

(平成 27 年度研究報告書)

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 シークエ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。

平成 27 年度研究経費

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
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
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	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)

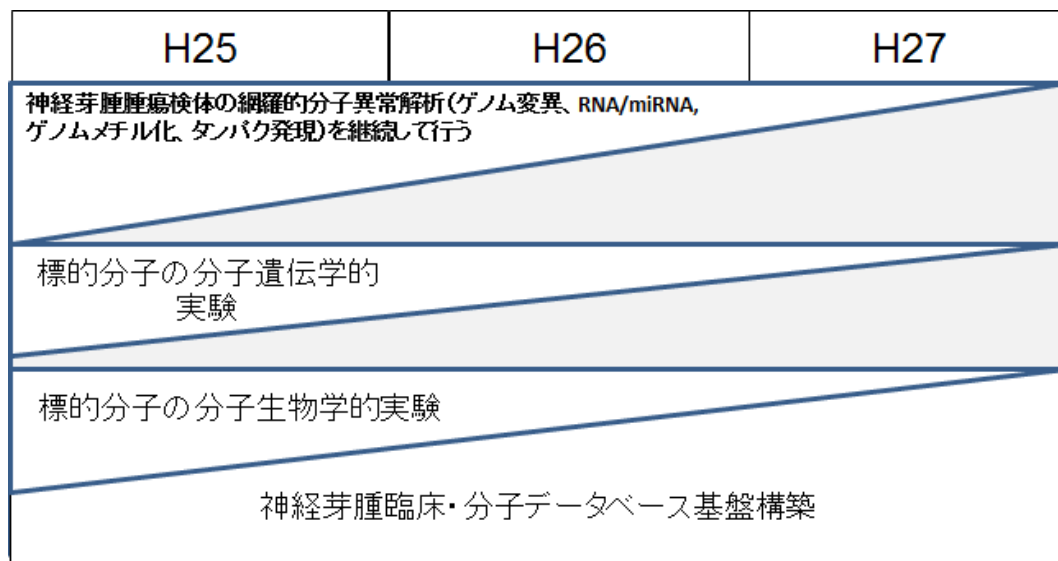
(目的)

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、無病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%) が非マスキリング (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 $66.8 \pm 4.3\%$ 、無イベント生存率 (EFS) は $64.8 \pm 1.8\%$ であったが、非 MS 例に限れば OS $60.8 \pm 2.4\%$ 、EFS $52.0 \pm 2.5\%$ 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。

第3年次

(到達目標)

- 1 神経芽腫腫瘍検体の網羅的分子異常解析
- 2 神経芽腫臨床分子データベース基盤構築
- 3 標的分子の分子生物学的実験・分子遺伝学的実験

(年次評価時点の実績要点)

- 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。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。(滝田)。

神経芽腫スフェア形成因子候補分子群の機能解析として、網羅的解析によって同定した 2 分子の過剰発現を行った。神経芽腫スフェア形成因子候補分子 CXX と HXX がスフェア形成能を制御していることが明らかになった。(上條)。

- 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。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。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 (田尻、田口、上條)。

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；体細胞遺伝子変異；病理組織型；全生存率；無イベント生存率などを解析した。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 (瀧本)。

- 3 標的分子の分子生物学的実験・分子遺伝学的実験

神経芽腫細胞に、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。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結果、細胞の恒常性の維持し、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(上條)。

MYCN 下流遺伝子の発現が誘導されることのみならず、ポリコーム標的遺伝子の発現抑制が起こっており、逆にポリコーム 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）。

本年度は ALK 阻害剤耐性の分子メカニズムを探索することを目的とした。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。現在、N-Myc 及び E2F1 と p53 経路との関連性について調べている。（江成）

神経芽腫における ALK 受容体キナーゼに結合するチロシンリン酸化蛋白質の解析を進めた。ALK と結合してそのエンドサイトーシスと分解に関わることを示した膜蛋白質 Flotillin-1 は、TNB-1 細胞においてノックダウンにより発現量を下げると造腫瘍能が増す一方で、クリゾチニブやアレクチニブなどの ALK 阻害剤に対する感受性も増すことを示した。またチロシンホスファターゼの SHP2 は、以前より研究を進めていた ShcC を介して ALK と結合し、ALK による悪性化シグナルを増強する方向に働くことを示した。ShcC-SHP2 経路は Erk1 や STAT3 など下流分子の活性化を誘導することに加え、Src キナーゼによっても制御を受けていることが示唆され、新しい治療標的になりうる可能性を考えている。（堺）

研究成果と考察

第3年次評価時点

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:Hyperploid、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（滝田）。

神経芽腫スフェア形成因子候補分子群の機能解析として、網羅的解析によって同定した 2 分子の過剰発現を 3 種類の神経芽腫細胞株 (NGP, IMR32, SMS-SAN) で行った。これらのすべての細胞株において、神経芽腫スフェア形成因子候補分子 CXX と HXX がスフェア形成能を制御していることが明らかになった。この CXX をレンチウイルスを用いたノックダウンシステムによって機能解析した。ノックダウンによってスフェア形成能が低下したが、通常の接着培養条件では、増殖能に影響を与えないことが分かった（上條）。

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、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、絶対必須項目に関しては、再度、施設への調査を検討中。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（田尻、田口、上條）。

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。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（瀧本）。

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。遺伝子発現は Genespring GX 13.1 上で統計学的に有意かつ、コントロールに対して 2 倍以上の発現増加を検出した遺伝子に対して、パスウェイ解析を行った。その結果、細胞の恒常性の維持し、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。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（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、ポリコーム標的遺伝子の発現抑制が起こっており、逆にポリコーム 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。前年度までに 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がわかったので、本年度では更にその ALK 阻害剤耐性の分子メカニズムを探索することを目的とした。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。現在、N-Myc 及び E2F1 と p53 経路との関連性について調べている。（江成）

神経芽腫における ALK 受容体キナーゼに結合するチロシンリン酸化蛋白質の解析を進めた。前年までに ALK と結合してそのエンドサイトーシスと分解に関わることを示した膜蛋白質 Flotillin-1 は、TNB-1 細胞においてノックダウンにより発現量を下げると造腫瘍能が増す一方で、クリゾチニブやアレクチニブなどの ALK 阻害剤に対する感受性も増すことを示した。またチロシンホスファターゼの SHP2 は、以前より研究を進めていた ShcC を介して ALK と結合し、ALK による悪性化シグナルを増強する方向に働くことを示した。ShcC-SHP2 経路は Erk1 や STAT3 など下流分子の活性化を誘導することに加え、Src キナーゼによっても制御を受けていることが示唆され、新しい治療標的になりうる可能性を考えている。また、ALK 阻害剤は現在 ALK 遺伝子の変異を伴う症例にのみ用いられているが、ALK 蛋白質の高発現は ALK の活性化変異や遺伝子増幅の存在しない大多数の症例においてもその予後増悪因子であることが示されており、我々が見出した

Flotillin-1やShcC-SHP2経路のバランスによって感受性を予測すればその適応を拡大できるのではないかと考え、in vivoの実験を進めている。(堺)

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

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. *Cancer Sci.* 2015 Jun;106(6):766-71. doi: 10.1111/cas.12665. Epub 2015 Apr 22

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.

(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, Imori 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 α and modulates 17 β -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.