究の分類・属性

基礎系

## 研究の概要

神経芽腫は小児固形がんでは脳腫瘍について症例数が多く、進行例では5年生存率30%台と予後不良である。本研究の目的は、難治性小児固形腫瘍である神経芽腫の治療成績向上に向けて、神経芽腫の予後因子・その関連分子の機能解析をさらに進捗させ、新たな治療法開発の基盤を形成することである。特に重点を置く新規治療法開発としては1. 神経芽腫分化・細胞死誘導療法の改良を目指した標的療法、2. 新規膜型受容体・ALKの増殖シグナルの分子機構を追求し、下流分子を標的とする阻害剤探索、3. 神経芽腫に対するセンダイウイルス/樹状細胞を用いた放射線併用免疫遺伝子治療などである。

研究の進展については、1については特に神経芽腫のエピゲノム異常の解析による新規治療法の開発が進行しており、ポリコム分子及びゲノムメチル化阻害剤の応用を目指した研究が進行している。さらに、MYCN トランスジェニックによる神経芽腫モデルの解析によって、(1) 神経・がんの幹細胞性を担う分子 (2) ノックダウンにより MYCN 増幅と合成致死を示す分子、この2つのカテゴリーからの治療分子標的を同定研究も進展した。現在、難治性神経芽腫新規治療法開発を目指して新規リード化合物を取得すべく、低分子化合物のスクリーニング系について研究支援を行っている公的機関にセンターにコンサルトしている。2については ALK に結合する蛋白質として ShcC、IRS-1/2、SOS1/2、PI3K、ZO-1/2 など既知の分子群に加え、質量分析による解析によって Flotillin1 と SH2B など蛋白質安定性や局在を制御する分子を見つけ、機能解析が進展した。また、ALK による Ret の制御系、ALK による Cas の制御系が明らかになった。さらに ALK と Shf の物理的結合、神経芽腫発がん機序での生物学的役割が明らかになった。3については、よりヒト神経芽腫に近い治療モデル系として、放射線前照射併用センダイウイルス/樹状細胞療法を進展させている。さらに、小児担がん患者の末梢血単球から分化させた樹状細胞のセンダイウイルスによる活性化の有無の検討」に関しては、臨床試験の実施予定施設である九州大学病院の倫理委員会の承認を得て実施した。また、「センダイウイルス/樹状細胞を用いた放射線併用免疫遺伝子治療」の臨床試験計画書も現在、関連大学病院の倫理審査委員会に申請中である。

## 平成 23 年度研究経費

11,565 千円

## 研究班の組織

上條岳彦	千葉県がんセンター・発がん 制御研究グループ・部長	神経芽腫における分子標的の同定と新規治療開発
中川原章	千葉県がんセンター・がん先 進治療開発室・センター長	神経芽腫に特化した新規遺伝子を標的とする治療法の開発
堺 隆一	国立がん研究センター・転移 浸潤シグナル研究分野・分野 長	神経芽腫の進展制御シグナルの解明
門松 健治	名古屋大学大学院医学系研 究科・教授	神経芽腫治療法開発へのモデル動物の応用

田尻 達郎	京都府立医科大学大学院医学研究科小児外科 教授	神経芽腫に対するセンダイウイルスベクター導入樹状細胞を用いた遺伝子治療の開発
藤村雄一	理研・免疫アレルギー総合科学センター・研究員	神経芽腫におけるポリコーム蛋白質によるクロマチン制御の網羅的解析
浅田潔	国立がん研究センター・エピゲノム解析分野・主任研究員	神経芽腫のエピジェネティック治療の開発

## 研究の目的と到達目標及び実績要点

### 全期間

(目的と到達目標) :

神経芽腫は小児固形がんでは脳腫瘍について症例数が多く、進行例では5年生存率30%台と予後不良である。本研究の目的は、難治性小児固形腫瘍である神経芽腫(NB)の治療成績向上に向けて、NBの予後因子・その関連分子の機能解析をさらに進捗させ、新たな治療法開発の基盤を形成することである。特に重点を置く新規治療法開発としては1. 神経芽腫分化・細胞死誘導療法の改良を目指した標的療法、2. 新規膜型受容体・ALKの増殖シグナルの分子機構を追求し、下流分子を標的とする阻害剤探索、3. NBに対するSeV/DCを用いた放射線併用免疫遺伝子治療などである。

### 第2年次

(到達目標)

1. (上條、藤村、浅田)NBがん幹細胞を標的とした治療法の開発は、ATRAと新規MRD治療薬の併用療法を開発を目指してBMI1およびCD133の機能解析を基にH23~24で基盤を開発する。がん幹細胞性因子の機能解析、がん幹細胞性因子とATRAの併用作用の同定、その分子機構の解析、低分子化合物のスクリーニングを研究期間中に実施することを目標とする。さらに班内の共同研究によって神経芽腫エピゲノムが発がんおよびがん幹細胞性に与える影響を検討し、治療法開発への基盤データを得る。DNAメチル化のNBへの影響の検討は、in vivoで脱メチル化剤が同様の効果を示すか否かを明らかにし、将来ヒトで臨床試験を実施する際に有用な基礎データを集積する。また、脱メチル化剤によって腫瘍増殖抑制効果を認めた場合、正常細胞における増殖抑制作用(副作用)の程度を評価する。

2. (塚)近年ALKの増幅や活性型変異が神経芽腫の発症に関わることが示された。このALKの下流シグナルに焦点を当て、ALKの活性化による蛋白質チロシンリン酸化の異常を解析することで神経芽腫特有のシグナル異常の本態を解明し、治療標的分子を提唱することを目的とする。野生型および報告されたALKの種々の活性型変異に対して神経芽腫における細胞内チロシンリン酸化蛋白質群を解析し、神経芽腫の特性につながる細胞内シグナルを解明する。さらに、これまで解析を進めてきたShcC、Cas、Retなどの神経芽腫におけるALK下流分子としての意義について解析を進める。

(中川原) 1 ALKとShfの結合を再確認し、両蛋白質の細胞内局在を明らかにする。2 ALK蛋白質とShf蛋白質の結合領域を明らかにする。3 神経芽腫細胞を用いてShfの細胞内過剰発現およびsiRNAによる内在性Shfの発現抑制実験を行う。

3. (田尻) 国産新規遺伝子治療ベクターであるセンダイウイルスベクター導入樹状細胞(SeV/DC)による抗腫瘍効果を見出し、高い効果を得ることに小動物を用いた前臨床研究で成功した。その抗腫瘍メカニズムの解析を追加研究するとともに、神経芽腫に対する新規治療法の確立を目指して、神経芽腫の臨床患者に最も近い動物モデルであるMYCNトランスジェニックマウス(MYCN TG)を用い、新規治療法であるSeV/DCによる放射線併用免疫遺伝子治療の抗腫瘍効果の検討を行う。今後、既存の化学療法や他の試験的治療薬との併用治療の効果を検討して神経芽腫に対するSeV/DCを含む新規の標準的治療を考案することを目標とする。

4. (門松)神経芽腫は神経とがんの発生・分化の重なりの上に成り立つ。特にMYCN増幅と予後の相関という際立った特徴を有する。MYCN TGを用いて、(1) 神経・がんの幹細胞性を担う分子 (2) ノックダウンによりMYCN増幅と合成致死を示す分子、この2つのカテゴリーから治療分子標的を同定し、治療効果を示す。

(年次評価時点の実績要点)

(上條・藤村の研究)

ATRAの投与はTumor sphereの形成に対し有意な影響を認めなかったが、BMI1のKDでは有意にSphere形成が抑制されることが明らかになり、神経芽腫における幹細胞性についてBMI1の重要な役割が示された。

BMI1KD、ATRA 併用効果を Xenograft 形成でも検討した。BMI1 発現抑制を誘導する低分子化合物と ATRA を併用することで予後不良な神経芽腫に対する新規治療の開発につながる可能性のある結果が得られた。

BMI1KD によってミトコンドリア機能不全がもたらされ、これによって ROS 産生が増加した。また神経芽腫細胞株を過酸化水素で処理すると誘導された細胞死が、BMI1 の過剰発現株では減弱することが明らかになった。これらの結果から BMI1KD による細胞死の誘導に ROS が関与していることが示された。

ポリコームタンパク質 BMI1 の神経芽腫における標的遺伝子を決定するべく、抗内在性 BMI1 抗体を用いて ChIP-on-Chip 法の条件を確立した。

BMI1 による転写制御を包括的に理解するべく、BMI1 をノックダウンした神経芽腫細胞 4 種における遺伝子発現の変化をマイクロアレイを用いて解析を行った。

現在、難治性神経芽腫新規治療法開発を目指して新規リード化合物を取得すべく、低分子化合物のスクリーニング系について東京大学薬学部創薬オープンイノベーションセンターにコンサルトしてさらにスクリーニング系の改良・開発を行っている。

(浅田の研究)

脱メチル化剤と併用投与する薬剤として、ヒストン H3K4 脱メチル化酵素、LSD1 の阻害剤に着目した。LSD1 は、予後不良の神経芽腫で高発現しており、その阻害剤は *in vitro*、及び *in vivo* において増殖抑制効果があることが示されたが、腫瘍選択性が低いため mM レベルの高用量の投与が必要であった [Cancer Res, 69:2065, 2009]。その後開発された腫瘍選択性に優れた LSD1 阻害剤、NCL1 [J Am Chem Soc, 131:17536, 2009]の供与をうけ、4 種類の神経芽腫細胞株に *in vitro* で投与した。その結果、4 種類全ての細胞株に対して  $\mu\text{M}$  レベルの用量で増殖抑制効果を示した。また IMR32 細胞において、5-aza-dC と NCL1 を併用投与したところ、それぞれの単剤投与よりも増殖抑制効果が増強することを見出した。正常細胞株 (RWPE1、HMEC)における増殖抑制作用 (副作用)の評価、及び NCL1 の腫瘍増殖抑制効果とヒストン H3K4 脱メチル化作用の抑制との関係についても解析を進めている。

(塚の研究)

1. TNB-1 神経芽腫で発現させた ALK に結合する蛋白質として、ShcC、IRS-1/2、SOS1/2、PI3K、ZO-1/2 など既知の分子群に加え、Flotillin1 と SH2B など蛋白質安定性や局在を制御する分子を見つけ、機能解析を開始した。2. ALK のノックダウンにより Ret の発現量とチロシンリン酸化が著明に抑制されることが観察された。神経芽腫細胞において Cas が ALK によりリン酸化され、その足場非依存性などの特性に関わることを示した。

(中川原の研究)

1. ALK と Shf の物理的結合を再確認できた。また、両者は共に細胞質に発現し、共局在することを免疫抗体法にて確認した。

2. Shf 蛋白質の欠変異体を作製し、ALK との結合を検索したところ、ALK は Shf の COOH 端に存在する SH2 領域と結合することを明らかにした。また、ALK 変異体の中では、F1174T が最も強く Shf と結合した。

3. 野生型 ALK 神経芽腫細胞株においては、Shf のノックダウンにより細胞の増殖が促進された。一方、ALK 変異体を有する細胞株では、有意な増殖促進が見られなかった。したがって、Shf は ALK の機能を抑制し、ALK 変異によって恒常的に活性化されている場合にはその抑制機能が無効になっていることが示唆された。

(田尻の研究)

MYCN TgM に対する放射線前照射併用 SeV/DC 療法の確立については、MYCN TgM に対する放射線併用 SeV/DC 療法により、腹腔内に発生する神経芽腫の体積が、非治療群と比較して有意に抑制された。抗腫瘍効果の免疫メカニズム解析については、更なる解析を継続している。

(門松の研究)

MYCN Tg マウスの腫瘍形成過程でダイナミックに変化する分子群の中から、(1) 神経・がんの幹細胞性を担う分子 (2) ノックダウンにより MYCN 増幅と合成致死を示す分子を得た。これらの分子群から治療のための分子標的としてのポテンシャルを評価し、(1) については Cited2、(2) については Sgo1 および Smc2 に絞り込んだ。殊に Sgo1 と Smc2 については作用機構の解析が進み、これらを標的にしたリード化合物獲得を目指して、低分子化合物スクリーニングの準備に入りつつある。

## 研究成果と考察

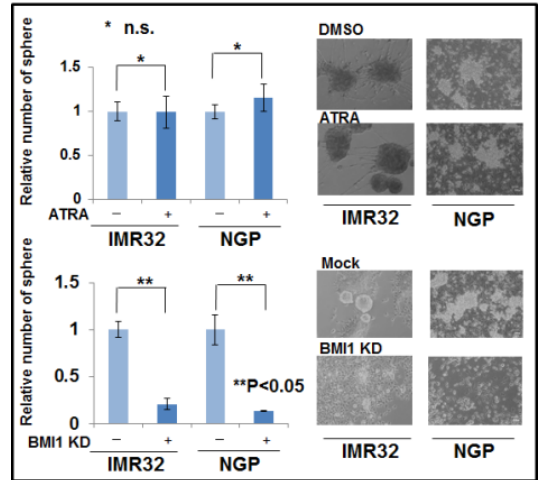
### 第2年次評価時点

(上條の研究)

神経芽腫における幹細胞性について BMI1 の役割を検討した。神経芽腫では表面マーカーによるがん幹細胞は同定されていないが、神経芽腫の Tumor sphere には幹細胞性の高い細胞集団いわゆる TIC が多く含まれるとの報告がある。我々の系においても sphere 形成によって造腫瘍能が亢進することを確認している。

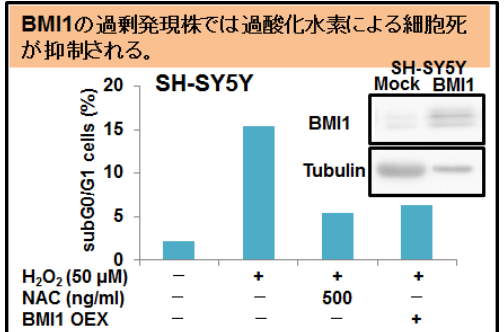
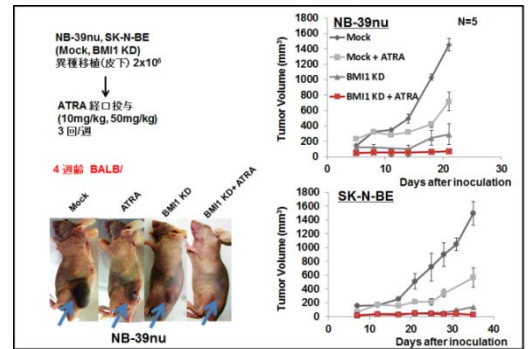
この Sphere 形成における BMI1 の役割を神経芽腫治療に使用される ATRA と比較し検討した。ATRA の投与は Tumor sphere の形成に対し有意な影響を認めなかったが、BMI1 の KD では有意に Sphere 形成が抑制されることが明らかになった (右図)。

BMI1KD、ATRA 併用効果を Xenograft 形成でも検討した。BMI1KD 移植腫瘍ではコントロールと比較し明らかな増殖遅延が認められた。また ATRA の経口投与単独でも効果が認められたが、BMI1KD と ATRA の併用は Xenograft 形成をより強く抑制した。BMI1 発現抑制を誘導する低分子化合物と ATRA を併用することで予後不良な神経芽腫に対する新規治療の開発につながる可能性のある結果と思われた (次項右図)。



BMI1KD によってミトコンドリア機能不全がもたらされ、このことから BMI1KD による ROS 産生への影響を検討した。BMI1KD によって ROS 産生は増加し、また神経芽腫細胞株を過酸化水素で処理すると誘導された細胞死が、BMI1 の過剰発現株では N-acetyl-cysteine と同様なレベルまでキャンセルされることが明らかになった。これらの結果から BMI1KD による細胞死の誘導に ROS が関与していることが示された (右図)。

現在、難治性神経芽腫新規治療法開発を目指して新規リード化合物を取得すべく、BMI1 の転写抑制をもたらす低分子化合物のスクリーニング系、および BMI1 を含むポリコム群でのユビキチン付加酵素反応阻害系を用いた低分子化合物のスクリーニング系について東京大学薬学部創薬オープンイノベーションセンターにコンサルトしてさらにスクリーニング系の改良・開発を行っている。



(藤村・上條の研究)

BMI1 を 4 種の神経芽腫細胞でノックダウンし、アフィメトリックスヒト遺伝子発現チップで遺伝子発現を網羅的に解析したところ、4 種の細胞で共通に脱抑制された遺伝子群を 53 遺伝子 (HDAC, ヒストン修飾酵素、アポトーシス関連遺伝子など)、3 種の細胞で共通に脱抑制された遺伝子群を 493 遺伝子見出した。現在臨床検体での遺伝子発現による予後への影響などを検討して、BMI1 抑制の神経芽腫発癌・難治化における標的遺伝子の同定をさらに行う。現在、標的の一つとして転写因子 RXXX3 を見出し、プロモーター部位への BMI1 の結合の ChIP 解析などの実験を行っている。野生型細胞を用いて、内因性 BMI1 の遺伝子結合を観察し、これとノックダウンにおける遺伝子変化を比較する実験計画を立案した。高効率に抗体と内因性の BMI1 と結合させるべく、細胞の固定時間の最適化ならびに、細胞中に混在する DNA に結合している BMI1 と結合していない BMI1 との分離を行った。これにより、十分量の DNA を免疫沈降可能な実験系を確立した。現在、内因性の BMI1 の遺伝子結合を解析中である。

#### (浅田の研究)

4 種類の神経芽腫細胞株(IMR32、NB39nu、SHSY5Y、BE(2)C)における NCL1 の GI50 は、それぞれ 12、35、7.6、45 $\mu$ M であり、全ての細胞株において  $\mu$ M レベルで、増殖抑制効果を示した。5-aza-dC と NCL1 の併用投与を行ったところ、IMR32 細胞株では、それぞれを単剤で投与した時よりも、増殖抑制効果が増強した。

正常細胞株 (RWPE1、HMEC)における増殖抑制作用 (副作用)の評価、及び NCL1 の腫瘍増殖抑制効果とヒストン H3K4 脱メチル化作用の抑制との関係についても解析を進めており、将来ヒトで臨床試験を実施する際に有用な基礎データを着実に集積している (右図)。

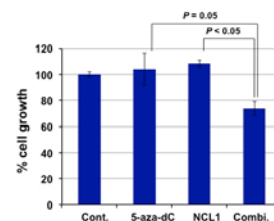


図3 5-aza-dC とLSD1阻害剤の併用効果

#### (塚の研究)

1. TNB-1 細胞を用いて、FLAG タグ付きの野生型および F1174L と K1062M 変異体を発現させた細胞株を 2 ライン樹立して、M2-アガロースによって FLAG タグの着いた蛋白質をプルダウンして、野生型及び変異型 ALK に結合する蛋白質を解析した。野生型・活性型の双方で ALK-FLAG と共沈するリン酸化蛋白質、活性型 ALK-FLAG のみと共沈するリン酸化蛋白質を、抗リン酸化チロシン抗体により精製後、質量分析により同定を進めたところ ShcC、IRS-1/2、SOS1/2、PI3K、ZO-1/2 など他の ALK 活性化腫瘍で既知の ALK 結合分子群に加え、新たに Cortactin、Drebrin などのアクチン結合タンパク質、Flotillin1 と SH2B など蛋白質安定性や局在を制御する分子を見つけ、機能解析を開始した。現時点まに ALK と結合してチロシンリン酸化を受け、また細胞運動能などに関わることを明らかにした。

2. ALK が活性化した神経芽腫では高頻度に Ret 蛋白質のチロシンリン酸化亢進が見られることを報告してきているが、ALK のノックダウンにより Ret の発現量とチロシンリン酸化が著明に抑制されることが観察された。同様の作用が ALK の阻害剤 TAE684 によっても認められた。神経芽腫では Ret リガンドである GDNF の添加は接着状態での通常の増殖よりも浮遊状態での増殖を顕著に促進することをみつけており、神経芽腫の特性に関わる多くのシグナルを制御しており、これらの複合体を阻害する分子により神経芽腫のアポトーシスや分化誘導をもたらすことができれば分子標的としての有用性が示せる。

悪性リンパ腫で ALK と結合してがん化シグナルを伝えることが報告された Cas は NB39-nu 神経芽腫細胞でも活性化した ALK と結合して ALK によりリン酸化されていて、神経芽腫の足場非依存性シグナルを伝えていることが示された。

#### (中川原の研究)

##### 1 ALK と Shf の相互作用の検証

免疫沈降法を用いた解析の結果、ALK と Shf は細胞内で相互作用すること、Shf との結合性は活性型変異体 ALK (F1174L)が最も強いことを見出した。また、免疫細胞染色の結果より ALK と Shf は細胞質特に細胞膜に共局在することを明らかにした。以上より、細胞膜中に局在する受容体型チロシンキナーゼの ALK に Shf が結合して機能することが考えられた。

##### 2 Shf 蛋白質の ALK 蛋白質との結合に必要な領域の解明

ALK と欠失変異体 Shf との結合性を解析したところ、少なくとも Shf の SH2 ドメインが必要であることを明らかにした。しかし、N-末側の領域中にも ALK との結合に必要なドメインの存在が示唆されるデータを得ており、さらに詳細に検討中である。

##### 3 神経芽腫細胞株を用いた Shf の過剰発現および siRNA による Shf の発現抑制

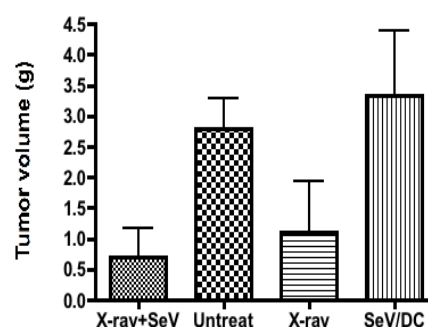
野生型 ALK 発現細胞株では、Shf の発現抑制により細胞増殖が促進されたのに対して、ALK 変異体を発現する細胞株では増殖促進が見られなかった。したがって、Shf は ALK の機能を負に制御するが、変異型 ALK に対してはその機能を発揮できないことが示唆された。

#### (田尻の研究)

##### MYCN TgM に対する放射線前照射併用 SeV/DC 療法

・ MYCN TgM に対する放射線併用 SeV/DC 療法により、腹腔内に発生する神経芽腫の体積が、非治療群と比較して有意に抑制されたが、マウスの生存日数には影響を与えなかった。

・ X-ray 群のみでも腫瘍抑制効果がある可能性があり、今回、X-ray 群が過麻酔にて解析個体数が少なくなったため、今後実験個体数を増やして各群の解析を進める予定である (右図)。



(門松の研究)

MYCN Tg マウスの腫瘍形成過程でダイナミックに変化する分子群の中から、(1) 神経・がんの幹細胞性を担う分子 (2) ノックダウンにより MYCN 増幅と合成致死を示す分子を得た。これらの分子群から治療のための分子標的としてのポテンシャルを評価した。(1) 神経・がんの幹細胞性を担う分子については特に Cited2 に注目した。この分子は神経芽腫前がん状態、神経幹細胞、神経芽腫 tumor sphere で高発現し、そのノックダウンによって神経芽腫細胞の増殖抑制が起こり、神経系への分化が促進された。今後、その作用機構の解析により、分子標的としての実現可能性を探る。

(2) ノックダウンにより MYCN 増幅と合成致死を示す分子については Sgo1 および Smc2 に絞り込んだ。例えば Sgo1 ノックダウンでは図 1 に示すように MYCN 増幅細胞でのみ senescence が引き起こされ、増殖が抑制される。一方、Smc2 ノックダウンでは MYCN 増幅細胞でのみ apoptosis が引き起こされる。両方の分子ともに染色体分離に関わり、M 期で重要な分子として認知されてきたのであるが、今回の研究でこれまで知られない作用機構をこれらの分子が担い、間期でも働くことが分かってきた。現在、図 2 に概略で示したような DNA ダメージを中核としたダイナミックな分子動態にこれらの分子が関わる可能性が高いことを示すデータを得ている。今後はそのような作用機構を基にして、これらを標的としたリード化合物探索のための戦略を構築していく。

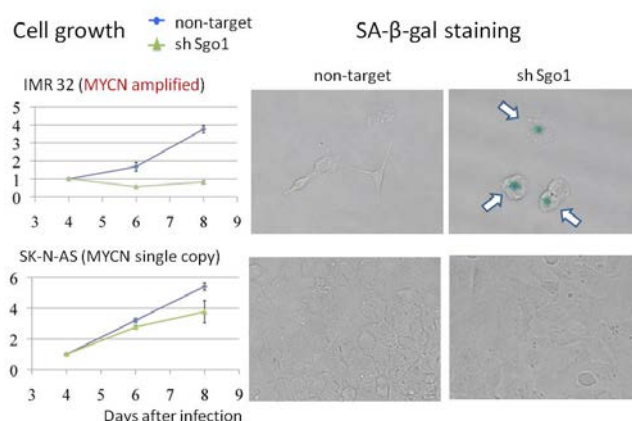


図1. MYCN増幅細胞でのみSgo1抑制の効果が現れる

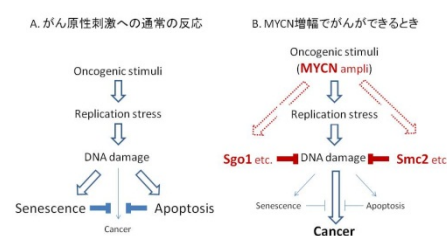


図2. MYCN増幅との合成致死性から予想される神経芽腫の成り立ち

## 倫理面への配慮

ヒト試料の解析研究を行うにあたっては各施設の倫理委員会の承認を得、資料等の提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて充分配慮し、不利益・危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）を行って実行する。本研究では個人情報保護の重要性を認識し、保護にむけた取り組みを徹底する。本研究参加団体の過去の実績に基づき、本研究においても関連する個人情報保護の法令に準拠した個人情報保護方針を策定し、個人情報の保護に努める。全体として、本研究はヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省告示）」に従って実施する。

動物実験は各施設の動物委員会の定める動物実験倫理規定に従って、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をともなう実験への十分な配慮のもとに、慎重に進めている。

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、遺伝子治療臨床倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成18年厚生労働省告示第425号）、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び各研究者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守する。

特に「小児担がん患者の末梢血単球から分化させた DC の SeV による活性化の有無の検討」に関しては、臨床試験の実施予定施設である九州大学病院の倫理委員会の承認を得て実施した。また、「SeV/DC を用いた放射線併用免疫遺伝子治療」の臨床試験計画書も現在、九州大学病院の IRB に申請中であり、承認後に転任先の京都府立医科大学の IRB にも申請して承認を得る予定である。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(上條岳彦)

1. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author).  
CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway-modification  
**ONCOGENE**, 2011 Jan 6;30(1):97-105.
2. Li X, Isono K, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Koseki YM, Otte AP, Casanova M, Kitamura M, Kamijo T, Sharif J, Ohara O, Toyada T, Bernstein BE, Brockdorff N and Koseki H  
Mammalian Polycomblike Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes.  
**Mol Cell Biol**. 2011 Jan;31(2):351-64.
3. Kimura M, Takenobu H, Akita N, Nakazawa A, Ochiai H, Shimozato O, Fujimura Y, Koseki H, Yoshino I, Kimura H, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author).  
Bmi1 regulates cell fate via tumor suppressor WWOX repression in small cell lung cancer cells.  
**Cancer Sci**. 2011 May;102(5):983-990.
4. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, Kamijo T, Zhang Y, Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Tomohiko Maehama T, Mori M, and Suzuki A. Regulation of the MDM2-P53 Pathway and Tumor Growth by PICT1/GLTSCR2 via Nucleolar RPL11  
**Nat Med**. 2011 Jul 31;17(8):944-51.
5. Takehiko Kamijo, Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. **Pediatric Research**, 2012, In press
6. 上條岳彦, 中川原章、 神経芽腫の遺伝子検査、**小児科** Vol.52 No.12 小児医療における診断・治療の進歩、  
2011/11/01 発売号
7. Li X, Isono K, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Koseki YM, Otte AP, Casanova M, Kitamura M, Kamijo T, Sharif J, Ohara O, Toyada T, Bernstein BE, Brockdorff N and Koseki H  
Mammalian Polycomblike Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes. **Mol. Cell Biol.**, 2010
8. Shi Y, Takenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Jiang LL, Kamijo T (corresponding author) HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma **European J of Cancer**, 2010 Aug;46(12):2324-34.
9. Iwata S, Takenobu H, Kageyama H, Koseki H, Ishii T, Nakazawa A, Tatezaki SI, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author). Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma. **Cancer Sci**. 2010 Jul;101(7):1646-52.
10. Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura K, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author). Bmi1 is a MYCN target gene and regulates tumorigenesis via repression of KIF1B $\beta$  and TSLC1 in neuroblastoma. **ONCOGENE**, 2010 May 6;29(18):2681-90.
11. 上條岳彦 小児固形腫瘍におけるがん幹細胞と幹細胞性の制御機構. **小児がん**. 47 巻第 1 号、p53-59, 2010

(浅田潔)

1. Ushijima, T. and Asada, K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, 101: 300-305, 2010.

(中川原章)

1. 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 unfavorable outcome in neuroblastoma. **Clin Cancer Res.** 17:6681-6692. 2011

2. Taggart DR, London WB, Schmidt ML, Dubois SG, Monclair TF, Nakagawara A, De Bernardi B, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, Matthay KK. Prognostic Value of the Stage 4S Metastatic Pattern and Tumor Biology in Patients With Metastatic Neuroblastoma Diagnosed Between Birth and 18 Months of Age. **J. Clin. Oncol.** 29:4358-4364. 2011

3. Shih YY, Lee H, Nakagawara A, Juan HF, Jeng YM, Tsay YG, Lin DT, Hsieh FJ, Pan CY, Hsu WM, Liao YF. Nuclear GRP75 Binds Retinoic Acid Receptors to Promote Neuronal Differentiation of Neuroblastoma. **PLoS One.** 6(10):e26236. 2011

4. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, Berthold F, Nakagawara A, Ladenstein RL, Iehara T, Matthay KK. Clinical and Biologic Features Predictive of Survival After Relapse of Neuroblastoma: A Report From the International Neuroblastoma Risk Group Project. **J. Clin. Oncol.** 29(24):3286-3292.2011

5. 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** 6(5):e19297. 2011

6. De Katleen P, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris JM, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A, Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schulte JH, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. Accurate Outcome Prediction in Neuroblastoma across Independent Data Sets Using a Multigene Signature. **Clin. Cancer Res.** 16:1532-1541, 2010

7. Yamada C, Ozaki T, Ando K, Suenaga Y, Inoue K, Ito Y, Okoshi R, Kageyama H, Kimura H, Miyazaki M, Nakagawara A. RUNX3 modulates DNA damage-mediated phosphorylation of tumor suppressor p53 at Ser-15 and acts as a Co-activator for p53. *J. Biol. Chem.* 285:16693-16703, 2010

8. Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A. LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 392:252-257, 2010

9. Bu Y, Suenaga Y, Okoshi R, Sang M, Kubo N, Song F, Nakagawara A, Ozaki T. NFBD1/MDC1 participates in the regulation of G2/M transition in mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 397:157-162, 2010.

10. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeek J, Van Maerken T, De Paepe 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.** 16:4353-4362, 2010

11. Ohira M, Nakagawara A. Global genomic and RNA profiles for novel risk stratification of neuroblastoma. **Cancer Sci.** 101:2295-2301, 2010



(堺隆一)

1. Futami H, Sakai R. All-trans retinoic acid downregulates ALK in neuroblastoma cell lines and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with activated ALK. **Cancer Lett.** 297: 220-225, 2010.
2. Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma S, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. **J Biol Chem.** 286: 18251-18260, 2011.
3. Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Yoshida N, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, Sakai R, and Fukami K. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110 $\alpha$  regulates invadopodia formation. **J. Cell Biol.** 193: 1275-1288, 2011

(田尻達郎)

1. 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** 45:2312-2316, 2010
2. 竜田恭介、木下義晶、田尻達郎、中辻隆徳、東真弓、宗崎良太、江藤正俊、立神勝則、孝橋賢一、内藤誠二、恒吉正澄、田口智章：樹状細胞療法を施行した小児腎細胞癌の1例 小児がん 47 : 441-446, 2010
3. Souzaki R, Tajiri T, Teshiba R, Higashi M, Kinoshita Y, Tanaka S, Taguchi T: The genetic and clinical significance of MYCN gain as detected by FISH in neuroblastoma. **Pediatr Surg Int** 27:231-236, 2010
4. Souzaki R, Tajiri T, Kinoshita Y, Tanaka S, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T : The hedgehog signaling in neuroblastoma differentiation. **J Pediatr Surg** 45:2299-2304, 2010
5. Souzaki R, Tajiri T, Teshiba R, Kinoshita Y, Ryota Y, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T: The correlation between the number of segmental chromosome aberrations and the age at diagnosis in diploid neuroblastomas without MYCN amplification. **J Pediatr Surg** 46:2228-32, 2011
6. 田尻達郎、田中桜、竜田恭介、宗崎良太、木下義晶、田口智章： センダイウイルス導入樹状細胞を用いた神経芽腫の免疫療法 **Pharma Media No5 ; 57-65,2011**
7. 田口智章、宗崎良太、代居良太、田尻達郎、木下義晶、家入里志、松浦俊治、林田 真、柳 佑典：小児肝胆膵腫瘍の外科手術 小児がん 48:224-230, 2011
8. 田尻達郎、米田光宏、家原知子、常盤和明、連 利博、菊田 敦、菊地 陽、金川公夫、北村正幸、中川原 章、中澤 温子、高橋秀人、瀧本哲也、福島 敬、金子道夫、原 純一、池田 均 神経芽腫低・中間リスク群に対する臨床研究における IDRF の評価と外科治療ガイドライン 小児外科 43 ; 1173-1178,2011
9. 家原知子、菊田 敦、菊地 陽、田尻達郎、米田光宏、常盤和明、連 利博、金川公夫、北村正幸、中川原 章、中澤 温子、高橋秀人、瀧本哲也、福島 敬、金子道夫、原 純一、池田 均 神経芽腫低・中間リスク群 小児外科 43 ; 1179-1183,2011

10. Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Toshiro Hara, Tomoaki Taguchi : The implications of surgical intervention in the treatment of neuroblastomas: a 20-year single institution experience. **Surg Today**, 42:220-4, 2012

(門松健治)

1. Inaba S, Nagahara S, Makita N, Tarumi Y, Ishimoto T, Matsuo S, Kadomatsu K, Takei Y. Atelocollagen-mediated Systemic Delivery Prevents Immunostimulatory Adverse Effects of siRNA in Mammals. **Mol Ther.** 20, 356-66, 2012.

2. Huang, P., Kishida, S., Cao, D., Murakami-Tonami, Y., Mu, P., Nakaguro, M., Koide, N., Takeuchi, I., Akina Onishi, A., Kadomatsu, K. The neuronal differentiation factor NeuroD1 downregulates the neuronal repellent factor Slit2 expression and promotes cell motility and tumor formation of neuroblastoma. **Cancer Res.**, 71(8):2938-2948, 2011.

3. Sakamoto, K., Bu, G., Chen, S., Takei, Y., Hibi, K., Kodera, Y., McCormick, LM., Nakao, A., Noda, M., Muramatsu, T., Kadomatsu, K. The premature ligand-receptor interaction during biosynthesis limits the production of growth factor midkine and its receptor LDL receptor-related protein 1(LRP1). **J. Biol. Chem.**, 286:8405-8413, 2011.

4. Asano, Y., Kishida, S., Mu, P., Sakamoto, K., Murohara, T., Kadomatsu, K. DRR1 is expressed in the developing nervous system and downregulated during neuroblastoma carcinogenesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 394:829-835, 2010.

5. Kadomatsu, K. Midkine Regulation of the Renin-Angiotensin System. **Curr Hypertens Rep** 12, 74-79, 2010 Review.

(学会発表)

(上條岳彦)

国内学会 : 2010年 8演題、2011年 11演題。 国際学会 : 2010年 3演題、2011年 2演題。

(堺隆一)

国内学会 : 2010年 9演題、2011年 5演題。 国際学会 : 2010年 3演題、2011年 2演題。

(書籍)

○1. Takehiko Kamijo, Neuroblastoma: Role of MYCN/Bmi1 Pathway in Neuroblastoma.

Pediatric Cancer, Volume 1, Neuroblastoma, Springer Science+Business Media B.V. 2012

2. 浅田 潔、牛島俊和 DNAメチル化 がんの分子標的と治療薬事典 羊土社 2010