

(総合研究報告書)

25-B-3 網羅的解析による神経芽腫の標的分子・機構の同定と臨床・分子情報データベース基盤構築  
上條 岳彦 埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所

研究の分類・属性

「発がん・がん生物学」

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。完全寛解から再発する症例が多く、この改善に欧米では抗GD2抗体療法などが開発されつつあるがわが国への導入には時間を要し、さらに日本オリジナルの知見に基づいた治療法の開発が期待されている。

本研究の目的は、神経芽腫検体・細胞における網羅的検索から標的分子を同定し、分子生物学および分子遺伝学的解析によって新たなシーズを見出し、新規治療法開発へ発展させる基盤を形成することである。

腫瘍サンプルの収集・作成は千葉県がんセンターの神経芽腫検体約2500検体および日本神経芽腫治療研究グループ(JNBSG)での付随研究申請による多施設共同研究検体を対象とする。

神経芽腫検体・細胞における網羅的検索には、NGSシーケンスによるゲノム変異、RNA seq、遺伝子メチル化の解析、タンパク質のLC/MS解析、ゲノムメチル化の解析、さらにMYCN TG mouseでの網羅的解析を行う。

特に重点を置く標的経路としては、これまでに行った解析結果に基づいて、1. 遺伝子変異が知られ、阻害剤開発が進行しているALK経路、2. 神経芽腫の幹細胞関連遺伝子経路、3. MYCNに関連し、特に腫瘍細胞合成致死に関連する経路、4. 神経芽腫の再発・難治化に関連するp53ファミリー(p53, p63, p73)関連経路、5. 神経芽腫に特異的に発現し、発がんに寄与するシグナル経路、6. 神経芽腫でゲノムメチル化が認められ、予後因子である経路などを標的とする。これらを基盤に、網羅的検索の結果を基にさらに絞り込み・検索を行って標的分子を確定していく。

得られた解析結果を神経芽腫臨床へと応用するために、JNBSGおよび千葉県がんセンターと協力した神経芽腫の臨床情報と分子遺伝情報を併合したデータベースの基盤構築を行っていく。

研究経費

年 度	研究経費
平成 25 年度	4,100 千円
平成 26 年度	4,106 千円
平成 27 年度	4,100 千円

研究班の組織

研究者名	所属研究機関名・職名	分担する研究課題名・項目
上條 岳彦	埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所・所長	神経芽腫における標的分子の同定と分子情報データベースの作成

中川原 章 平成26年3月まで	千葉県がんセンター・センター長	神経芽腫遺伝子変異の網羅的解析と新規遺伝子を標的とする治療法の開発
田口 智章	九州大学大学院医学研究院 小児外科科学分野	神経芽腫臨床情報データベースの作成
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
牛島 俊和 平成27年3月まで	独立行政法人国立がん研究センター ・分野長	神経芽腫メチル化異常の診断・治療への応用
田尻 達郎	京都府立医科大学大学院・小児外科 教授	神経芽腫臨床情報データベースの作成
滝田 順子	東京大・医・小児科・准教授	神経芽腫ゲノム変異の網羅的解析と標的分子の同定
江成 政人	国立がん研究センター研究所 難治がん研究分野・ユニット長	ALK陽性神経芽腫の難治化に関わるp53経路不活化の分子機構およびALK阻害剤耐性回避への応用
瀧本哲也 平成27年4月から	国立成育医療研究センター・室長	神経芽腫臨床情報データベースの作成

## 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)

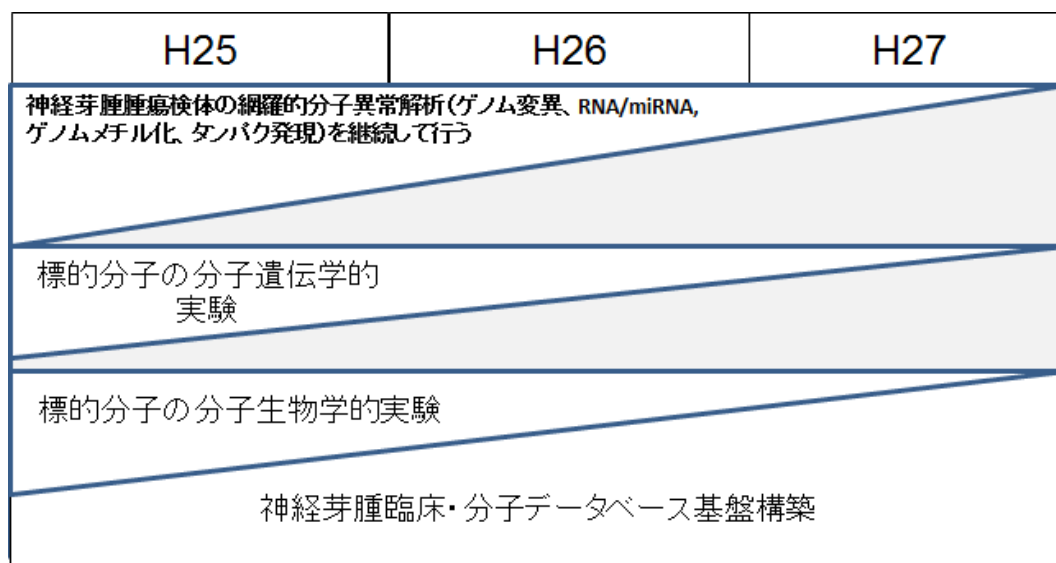
##### (目的)

神経芽腫検体・細胞における網羅的検索から標的分子を同定し、分子生物学および分子遺伝学的解析によって新たなシーズを見出し、新規治療法開発へ発展させる基盤を形成することである。

##### (到達目標)

1. 網羅的解析によって神経芽腫の発がん・難治化にかかわる分子を検索する。
2. 網羅的解析によって検出した分子の生物学的な意義を分子生物学的・分子遺伝学的に明らかにする。
3. 臨床検体の臨床情報を整理し、臨床検体と臨床情報、上記の網羅的解析を加えたデータベースの基盤を構築する。

図. 研究進行のスケジュール



H25年度からH27年度まで3年計画で行う。

### (第3年次評価時点での実績要点)

#### 1 神経芽腫腫瘍検体の網羅的分子異常解析

神経芽腫治療プロトコールにおいては、世界各国で用いられている INRG リスク分類に合わせてリスク分類を行う必要があり、これに向けてアレイ CGH でゲノム解析を行った。ゲノム情報特に 11q LOH の解析を、高リスク症例 (Stage IVS で 11q LOH 有)、低中間リスク症例 (11qLOH によって低リスクと中間リスクに分類される群) にて実施した。

CIMP の測定が日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)の附随研究に採用された。検査企業からは、パイロシーケンス法による PCDHB のメチル化測定が受託検査として 2014 年 9 月に実用化された。神経芽腫における分子病態の全体像を解明するために、神経芽腫関連遺伝子の target sequencing およびゲノムコピー数の網羅的解析を行い genetic landscape を作成した。

#### 2 神経芽腫臨床分子データベース基盤構築

本邦全体の神経芽腫の臨床情報と分子遺伝情報を併合したデータベースを作成して解析し、基礎研究者への提供を目的として、再検索依頼を行った。88 施設に調査ファイルを送付し、81 施設から回収、対象症例 2104 例中、1830 例が回収可能であった。27 年度から解析を開始し、年齢、病期、原発部位、転移部位、病理組織分類、晩期合併症、全生存率、無イベント生存率の一次解析を行った。回収した 1830 例のうち、初診時のデータがあり転帰の判明している 1146 例を対象とした。男児 641 例、女児 505 例、診断時年齢の中央値は 1 歳 4 ヶ月 (0 歳台が最多で、以後年齢とともに減少) で、817 例 (73.1%) が非マスキング (MS) 例であった。原発部位は副腎 (56.5%)、後腹膜 (21.4%)、胸部 (11.8%) の順に多く、57.7%が Stage3/4 の進行例であった。体細胞遺伝子変異については、MYCN 増幅が 16.5% (非 MS 例では 23.6%)、1p 欠失 29.3%、11q 欠失 13.6%、17q 増加 8.5%にみられた。病理組織型は 84.5%が神経芽腫、53.8%が favorable histology であった。全生存率 (OS) は 66.8±4.3%、無イベント生存率 (EFS) は 64.8±1.8%であったが、非 MS 例に限れば OS 60.8±2.4%、EFS 52.0±2.5%であった。晩期合併症は 15.2%にみられ、肝・胃腸・腎泌尿器の障害が最多 (4.8%) で、聴力障害 (4.2%)、低身長 (3.4%) がこれに次いで多かった。

#### 3 標的分子の分子生物学的実験

NLRR1 の各ドメイン欠損タンパク質を発現させ、細胞増殖及び EGF 処理による ERK のリン酸化への影響を検討した。その結果、Fibronectin type III ドメインを欠損させた NLRR1 の発現により細胞増殖が有意に低下した。また EGF による ERK のリン酸化の減弱が観察されたことから、Fibronectin type III ドメインが NLRR1 の機能に重要であることを見いだした。

神経芽腫がん幹細胞と考えられる腫瘍スフェア形成において、これまで報告した CD133に加えて、転写因子

CDX1が重要であることを明らかにした。CDX1はCD133及びOCT4, SALL4, KLF5などのreprogramming factorsを誘導し、神経芽腫腫瘍スフェアの増殖、神経芽腫移植腫瘍増殖を正に制御していることが判明した。特に神経芽腫スフェアにおけるCD133転写調節に重要なプロモーター部位を明らかにし、同部位にCDX1が直接結合して転写を活性化することが示された。細胞の恒常性を維持し、組織幹細胞の増殖を促進することが知られている、受容体の下流のパスウェイに係る遺伝子の発現上昇が、統計的に有意差をもって複数見出された。

神経芽腫でALKに結合するリン酸化蛋白質として同定したFlotillin-1 (FLOT1)はエンドサイトーシスを介してALK蛋白質の分解に関わることを示した。また、神経芽腫で見られるF1174Lなど幾つかの変異に関して、変異型ALKとFLOT1との結合能が野生型に比べ著明に減少しているのが確認された。ヒト神経芽腫組織の解析においても予後不良群の組織でFLOT1の発現は低下しており、FLOT1の発現低下やFLOT1との結合能が低いALK変異によりALK蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強と悪性化に関わり、このような細胞はcrizotinibなどALK阻害剤に感受性が高い可能性が示唆された。

胎児期 (E13.5) のマウスの腹腔交感神経節から初代培養したsphereについては、野生型マウスsphereでは継代できないが、MYCN-Tg sphereは継代でき、さらに後者はマウス皮下に移植することで腫瘍を形成できた。MYCN下流遺伝子の発現が誘導されることのみならず、ポリコム標的遺伝子の発現抑制が起こっており、逆にポリコム2複合体遺伝子は発現が上昇していることが判明した。DNAメチル化解析では分化関連遺伝子群のプロモーター領域のメチル化の亢進を確認した。加えて、プロモーター領域メチル化遺伝子群の遺伝子発現が、ヒト神経芽腫でのステージなどをよく反映することが明らかになり、MYCN-Tg sphereの遺伝子発現、DNAメチル化の解析はヒト神経芽腫の病態解明に直に迫る可能性が高いことを見出した。

p53経路の活性化がALK陽性神経芽腫のALK阻害剤耐性を低減させることを見出し、更にそのALK阻害剤耐性の分子メカニズムを探索した。ALK経路の阻害がp53経路に影響を与え、細胞増殖停止からアポトーシスのシグナルへとp53を介した転写選択がシフトしたことを示唆した。

#### (研究終了時点の実績要点)

##### 1 神経芽腫腫瘍検体の網羅的分子異常解析

神経芽腫治療プロトコルにおいては、世界各国で用いられているINRGリスク分類に合わせてリスク分類を行う必要があり、これに向けてアレイCGHでゲノム解析を行った。ゲノム情報特に11q LOHの解析を、高リスク症例 (Stage IVSで11q LOH有)、低中間リスク症例 (11q LOHによって低リスクと中間リスクに分類される群) にて実施した。

CIMPの測定が日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)の附随研究に採用された。また、神経芽細胞腫におけるCIMPと予後の関連をDNAメチル化に関する講演会等で発表し、臨床医へ浸透させた。さらに、検査企業からは、パイロシークエンス法によるPCDHBのメチル化測定が受託検査として2014年9月に実用化された。

神経芽腫における分子病態の全体像を解明するために、神経芽腫関連遺伝子のtarget sequencingおよびゲノムコピー数の網羅的解析を行いgenetic landscapeを作成した。その結果、ゲノム異常を基盤とした6つのサブグループ(A:ALK、B:Other mutation、C:MYCN+1p LOH、D:11q LOH、E:Hyperploid、F:silent)が明らかとなった。

##### 2 神経芽腫臨床分子データベース基盤構築

本邦全体の神経芽腫の臨床情報と分子遺伝情報を併合したデータベースを作成して解析し、基礎研究者への提供を目的として、JNBSGデータセンターからJBBSG登録施設に再検索依頼を開始し、2014年11月末までに各施設から回収を終了した。88施設に調査ファイルを送付し、81施設から回収、対象症例2104例中、1830例が回収可能であった。平成26年度末までに千葉県がんセンターがJNBSG施設から回収した臨床情報とデータの統合を行った結果、集計解析作業が可能な症例は、1923例であった。27年度から解析を開始し、年齢、病期、原発部位、転移部位、病理組織分類、晩期合併症、全生存率、無病生存率の一次解析を行った。

JNBSG/千葉県がんセンター登録施設81施設から神経芽腫の臨床情報のデータを回収し、臨床情報と分子遺伝情報を併合したデータベースを構築した。回収した1830例のうち、初診時のデータがあり転帰の判明している1146例を対象とした。男児641例、女児505例、診断時年齢の中央値は1歳4ヶ月 (0歳台が最多で、以後年齢とともに減少) で、817例 (73.1%) が非マススクリーニング (MS) 例であった。原発部位は副腎

(56.5%)、後腹膜 (21.4%)、胸部 (11.8%) の順に多く、57.7%が Stage3/4 の進行例であった。体細胞遺伝子変異については、MYCN 増幅が 16.5% (非 MS 例では 23.6%)、1p 欠失 29.3%、11q 欠失 13.6%、17q 増加 8.5%にみられた。病理組織型は 84.5%が神経芽腫、53.8%が favorable histology であった。全生存率 (OS) は 66.8±4.3%、無イベント生存率 (EFS) は 64.8±1.8%であったが、非 MS 例に限れば OS 60.8±2.4%、EFS 52.0±2.5%であった。近年の欧米での神経芽腫の生存率は 70%前後であることから、本邦の治療成績は欧米に比してやや劣っている可能性も考えられた。晩期合併症は 15.2%にみられ、肝・胃腸・腎泌尿器の障害が最多 (4.8%) で、聴力障害 (4.2%)、低身長 (3.4%) がこれに次いで多かった。

### 3 標的分子の分子生物学的実験・分子遺伝学的実験

神経芽腫において NLRR1 の発現は予後不良群で高いことが分かっていたが、他の腫瘍においての発現を免疫染色、real-time PCR、ライセートアレイで検討したところ、肺がんや乳がんなどにおいて正常組織に比べ高い発現が認められたことから、NLRR1 の発現が様々な癌腫においてがんの進展・増悪化に関与していることが示唆された。NLRR1 の各ドメイン欠損タンパク質を発現させ、細胞増殖及び EGF 処理による ERK のリン酸化への影響を検討した。その結果、Fibronectin type III ドメインを欠損させた NLRR1 の発現により細胞増殖が有意に低下した。また EGF による ERK のリン酸化の減弱が観察されたことから、Fibronectin type III ドメインが NLRR1 の機能に重要であることを見いだした。

神経芽腫がん幹細胞と考えられる腫瘍スフェア形成において、これまで報告した CD133 に加えて、転写因子 CDX1 が重要であることを明らかにした。CDX1 は CD133 及び OCT4, SALL4, KLF5 などの reprogramming factors を誘導し、神経芽腫腫瘍スフェアの増殖、神経芽腫移植腫瘍増殖を正に制御していることが判明した。特に神経芽腫スフェアにおける CD133 転写調節に重要なプロモーター部位を明らかにし、同部位に CDX1 が直接結合して転写を活性化することが示された。細胞の恒常性を維持し、組織幹細胞の増殖を促進することが知られている、受容体の下流のパスウェイに係る遺伝子の発現上昇が、統計的に有意差をもって複数見出された。

神経芽腫で ALK に結合するリン酸化蛋白質として同定した Flotillin-1 (FLOT1) はエンドサイトーシスを介して ALK 蛋白質の分解に関わることを示した。また、神経芽腫で見られる F1174L など幾つかの変異に関して、変異型 ALK と FLOT1 との結合能が野生型に比べ著明に減少しているのが確認された。ヒト神経芽腫組織の解析においても予後不良群の組織で FLOT1 の発現は低下しており、FLOT1 の発現低下や FLOT1 との結合能が低い ALK 変異により ALK 蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強と悪性化に関わり、このような細胞は crizotinib など ALK 阻害剤に感受性が高い可能性が示唆された。

また同じく ALK に結合する分子として新たに同定したチロシンホスファターゼ SHP2 (PTPN11) は、ALK 自体または Src によりチロシンリン酸化を受け、神経芽腫細胞のアポトーシス抑制に関わることを示された。

胎児期 (E13.5) のマウスの腹腔交感神経節から初代培養した sphere については、野生型マウス sphere では継代できないが、MYCN-Tg sphere は継代でき、さらに後者はマウス皮下に移植することで腫瘍を形成できた。MYCN 下流遺伝子の発現が誘導されることのみならず、ポリコム標的遺伝子の発現抑制が起こっており、逆にポリコム 2 複合体遺伝子は発現が上昇していることが判明した。DNA メチル化解析では分化関連遺伝子群のプロモーター領域のメチル化の亢進を確認した。加えて、プロモーター領域メチル化遺伝子群の遺伝子発現が、ヒト神経芽腫でのステージなどをよく反映することが明らかになり、MYCN-Tg sphere の遺伝子発現、DNA メチル化の解析はヒト神経芽腫の病態解明に直に迫る可能性が高いことを見出した。

p53 経路の活性化が ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を低減させることを見出し、更にその ALK 阻害剤耐性の分子メカニズムを探索した。ALK 経路の阻害が p53 経路に影響を与え、細胞増殖停止からアポトーシスのシグナルへと p53 を介した転写選択がシフトしたことを示唆した。

## 研究方法

1. 腫瘍サンプルの収集・作成千葉県がんセンターの神経芽腫検体 2500 検体および日本神経芽腫治療研究グループ (JNBSG) での付随研究申請による多施設共同研究検体を対象とする。千葉県がんセンターでの神経芽腫腫瘍検体の管理と運用は中川原章、上條岳彦が行う。腫瘍検体から作成した神経芽腫腫瘍スフェアの管理と運用は上條岳彦が行う。現在約 20 検体からスフェアを作成している。MYCN TG 神経芽腫腫瘍の作成および管理は門松健治が行う。各研究者が作成した神経芽腫モデルマウスからの腫瘍検体は各自がバンク化する。

2014年11月以降は上條の所属する埼玉県立がんセンターが神経芽腫分子診断・検体保存を行っている。また、神経芽腫症例の臨床情報については成育医療センターで瀧本が従来から集計・管理している。

2. 網羅的検索の実施・解析：NGSシーケンスおよびアレイ CGH による腫瘍ゲノム変異の解析は滝田が担当する。滝田は神経芽腫の新たな治療標的分子を同定するために、次世代シーケンサー、CytoScan HD array といった最新のゲノム解析技術を駆使して、神経芽腫大規模検体における網羅的ゲノム解析を試みる。具体的には、再発・転移例に対する exome 解析、全ゲノム解析、ALK 経路関連遺伝子における deep sequencing、ALK 変異陰性例における RNA sequencing を展開している。

### 3. 標的経路

#### ALK 経路

(塚隆一)：近年 ALK の増幅や活性化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。具体的には ALK によってリン酸化の変化した蛋白質と ALK と結合する蛋白質群を抗体アレイおよび粗生成による質量分析によって網羅的に解析し、その機能阻害から ALK 活性化による神経芽腫の発生・進展のシグナルを媒介する分子を明らかにする。さらにそのシグナルを遮断化することによる治療法のモデルをマウスの系で作成し、神経芽腫の新規治療法としての可能性を評価する。

神経芽腫の幹細胞関連遺伝子経路（上條岳彦）：神経芽腫腫瘍検体を用いて腫瘍スフェアを作成する。この腫瘍スフェアから RNA を抽出し、接着状態の際の RNA と比較して腫瘍スフェア特異的に発現する遺伝子群を同定する。この遺伝子群のうちさらに予後因子である分子を選出して、siRNA によるノックダウンでその機能スクリーニングを行い、がん遺伝子として機能する遺伝子の機能解析を行う。神経芽腫細胞における過剰発現系、shRNA によるノックダウン系、さらに遺伝子改変マウスによる機能解析を行う。特に CD133 経路については CD133 が神経芽腫分化抑制に働くことをこれまでに見出し (ONCOGENE, 2011)、さらに CD133 の下流シグナルを明らかにして、フォスファターゼとして PTPRK を同定した。3年次は PTPRK の神経芽腫発がんに関する役割の解析を検討する。

MYCN 合成致死（門松健治）：MYCN トランスジェニックマウスを用いて、腫瘍形成過程で発現が変化し、ヒト神経芽腫で予後と相関性を示し、かつ MYCN 増幅細胞でノックダウンした時に細胞死を招く遺伝子を探し、SMC2 を見出した。また、成長因子ミッドカイン (MK) のブロックでも腫瘍抑制効果を得ているが、これも合成致死に当てはまる可能性がある。MYCN 増幅に依存した細胞死は合成致死と呼ぶことができるが、合成致死は一般にがん治療の重要な戦略となると期待される。本研究では SMC2 の薬剤開発、新たな合成致死分子の探索、MK のブロック法の開発の3つを柱に、難治性神経芽腫の治療開発を目指す。

p53 関連（江成 政人）：近年、分担者は幼若性大細胞リンパ腫や肺がんの発症に関わる ALK 融合蛋白質が p53 を直接的にチロシンリン酸化し、その機能を不活化することを明らかとした。さらに、ALK 融合蛋白質陽性のがんにおいて、p53 変異が稀であること、そして p53 経路の活性化によって ALK 阻害剤耐性細胞の出現を完全に抑制することを見出した。そこで、本研究では、ALK 陽性神経芽腫においても、p53 が ALK によるチロシンリン酸化を受けるかどうか調べるとともに、p53 経路の活性化が ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性の抑制にも有効かどうか検証する。方法としては、ALK 陽性神経芽腫の p53 チロシンリン酸化を部位特異的な抗体を用いて調べる。また、p53 活性化剤 Nutlin-3a により ALK 阻害剤耐性が回避できるかについても検討する。

4. 臨床検体の臨床情報を整理し、臨床検体と臨床情報、上記の網羅的解析を加えたデータベースの基盤を構築する。：JNBSG（日本神経芽腫スタディグループ）は、2006年に日本全体の神経芽腫を包括してその臨床情報の把握、及び、国際的に発信できる臨床試験の遂行を目的に設立された。今回、網羅的検索の対象となる神経芽腫検体が採取されている施設のほとんどは、JNBSG 登録施設であることから、臨床情報データベースの作成について、JBBSG 登録施設に関しては、JNBSG のデータセンターを活用して、各 JNBSG 登録施設に詳細な臨床情報の再検索依頼を行い、臨床情報と分子遺伝情報を併合したデータベースの作成を構築する。田尻達郎が JNBSG の検体について、上條岳彦が従来の千葉県がんセンター症例、2014年11月以降の埼玉県立がんセンター症例の検体について、臨床情報として下記項目の情報を各施設から入手し、データベースの

臨床情報部分を形成する。また田口は九州大学症例について臨床情報・分子診断情報・遺伝情報を統括しており、九州大学症例で独自の情報についてデータベースへの提供を担当する。

{初発時年齢、初期治療、病期、MYCN コピー数、DNA ploidy, 1p/11q/17q LOH, フェリチン、LDH, 原発部位、転移部位、病理診断、MKI, 予後、性別、再発部位、二次がんの有無}

## 研究成果と考察

### 全期間 (研究終了時)

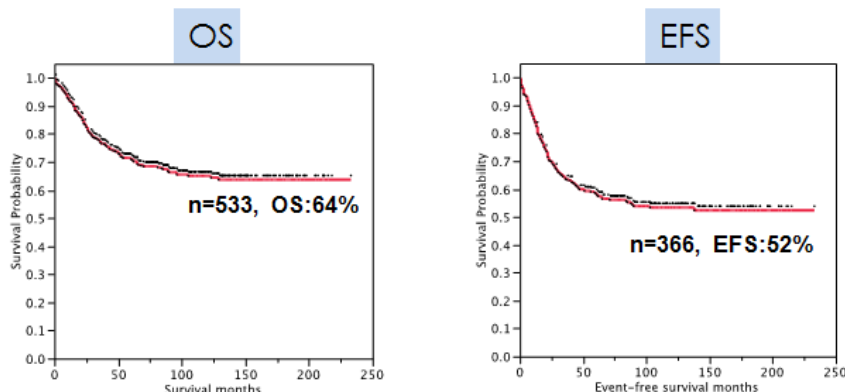
#### 1 神経芽腫腫瘍検体の網羅的分子異常解析

神経芽腫における分子病態の全体像を解明するために、494 例の大規模検体において、既知の神経芽腫関連遺伝子の target sequencing およびゲノムコピー数の網羅的解析を行い genetic landscape を作成した。このうち 220 例に関しては、ALK の免疫染色の結果(ALK スコア)も得られたため、landscape と統合した解析を行った。また、神経芽腫の分子病態においてエピゲノム制御の異常が関与するか否かにつき 50 例の腫瘍検体を用いて、網羅的メチル化アレイによる解析を行った。その結果、ゲノム異常を基盤とした 6 つのサブグループ(A:ALK、B:Other mutation、C:MYCN+1p LOH、D:11q LOH、E:Hyperploidy、F:silent)と ALK スコアの関連性は低いものの、ALK スコアが高い群では、MYCN 増幅よりも ALK 変異が有意な予後不良因子となることが明らかとなった。また、網羅的メチル化解析の結果、神経芽腫は 4 つのサブグループに分類されたが、高メチル化群に分類された例は、MYCN の増幅、年長児かつ予後不良という特性を有していた。以上の結果より、ゲノム異常に加えて病理所見を統合したサブグループ分類は、より精度の高い予後予測に寄与することが判明した。また、メチル化異常も MYCN の増幅などのゲノム異常と協調して悪性化に関与している可能性が示された。これらの結果は、日本癌学会学術集会、日本小児血液癌学会、2016ANR(国際神経芽腫学会)で発表された。また、論文としての発表は文献に記載した。

#### 2 神経芽腫臨床分子データベース基盤構築

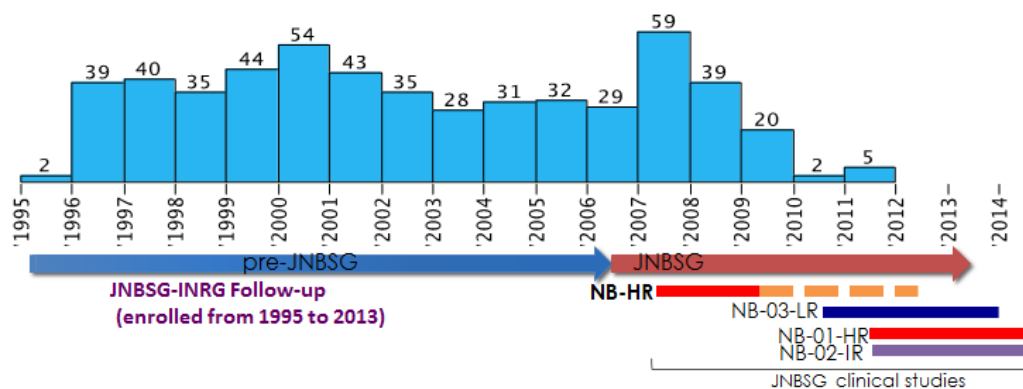
JNBSG (日本神経芽腫スタディグループ) は、2006 年に日本全体の神経芽腫を包括してその臨床情報の把握、及び、国際的に発信できる臨床試験の遂行を目的に設立された。本邦全体の神経芽腫の臨床情報と分子遺伝情報を併合したデータベースを作成して解析し、基礎研究者への提供を目的として、JNBSG データセンターから JBBSG 登録施設に再検索依頼を開始し、2014 年 11 月末までに各施設から回収を終了した。88 施設に調査ファイルを送付し、81 施設から回収、対象症例 2104 例中、1830 例が回収可能であった。平成 26 年度末までに千葉県がんセンターが JNBSG 施設から回収した臨床情報とデータの統合を行った結果、集計解析作業が可能な症例は、1923 例であった。27 年度から解析を開始し、年齢、病期、原発部位、転移部位、病理組織分類、晩期合併症、全生存率、無病生存率の一次解析を行った。回収データの項目記載不備の部分が多く、データのクリーンアップが必要である。今後、詳細なゲノム解析データの存在する 500 例を中心にデータクリーンアップを行う予定であり、絶対必要項目に関しては、再度、施設への調査を検討中である。平成 28 年度は、施設への再調査データを踏まえてデータクリーンアップ後のデータの二次解析を行う予定である。JNBSG/千葉県がんセンター登録施設 81 施設から神経芽腫の臨床情報のデータを回収し、臨床情報と分子遺伝情報を併合したデータベースを構築した。回収した 1830 例のうち、初診時のデータがあり転帰の判明している 1146 例を対象とした。男児 641 例、女児 505 例、診断時年齢の中央値は 1 歳 4 ヶ月 (0 歳台が最多で、以後年齢とともに減少) で、817 例 (73.1%) が非マススクリーニング (MS) 例であった。原発部位は副腎 (56.5%)、後腹膜 (21.4%)、胸部 (11.8%) の順に多く、57.7%が Stage3/4 の進行例であった。体細胞遺伝子変異については、MYCN 増幅が 16.5% (非 MS 例では 23.6%)、1p 欠失 29.3%、11q 欠失 13.6%、17q 増加 8.5%にみられた。病理組織型は 84.5%が神経芽腫、53.8%が favorable histology であった。全生存率 (OS) は 66.8±4.3%、無イベント生存率 (EFS) は 64.8±1.8%であったが、非 MS 例に限れば OS 60.8±2.4%、EFS 52.0±2.5%であった。近年の欧米での神経芽腫の生存率は 70%前後であることから、本邦の治療成績は欧米に比してやや劣っている可能性も考えられた。晩期合併症は 15.2%にみられ、肝・胃腸・腎泌尿器の障害が最多 (4.8%) で、聴力障害 (4.2%)、低身長 (3.4%) がこれに次いで多かった。現在、JNBSG の高リスク (NB-DP, NB-HR, NB-01)、中間リスク (NB-02)、低リスク (NB-03) 臨床試験の症例、および合併症併発症例についてのゲノムアレイ CGH 解析を行った症例の再解析を行っている。神経芽腫において重要なゲノム変化である 1p loss, 11q LOH, 17q gain をこれらの症例を優先に再解析し、ゲノム分類と治療成績、合併症の関連を検討している。これらの結果は、日本癌学会学術集会、日本小児血液癌学会、2016ANR(国際神経芽腫学会)で発表された。2016ANR の発表の際の 537 例の解析を行った。

### Kaplan-Meier survival curves of 537 patients whose tumors have been examined by aCGH



Median follow-up period: OS=66 months; EFS:61.5 months (min.0-max.233 months)

### Year of diagnosis/enrolment of 537 patients/tumors examined by aCGH



### 3 標的分子の分子生物学的実験・分子遺伝学的実験

神経芽腫において NLRR1 の発現は予後不良群で高いことが分かっていたが、他の腫瘍においての発現を免疫染色、real-time PCR、ライセートアレイで検討したところ、肺がんや乳がんなどにおいて正常組織に比べ高い発現が認められたことから、NLRR1 の発現が様々な癌腫においてがんの進展・増悪化に関与していることが示唆された。一方、NLRR1 発現を shRNA でノックダウンした細胞や NLRR1 ノックアウトマウスの初代培養細胞における検討から、NLRR1 の欠損により増殖シグナルが減弱し、細胞増殖が著しく抑制されることが分かってきたが、この NLRR1 が持つ機能の責任領域は不明のままであった。そこで、NLRR1 の各ドメイン欠損タンパク質を発現させ、細胞増殖及び EGF 処理による ERK のリン酸化への影響を検討した。その結果、Fibronectin type III ドメインを欠損させた NLRR1 の発現により細胞増殖が有意に低下した。また EGF による ERK のリン酸化の減弱が観察されたことから、Fibronectin type III ドメインが NLRR1 の機能に重要であることを見いだした。神経芽腫における OCT4 の役割を解析し、その神経芽腫肝細胞性における促進効果を明らかにした。(中川原)

神経芽腫で ALK に結合するリン酸化蛋白質として同定した Flotillin-1 (FLOT1) はエンドサイトーシスを介して ALK 蛋白質の分解に関わることを示した。また、神経芽腫で見られる F1174L など幾つかの変異に関して、変異型 ALK と FLOT1 との結合能が野生型に比べ著明に減少しているのが確認された。ヒト神経芽腫組織の解析においても予後不良群の組織で FLOT1 の発現は低下しており、FLOT1 の発現低下や FLOT1 との結合能が低い ALK 変異により ALK 蛋白質の安定性が増すことが神経芽腫のがん化シグナルの増強と悪性化に関わり、このような細胞は crizotinib など ALK 阻害剤に感受性が高い可能性が示唆された。また同じく ALK に結合する分子として新たに同定したチロシンホスファターゼ SHP2 (PTPN11) は、ALK 自体または Src によりチロシンリン酸化を受け、神経芽腫細胞のアポトーシス抑制に関わることを示された。SHP2 はドッキング分子 ShcC とともに ALK と複合体を作り、ALK の活性化シグナルを下流の Erk や Akt に媒介して神経



芽腫の進展を制御していると考えている。ALK のシグナルを負と正に制御するこの 2 つのシステムのバランスが、神経芽腫の薬剤感受性、幹細胞性、転移能などの性質にどのように関わるか今後調べる必要がある。(堺)

神経芽腫がん幹細胞と考えられる腫瘍スフェア形成において、これまで報告した CD133 に加えて、転写因子 CDX1 が重要であることを明らかにした。CDX1 は CD133 及び OCT4, SALL4, KLF5 などの reprogramming factors を誘導し、神経芽腫腫瘍スフェアの増殖、神経芽腫移植腫瘍増殖を正に制御していることが判明した。特に神経芽腫スフェアにおける CD133 転写調節に重要なプロモーター部位を明らかにし、同部位に CDX1 が直接結合して転写を活性化することが示された。神経芽腫細胞 SMS-SAN および NGP に、レンチウイルスを用いて FLAG タグ融合ヒト CDX1 を高発現させた。その細胞の RNA を用い、アジレント Low Input Quick-Amp Labeling Kit を用いてラベリングし、Sure Print G3 Human G3 ver. 2.0 マイクロアレイチップに供して遺伝子の発現解析を行った。細胞の恒常性を維持し、組織幹細胞の増殖を促進することが知られている、受容体下流のパスウェイに係る遺伝子の発現上昇が、統計的に有意差をもって複数見出された。以上の結果を 2016 ANR 学会にて報告した。今後は CDX1 の inducible-knockin マウスが作出されたので、生体内における CDX1 の発がんにおける役割を明らかにしたい。CD133 についてはその下流シグナル経路が明らかにされていなかったが、CD133C 末部位をベイトとして YEAST-2-Hybrid スクリーニングを行った。その結果、PTPRK フォスファターゼを CD133 結合分子として同定した。PTPRK フォスファターゼによって脱リン酸化されるチロシン部位を決定し、その CD133 下流シグナルに与える影響を明らかにした (上條)。

胎児期 (E13.5) のマウスの腹腔交感神経節から初代培養した sphere については、野生型マウス sphere では継代できないが、MYCN-Tg sphere は継代でき、さらに後者はマウス皮下に移植することで腫瘍を形成できた。そこで、昨年行った sphere の mRNA 解析、DNA メチル化解析をさらに進展させた。MYCN 下流遺伝子の発現が誘導されることのみならず、ポリコム標的遺伝子の発現抑制が起こっており、逆にポリコム 2 複合体遺伝子は発現が上昇していることが分かった。DNA メチル化解析では分化関連遺伝子群のプロモーター領域のメチル化の亢進を確認した。加えて、プロモーター領域メチル化遺伝子群の遺伝子発現が、ヒト神経芽腫でのステージなどをよく反映することが明らかになり、少なくとも MYCN-Tg sphere の遺伝子発現、DNA メチル化の解析はヒト神経芽腫の病態解明に直に迫る可能性が高いことを見出した (門松)。

神経芽腫の約 10% 程度において、ALK 遺伝子の遺伝子増幅や変異活性化が起こっていることが知られていることから ALK 阻害剤が ALK 陽性神経芽腫の分子標的薬候補として考えられている。また、神経芽腫において p53 遺伝子の変異はほとんど認められず、p53 経路も神経芽腫の標的としてなり得ると仮説を立てて実験を行った。H26 年度までに p53 経路の活性化が ALK 陽性神経芽腫の ALK 阻害剤耐性を低減させることを見出し、H27 年度では更にその ALK 阻害剤耐性の分子メカニズムを探索した。ALK 陽性神経芽腫 NB-39nu 細胞を ALK 阻害剤単独で処理すると、p53 経路への変化や E2F1 の発現変化はほとんど起こらず N-Myc の発現が増加した。また p53 経路の活性化剤である Nutlin-3a 単独で処理すると、p53 経路の活性化が惹起され E2F1 や N-Myc の発現は顕著に減少した。面白いことに、ALK 阻害剤と p53 活性化剤を併用処理すると、アポトーシス関連の p53 標的遺伝子 PUMA の発現が増加し、細胞増殖停止関連の p53 標的遺伝子 p21 の発現が低下した。この結果から ALK 経路の阻害が p53 経路に影響を与え、細胞増殖停止からアポトーシスのシグナルへと p53 を介した転写選択がシフトしたことを示唆した。(江成)

#### 倫理面への配慮

ヒト試料の解析研究を含む臨床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。千葉県がんセンター倫理委員会では課題 23-2、課題 24-101 として承認されている。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ま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。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

研究開始以前のもので特記すべきもの

1. がん研究開発費による成果としての記載があるもの  
(上條岳彦)

1. Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, Ohira M, Kamijo T, Kondo S, Fujii Y, Nakagawara A. Shf, a novel adaptor protein, interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 104:563-572, 2013

(中川原章)

1. Li Y, Nakagawara A. Apoptotic cell death in neuroblastoma. *Cells* 2:432-459. 2013

2. Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J. Clin. Invest.* 123:2935-2947. 2013

2. がん研究開発費による成果としての記載はないが、関連するもの  
(中川原章)

1. Sugimoto T, Gotoh T, Yagyu S, Kuroda H, Iehara T, Hosoi H, Ohta S, Ohira M, Nakagawara A. A MYCN-amplified cell line derived from a long-term event-free survivor among our sixteen established neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 2013 Apr 30;331(1):115-21.

2. Chand D, Yamazaki Y, Ruuth K, Schönherr C, Martinsson T, Kogner P, Attiyeh EF, Maris J, Morozova O, Marra MA, Ohira M, Nakagawara A, Sandström PE, Palmer RH, Hallberg B. Cell culture and Drosophila model systems define three classes of anaplastic lymphoma kinase mutations in neuroblastoma. *Dis Model Mech.* 2013 Mar;6(2):373-82.

3. Nozato M, Kaneko S, Nakagawara A, Komuro H. Epithelial-mesenchymal transition-related gene expression as a new prognostic marker for neuroblastoma. *Int. J. Oncol.* 42:134-140. 2013

4. Wu D, Ozaki T, Yoshihara Y, Kubo N, Nakagawara A. Runt-related Transcription Factor 1 (RUNX1) Stimulates Tumor Suppressor p53 in Response to DNA Damage Through Complex Formation and Acetylation. *J. Biol. Chem.* 288:1353-1364. 2013

(堺隆一)

1. Miyazawa M, Uekita T, Ito Y, Seiki M, Yamaguchi M, Sakai R. CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 11:628-3, 2013

(門松健治)

1. Kishida S, Mu P, Miyakawa S, Fujiwara M, Abe T, Sakamoto K, Onishi A, Nakamura Y, Kadomatsu K. Midkine promotes neuroblastoma through Notch2 signaling. *Cancer Res.* 2013 Feb 15;73(4):1318-27.

2. Kadomatsu K, Kishida S, Tsubota S. The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. *J Biochem.* 2013, Jun;153(6):511-21

(牛島俊和)

1. Okochi-Takada, E, Hattori, N, Tsukamoto, T, Miyamoto, K, Ando, T, Ito, S, Yamamura, Y, Wakabayashi, M, Nobeyama, Y and Ushijima, T. ANGPTL4 is a secreted tumor-suppressor that inhibits angiogenesis. *Oncogene*. 2013 May 20. doi: 10.1038/onc.2013.174..
2. Asada, K, Watanabe, N, Nakamura, Y, Ohira, M, Westermann, F, Schwab, M, Nakagawara, A and Ushijima, T. Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. *Jpn J Clin Oncol*, 43: 641-645, 2013.

(田尻達郎)

1. Iehara T, Hamazaki M, Tajiri T, Kawano Y, Kaneko M, Ikeda H, Hosoi H, Sugimoto T, Sawada T; Japanese Infantile Neuroblastoma Cooperative Study Group. Successful treatment of infants with localized neuroblastoma based on their MYCN status. *Int J Clin Oncol*. 2013 Jun;18(3):389-95.
2. Kohashi K, Nakatsura T, Kinoshita Y, Yamamoto H, Yamada Y, Tajiri T, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y: Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression. *Hum Pathol*.44 : 526-533, 2013

(滝田順子)

1. Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S. Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013 May 9.
2. Nishimura R, Takita J (corresponding author), Sato-Otsubo A, Kato M, Koh K, Hanada R, Tanaka Y, Kato K, Daichi Maeda D, Fukayama M, Sanada M, Hayashi Y, Ogawa S: Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer Sci*. 2013 Apr 11. doi: 10.1111/cas.12173.

(江成政人)

1. Hirokazu Ohata, Makoto Miyazaki, Ryo Otomo, Yuko Matsushima-Hibiya, Chihiro Otsubo, Takahiro Nagase, Hirofumi Arakawa, Jun Yokota, Hitoshi Nakagama, Yoichi Taya and Masato Enari: NuMA is required for the selective induction of p53 target genes. *Mol. Cell. Biol.*, 33, 2447-2457, 2013

## 第1年次

(2013年度以降の発表論文など)  
(雑誌論文)

1. がん研究開発費による成果としての記載があるもの  
(上條岳彦)
  1. Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author). Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway. *Eur J Cancer*. 2014 Feb 19. pii: S0959-8049(14)00096-3. doi: 10.1016/j.ejca.2014.01.023

(中川原章)

1. Hasan MK, Nafady A, Takatori A, Kishida S, Ohira M, Suenaga Y, Hossain S, Akter J, Ogura A, Nakamura Y, Kadomatsu K, Nakagawara A. ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci. Rep.* 3:3450. doi: 10.1038/srep03450. 2013

2. がん研究開発費による成果としての記載はないが、関連するもの  
(上條岳彦)

1. Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int*. 2013 Nov;29(11):1147-52.

(中川原章)

1. Yu F, Gao W, Yokochi T, Suenaga Y, Ando K, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A. RUNX3 interacts with MYCN and facilitates protein degradation in neuroblastoma. *Oncogene*. 2013 Jul 15. doi: 10.1038/onc.2013.221. [Epub ahead of print]

2. Shum CK, Lau ST, Tsoi LL, Chan LK, Yam JW, Ohira M, Nakagawara A, Tam PK, Ngan ES. Krüppel-like factor 4 (KLF4) suppresses neuroblastoma cell growth and determines non-tumorigenic lineage differentiation. *Oncogene*. 32:4086-4099. 2013

3. Sugimoto T, Gotoh T, Yagyu S, Kuroda H, Iehara T, Hosoi H, Ohta S, Ohira M, Nakagawara A. A MYCN-amplified cell line derived from a long-term event-free survivor among our sixteen established neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett*. 331:115-121. 2013

4. Ozaki T, Wu D, Sugimoto H, Nagase H, Nakagawara A. Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) inhibits p53-dependent apoptosis through the collaboration with HDAC6 in response to DNA damage. *Cell Death Dis*. 4:e610. 2013

5. Yamazaki F, Nakazawa A, Osumi T, Shimojima N, Tanaka T, Nakagawara A, Shimada H. Two cases of neuroblastoma comprising two distinct clones. *Pediatr. Blood Cancer*. doi: 10.1002/pbc.24779. 2013

6. Suenaga Y, S. M. Rafiqul Islam, Jennifer Alagu, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shibata T, Nakamura Y, Ohira M, Haraguchi S, Takatori A, Nakagawara A. NCYM, a Cis-Antisense Gene of MYCN, Encodes a De Novo Evolved Protein that Inhibits GSK3b Resulting in the Stabilization of MYCN in Human Neuroblastomas. *PLoS Genet*. 10:e1003996. 2014.

7. Ando K, Ozaki T, Hirota T, Nakagawara A. NFBD1/MDC1 Is Phosphorylated by PLK1 and Controls G2/M Transition through the Regulation of a TOPOII $\alpha$ -Mediated Decatenation Checkpoint. *PLoS One*. 8:e82744. 2013

(塚隆一)

1. Shirakihara T, Kawasaki T, Fukagawa A, Semba K, Sakai R, Miyazono K, Miyazawa K, Saitoh M. Identification of integrin  $\alpha 3$  as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes. *Cancer Sci*. 104:1189-97, 2013

2. Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Hashiguchi A, Abe H, Sakamoto M, Sakai R. Suppression of autophagy by CUB domain-containing protein 1 signaling is essential for anchorage-independent survival of lung cancer cells. *Cancer Sci*. 104:865-70, 2013

(門松健治)

1. Dongliang Cao, Satoshi Kishida, Peng Huang, Ping Mu, Shoma Tsubota, Masaaki Mizuno, and Kenji Kadomatsu. A New Tumorsphere Culture Condition Restores Potentials of Self-Renewal and Metastasis of Primary Neuroblastoma in A Mouse Neuroblastoma Model. *PLoS One*. In press. 2014

2. Kishida S, Kadomatsu K. Involvement of midkine in neuroblastoma tumorigenesis. *Br J Pharmacol*. In press, 2014

(牛島俊和)

1. Asada, K, Ando, T, Niwa, T, Nanjo, S, Watanabe, N, Okochi-Takada, E, Yoshida, T, Miyamoto, K, Enomoto, S, Ichinose, M, Tsukamoto, T, Ito, S, Tatematsu, M, Sugiyama, T and Ushijima, T. FHL1 on chromosome X is a single-hit gastrointestinal tumor-suppressor gene and contributes to the formation of an epigenetic field defect. *Oncogene*, 32: 2140-2149, 2013.

2. Asada K, Abe M, Ushijima T. Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas. *J Hum Genet.* 2013;58(7):428-33.

3. Asada K, Watanabe N, Nakamura Y, Ohira M, Westermann F, Schwab M, Nakagawara A, Ushijima T. Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. *Jpn J Clin Oncol.* 2013;43(6):641-5.

(田尻達郎)

1. Hiyama E, Ueda Y, Onitake Y, Kurihara S, Watanabe K, Hishiki T, Tajiri T, Ida K, Yano M, Kondo S, Oue T: A cisplatin plus pirarubicin-based JPLT2 chemotherapy for hepatoblastoma :experience and future of the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor(JPLT). *Pediatr Surg Int* 29:1071-1075, 2013

(学会発表)

(江成政人) 1. Masato Enari: INACTIVATION OF p53 PATHWAY IN ALK FUSION-POSITIVE TUMORS THROUGH THE DIRECT TYROSINE PHOSPHORYLATION OF p53. Preconference on p53/6th International p63/p73 Workshop (Kazusa), Symposia, Sep. 15. 2013.

(知的財産権)

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別
CDX1測定による神経芽腫の悪性度の決定と予後判定	上條岳彦、竹信尚典	千葉県	特願2013-002842	平成25年1月10日	国内

## 第2年次

(雑誌論文)

1. がん研究開発費による成果としての記載があるもの  
(堺隆一)

1. Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R. Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res.* 74: 3790-3801, 2014

2. Yamaguchi H, Takanashi M, Yoshida N, Ito Y, Kamata R, Fukami K, Yanagihara K, Sakai R. Saracatinib impairs the peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma cells resistant to Met and FGFR inhibitors. *Cancer Sci.* 105: 528-536, 2014

3. Yamaguchi H, Yoshida H, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, Yashiro M, Sakai R. Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PlosOne* 9(1):e85485, 2014

4. Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Iwakawa R, Narisawa-Saito M, Nakashima K, Tsuta K, Tsuda H, Kiyono T, Yokota J, Sakai R. Oncogenic Ras/ERK signaling activates CDCP1 to promote tumor invasion and metastasis. *Mol Cancer Res.* 12: 1449-1459, 2014

(門松健治)

1. Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies.

2. Murakami-Tonami Y, Kishida S, Takeuchi I, Katou Y, Maris JM, Ichikawa H, Kondo Y, Sekido Y, Shirahige K, Murakami H, Kadomatsu K. Inactivation of SMC2 shows a synergistic lethal response in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Cell Cycle*. 2014 Apr 1;13(7):1115-31

3. Kishida S, Kadomatsu K. Involvement of midkine in neuroblastoma tumorigenesis. *Br J Pharmacol*. 2014 Feb;171(4):896-904.

4. Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, Kadomatsu K. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One*. 2014 Jan 22;9(1):e86813.

2. がん研究開発費による成果としての記載はないが、関連するもの  
(上條岳彦)

1. Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y.  
RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. *Cancer Lett*. 2014 Mar 26. pii: S0304-3835(14)00179-7.

2. Sun Y, Furihata T, Ishii S, Nagai M, Harada M, Shimozato O, Kamijo T, Motohashi S, Yoshino I, Kamiuchi A, Kobayashi K, and Chiba K. Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers: potential biomarker implications. *Clinical and Translational Medicine*, 2014, in press

(門松健治)

1. Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine: an emerging target of drug development for treatment of multiple diseases. *Br J Pharmacol*. 2014 Feb;171(4):811-3

(田尻達郎)

1. Janette M, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K: Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma *BioMed Cancer* 2014

2. Hirakawa M, Nishie A, Asayama Y, Fujita N, Ishigami K, Tajiri T, Taguchi T, Honda H: Efficacy of preoperative transcatheter arterial chemoembolization combined with systemic chemotherapy for treatment of unresectable hepatoblastoma in children: *Jpn J Radiol* 32:529-536, 2014.

(滝田順子)

1. Hoshino A, Nomura K, Hamashima T, Isobe T, Seki M, Hiwatari M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Kanegane H. Aggressive transformation of anaplastic large cell lymphoma with increased number of ALK-translocated chromosomes. *Int J Hematol*. 2014 Nov 22.

2. Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, Kato M, Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma. *Cancer Res*. 74:2742-9, 2014

3. Takita J, Chen Y, Kato M, Ohki K, Sato Y, Ohta S, Sugita K, Nishimura R, Hoshino N, Seki M, Sanada M, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S. Genome-wide approach to identify second gene targets for malignant rhabdoid tumors using high-density oligonucleotide microarrays. *Cancer Sci*. 105:258-64, 2014

4. Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S,

Yamaguchi S. Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth. J Pediatr Hematol Oncol. 36:166-168, 2014

(江成政人)

1. Ryo Otomo, Chihiro Otsubo, Yuko Matsushima-Hibiya, Makoto Miyazaki, Fumio Tashiro, Hitoshi Ichikawa, Takashi Kohno, Takahiro Ochiya, Jun Yokota, Hitoshi Nakagama, Yoichi Taya, and Masato Enari: TSPAN12 is a critical factor for cancer-fibroblast cell contact-mediated cancer invasion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, in press, 2014.

2. Chihiro Otsubo, Ryo Otomo, Makoto Miyazaki, Yuko Matsushima-Hibiya, Takashi Kohno, Reika Iwakawa, Fumitaka Takeshita, Hirokazu Okayama, Hitoshi Ichikawa, Hideyuki Saya, Tohru Kiyono, Takahiro Ochiya, Fumio Tashiro, Hitoshi Nakagama, Jun Yokota, and Masato Enari: TSPAN2 Is Involved in Cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression. Cell Reports, 7,527-538, 2014.

(田口智章)

1. Sakamoto S, Kasahara M, Mizuta K, Kuroda T, Yagi T, Taguchi T, Inomata Y, Umeshita K, Uemoto S: Nationwide survey of the outcomes of living donor liver transplantation for hepatoblastoma in Japan.: Liver Transpl 20(3):333-46, 2014

2. Kohashi K, Yamamoto H, Kumagai R, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y: Differential microRNA expression profiles between malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma: miR193a-5p is suggested to downregulate SMARCB1 mRNA expression.: Mod Pathol 27(6):832-839,2014

3. Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y: Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma.: Hum Pathol 45(9):1900-1909,2014

### 第3年次

(雑誌論文)

1. がん研究開発費による成果としての記載があるもの

(上條岳彦)

1. Shimozato O, M Waraya, K Nakashima, H Soda, N Takiguchi, H Yamamoto, H Takenobu, H Uehara, E Ikeda, S Matsushita, N Kubo, A Nakagawara, T Ozaki, and T Kamijo (corresponding author) PTPRK-mediated tyrosine dephosphorylation of CD133 regulates its down-stream AKT activation and apoptotic cell death, Oncogene, 2015

(門松健治)

1. Nakaguro M, Kiyonari S, Kishida S, Cao D, Murakami-Tonami Y, Ichikawa H, Takeuchi I, Nakamura S, Kadomatsu K. The nucleolar protein PES1 is a marker of neuroblastoma outcome and is associated with neuroblastoma differentiation. Cancer Sci. 2015 Mar;106(3):237-43. Highlighted by "In This Issue"

2. Lu F, Kishida S, Mu P, Huang P, Cao D, Tsubota S, Kadomatsu K.( Fangjin Lu, Satoshi Kishida, Ping Mu, Peng Huang, Dongliang Cao1, Shoma Tsubota and Kenji Kadomatsu) NeuroD1 promotes neuroblastoma cell growth by inducing the expression of ALK. Cancer Sci. ,2015,106(4):390-6.

3. Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies. Expert Opin Drug Discov. 2015 Jan;10(1):53-62. doi: 10.1517/17460441.2015.974544.

2. がん研究開発費による成果としての記載はないが、関連するもの

(上條岳彦)

1. Nakazawa A, Haga C, Ohira M, Okita H, Kamijo T, Nakagawara A. Correlation between the International Neuroblastoma Pathology Classification and genomic signature in neuroblastoma.

2. Sai S, Wakai T, Vares G, Yamada S, Kamijo T, Kamada T, Shirai T. Combination of carbon ion beam and gemcitabine causes irreparable DNA damage and death of radioresistant pancreatic cancer stem-like cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2015 Mar 20;6(8):5517-35.

(門松健治)

1. Takeda-Uchimura Y, Uchimura K, Sugimura T, Yanagawa Y, Kawasaki T, Komatsu Y, Kadomatsu K. Requirement of keratan sulfate proteoglycan phosphacan with a specific sulfation pattern for critical period plasticity in the visual cortex. *Exp Neurol*. 2015 Aug 12. pii: S0014-4886(15)30066-2. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.005.
2. Kiyonari S, Iimori M, Matsuoka K, Watanabe S, Morikawa-Ichinose T, Miura D, Niimi S, Saeki H, Tokunaga E, Oki E, Morita M, Kadomatsu K, Maehara Y, Kitao H. The 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand in oxaliplatin induces p53-dependent transcriptional repression of factors involved in thymidylate biosynthesis. *Mol Cancer Ther*. 2015 Jul 24. pii: molcanther.0748.2014.
3. Maeda K, Kosugi T, Sato W, Kojima H, Sato Y, Kamimura D, Kato N, Tsuboi N, Yuzawa Y, Matsuo S, Murakami M, Maruyama S, Kadomatsu K. CD147/Basigin limits lupus nephritis and TH 17 cell differentiation by inhibiting the IL-6/STAT3 pathway. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Apr 17. doi: 10.1002/art.39155.
4. Matsuda Y, Haneda M, Kadomatsu K, Kobayashi T. A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naïve (CD27-) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells in vitro via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen. *Cell Immunol*. 2015 Mar 6;295(2):127-136. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.02.011.
5. Arima H, Omura T, Hayasaka T, Masaki N, Hanada M, Xu D, Banno T, Kobayashi K, Takeuchi H, Kadomatsu K, Matsuyama Y, Setou M. Reductions of docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine levels in the anterior horn of an ALS mouse model. *Neuroscience*. 2015 Apr 2;297:127-136. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.060.
6. Chen D, Ito S, Yuan H, Hyodo T, Kadomatsu K, Hamaguchi M, Senga T. EML4 promotes the loading of NUDC to the spindle for mitotic progression. *Cell Cycle*. 2015;14(10):1529-39. doi: 10.1080/15384101.2015.1026514.
7. Ishikawa Y, Imagama S, Ohgomori T, Ishiguro N, Kadomatsu K. A combination of keratan sulfate digestion and rehabilitation promotes anatomical plasticity after rat spinal cord injury. *Neurosci Lett*. 2015 Apr 23;593:13-8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.03.015.
8. Yuan Y, Makita N, Cao D, Mihara K, Kadomatsu K, Takei Y. Atelocollagen-Mediated Intravenous siRNA Delivery Specific to Tumor Tissues Orthotopically Xenografted in Prostates of Nude Mice and Its Anticancer Effects. *Nucleic Acid Ther*. 2015 Apr;25(2):85-94. doi: 10.1089/nat.2014.0526.
9. Sato Y, Sato W, Maruyama S, Wilcox CS, Falck JR, Masuda T, Kosugi T, Kojima H, Maeda K, Furuhashi K, Ando M, Imai E, Matsuo S, Kadomatsu K. Midkine Regulates BP through Cytochrome P450-Derived Eicosanoids. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Aug;26(8):1806-15. doi: 10.1681/ASN.2013121259.
10. Fujimoto H, Ohgomori T, Abe K, Uchimura K, Kadomatsu K, Jinno S. Time-dependent localization of high- and low-sulfated keratan sulfates in the song nuclei of developing zebra finches. *Eur J Neurosci*. 2015 Nov;42(9):2716-25. doi: 10.1111/ejn.13073.
11. Foyez T, Takeda-Uchimura Y, Ishigaki S, Narentuya, Zhang Z, Sobue G, Kadomatsu K, Uchimura K. Microglial Keratan Sulfate Epitope Elicits in Central Nervous Tissues of Transgenic Model Mice and Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Am J Pathol*. 2015 Nov;185(11):3053-65. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.07.016.
12. Ueno R, Miyamoto K, Tanaka N, Moriguchi K, Kadomatsu K, Kusunoki S. Keratan sulfate exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 2015 Dec;93(12):1874-80. doi: 10.1002/jnr.23640.



(田尻達郎)

1. Higashi M, Kolla V, Iyer R, Naraparaju K, Zhuang T, Kolla S, Brodeur GM: Retinoic acid-induced CHD5 upregulation and neuronal differentiation of neuroblastoma. *Mol Cancer* 14: 150, 2015.
2. Fumino S, Kimura K, Iehara T, Nishimura M, Nakamura S, Souzaki R, Nishie A, Taguchi T, Hosoi H, Tajiri T: Validity of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from two centers in Western Japan. *J Pediatr Surg* 2015.
3. 田尻達郎：日本における小児悪性固形腫瘍の治療とグループスタディの現状 *チャイルドヘルス* Vol 18 No.3 21-25, 2015

(田口智章)

- 1 Kinoshita Y, Tanaka S, Souzaki R, Miyoshi K, Kohashi K, Oda Y, Nakatsura T, Taguchi T. Glypican 3 expression in pediatric malignant solid tumors. *Eur J Pediatr Surg.* 25(1):138-44, 2015
- 2 Kohashi K, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Yamamoto H, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y. ERG and SALL4 expressions in SMARCB1/INI1-deficient tumors: a useful tool for distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor. *Hum Pathol.* 46(2):225-30, 2015
- 3 Oba U, Koga Y, Hoshina T, Suminoe A, Abe K, Hayashida M, Taguchi T, Hara T. An adolescent female having hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus genotype H with a deletion mutation in the pre-S2 region. *J Infect Chemother.* 21(4):302-304, 2015
- 4 Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraishi Y, Sato Y, Kato M, Chiba K, Tanaka H, Hoshino N, Nagae G, Shiozawa Y, Okuno Y, Hosoi H, Tanaka Y, Okita H, Miyachi M, Souzaki R, Taguchi T, Koh K, Hanada R, Kato K, Nomura Y, Akiyama M, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun.* 6:7557, 2015
- 5 Kuda M, Kohashi K, Yamada Y, Maekawa A, Kinoshita Y, Nakatsura T, Iwamoto Y, Taguchi T, Oda Y. FOXM1 expression in rhabdomyosarcoma: a novel prognostic factor and therapeutic target. *Tumour Biol.* [Epub ahead of print], 2015

(滝田順子)

1. Hoshino A, Nomura K, Hamashima T, Isobe T, Seki M, Hiwatari M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Kanegane H. Aggressive transformation of anaplastic large cell lymphoma with increased number of ALK-translocated chromosomes. *Int J Hematol.* 101:198-202, 2015
2. Lambertz I, Kumps C, Claeys S, Lindner S, Beckers A, Janssens E, Carter DR, Cazes A, Cheung BB, De Mariano M, De Bondt A, De Brouwer S, Delattre O, Gibbons J, Janoueix-Lerosey I, Laureys G, Liang C, Marshall GM, Porcu M, Takita J, Camacho Trujillo D, Van Den Wyngaert I, Van Roy N, Van Goethem A, Van Maerken T, Zabrocki P, Cools J, Schulte JH, Vialard J, Speleman F, De Preter K. Upregulation of MAPK negative feedback regulators and RET in mutant ALK neuroblastoma: implications for targeted treatment. *Clin Cancer Res.* 2015 Mar 24. pii: clincanres.2024.2014. [Epub ahead of print]
3. Kawasaki Y, Makimoto M, Nomura K, Hoshino A, Hamashima T, Hiwatari M, Nakazawa A, Takita J, Yoshida T, Kanegane H. Neonatal acute megakaryoblastic leukemia mimicking congenital neuroblastoma. *Clin Case Rep.* 3: 145-149, 2015.
4. Kato M, Ishida H, Koh K, Inagaki J, Kato K, Goto H, Kaneko T, Cho Y, Hashii Y, Kurosawa H, Takita J, Hamamoto K, Inoue M, Sawada A, Suzuki R, Kato K. Comparison of chemotherapeutic agents as a myeloablative conditioning with TBI for pediatric ALL: a study from the pediatric ALL working group of

the JSHCT. *Pediatr Blood Cancer* 62:1844-1850, 2015

5. Monoi A, Sugawa M, Kato M, Seki M, Watanabe K, Yoshida K, Sakaguchi H, Hama A, Ogawa S, Oka A, Takita J. A case of atypical dyskeratosis congenita presenting as myelodysplastic syndrome and genetically diagnosed using whole-exome sequencing. *Oncology Letters* (in press)
6. Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraishi Y, Sato Y, Kato M, Chiba K, Tanaka H, Hoshino N, Nagae G, Shiozawa Y, Okuno Y, Hosoi H, Tanaka Y, Okita H, Miyachi M, Souzaki R, Taguchi T, Koh K, Hanada R, Kato K, Nomura Y, Akiyama M, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun*. 2015 Jul 3;6:7557. doi: 10.1038/ncomms8557.
7. Soejima T, Sato I, Takita J, Koh K, Maeda M, Ida K, Kamibeppu K. Support for school reentry and relationships among children with cancer, peers, and teachers. *Pediatr. Int.* 2015 Jun 17. doi: 10.1111/ped.12730.
8. Akiyama M, Yamaoka M, Mikami-Terao Y, Ohyama W, Yokoi K, Arakawa Y, Takita J, Suzuki H, Yamada H. Somatic mosaic mutations of IDH1 and NPM1 associated with cup-like acute myeloid leukemia in a patient with Maffucci syndrome. *Int J Hematol*. 2015 Oct 27. [Epub ahead of print]
9. Kato M, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Oyama R, Arakawa Y, Kishimoto H, Taki T, Akiyama M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Mitsuiki N, Kajiwara M, Mizutani S, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Koh K, Takita J. Genomic analysis of clonal origin of Langerhans cell histiocytosis following acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2015 Nov 5. doi: 10.1111/bjh.13841 [Epub ahead of print]
10. Honda H, Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Akinori K, Onishi N, Honda Z, Tanaka K, Sata M, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J, Sera Y, and Ikeda K. ALKR1275Q perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion, and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. *Oncogene* (in press)

(江成政人)

1. Murayama T, Nakaoku T, Enari M, Nishimura T, Tominaga K, Nakata A, Tojo A, Sugano S, Kohno T, Gotoh N. CD74-*NRG1*, an oncogenic fusion gene product, leads to insulin-like growth factor 2 autocrine/paracrine circuit and confers cancer stem cell properties. *Cancer Res*, in press, 2015.
2. Okano N, Oike T, Saitoh J, Shirai K, Enari M, Kiyono T, Isono M, Torikai K, Ohno T, Nakano T. In vitro determination of the relative biological effectiveness of carbon-ion beam irradiation in cells derived from human normal lung tissues. *Exp Ther Med*, in press, 2015.
3. Totta P, Pesiri V, Enari M, Marino M, Acconcia F. Clathrin heavy chain interacts with estrogen receptor  $\alpha$  and modulates 17 $\beta$ -estradiol signalling. *Molecular Endocrinology*, 2015; 29: 739-755.

(堺隆一)

1. Yamaguchi H, Sakai R. Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion. *Cancers (Basel)*. 2015 Oct 14;7(4):2054-62.
2. Ueno H, Tomiyama A, Yamaguchi H, Uekita T, Shirakihara T, Nakashima K, Otani N, Wada K, Sakai R, Arai H, Mori K. Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal kinase-paxillin axis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Dec 4;468(1-2):240-7.