

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：なぜ遺伝子変異なしでがんができるのか：その分子基盤解明と標的探索
2. 研究開発代表者：埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所・所長・上條岳彦
3. 研究開発の成果

神経芽腫におけるエピゲノム・トランスクリプトーム解析を中心に施行し、これにゲノム解析、プロテオーム解析を加えたマルチオミックス解析を行い、“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構を解明することを目的として研究を行った。

(ヒト神経芽腫腫瘍スフェアのトランスクリプトーム解析；ヒト神経芽腫腫瘍スフェアのエピジェネティック解析)

腫瘍スフェア形成させた神経芽腫細胞 2 株でトランスクリプトーム解析を行い、神経芽腫がん幹細胞制御パスウェイを解析した。CDX1 過剰発現時と類似した CDX1, CD133 および初期化因子 OCT4, KLF4 の増加が見られた。この結果は CDX1 が神経芽腫スフェアの形成に重要な因子であることを強く示唆するものであると考えられた。また、WNT 経路の遺伝子群の一部も CDX1 発現と一致して、スフェアで増加していた。神経芽腫スフェアの形成に伴い、ポリコーム PRC2 の EZH1 と SUZ12 の転写促進が見られた。トランスクリプトーム解析の結果腫瘍化に伴い PRC1 の活性にも変化が認められている。

初代培養 Tumor Sphere における Sphere 形成因子・がん幹細胞性制御因子をさらに同定するために、コントロールとして iPS から樹立した神経堤細胞を用いる。トランスクリプトーム解析・エピゲノム解析、統合解析の結果、ゲノムメチル化によって down-regulate された遺伝子群は、カドヘリン関係のものが多く認められた。脱メチル化により、up-regulate された遺伝子群は、神経関係の分子 (synapse 関連) が多く見られた。

(マウス神経芽腫がん幹細胞の新規培養法開発とエピゲノム解析)

これまでに、マウス神経芽腫腫瘍スフェア培養法を確立し、E13.5 の時期から MYCN<sup>Tg</sup> マウス交感神経節からは継代可能なスフェアを培養でき、腫瘍形成能があることを明らかにした。これを材料に野生型と比較すると、MYCN 下流遺伝子群をはじめ、きわめて特徴的な機能を持つ遺伝子群が 1.5 倍以上の有意な変化を示した。殊にヒストン修飾に関与する遺伝子群の変化が目をつけた。また、ゲノムレベルの異常はほとんど見られない一方、DNA メチル化に差異を見出した。

(神経芽腫腫瘍検体の proteome 解析 (神経芽腫における ALK 阻害剤の奏効性や抵抗性を決定する因子の解析))

神経芽腫細胞 TNB-1 にタグ付きの ALK 全長を発現し、タグの抗体および抗リン酸化チロシン抗体 4G10 の 2 段階のカラム精製により ALK と結合するチロシンリン酸化蛋白質を質量分析により次々に同定した。同定した約 30 の蛋白質のうち IRS1, SOS1, Grb2, ZO-1 など幾つかについては、ALK との結合がリンパ腫など他の系でも報告されており、この手法で ALK 結合蛋白質が確かに同定されていることが示唆された。新規の ALK 結合チロシンリン酸化蛋白質の一つ Flotillin-1 (FLOT1) は神経芽腫においては ALK と選択的に結合し、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、FLOT1 の発現低下により 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に関わることを示された。

(神経芽腫におけるゲノム・エピゲノム解析)

神経芽腫における分子病態の全体像を解明するために、新鮮腫瘍 500 例における神経芽腫関連遺伝子

の deep sequencing、SNP アレイ解析、96 例における網羅的ゲノム解析を施行した。その結果、なんら遺伝子異常、ゲノム異常をもたないサイレント群は 500 例中 83 例であった。この 83 例の中には、高リスク群や死亡例も含まれており、一部の予後不良群は、ゲノム異常を全く有しないことが判明し、これらの腫瘍の悪性化には非翻訳領域の異常が関与している可能性が示唆された。また網羅的メチル化解析の結果、非階層的クラスタリングにより、神経芽腫は 3 群に分類されることが判明した。このうちの 1 群は、正常副腎と類似のメチル化パターンを示したことから、この群では、メチル化異常の発がんへの関与は少ないものと推測された。

(JCCG 神経芽腫委員会 (JNBSG) の神経芽腫臨床データの解析と基礎研究者への提供)

本邦の多くの神経芽腫検体の分子遺伝情報については JNBSG 設立以前より千葉県がんセンターが中心となり解析を行い、データ管理を行ってきた。JNBSG 設立以降の JNBSG 施設の症例のデータについては管理の主体を JNBSG データセンターへ移管しており、非 JNBSG 施設のデータは千葉県がんセンターで継続的にデータ管理がされている。この両者のデータを統合し、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する。

#### 4. その他

特記なし。