

平成30年 8月21日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10921

研究課題名(和文) 神経芽細胞腫予後良好因子の病態制御機構の解明と自然消退への応用

研究課題名(英文) Elucidation of favorable neuroblastoma factor and its application for the pathological control

研究代表者

山岡 絵美(福田絵美)(YAMAOKA, EMI)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・研究員

研究者番号：20403503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：予後良好な神経芽腫で高発現していたDHRS3、CYP26A1、NROB1を過剰発現系で神経芽腫細胞株SKNSH、NH12、TGW、GOTO、NH6などに導入し機能解析を行った。DHRS3とNROB1は、細胞増殖、細胞周期の抑制、造腫瘍能力の低下などが誘導され、RNAseqを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析では、細胞周期や細胞増殖に関する遺伝子の発現が低下し、レチノイドX受容体活性化pathway、JNKsignaling、腫瘍の抑制および腫瘍増殖の促進に関与するTGF- signalingの抑制に関わる遺伝子群を見出した。DHRS3とNROB1は神経芽腫の自然縮退に関連する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We performed functional analysis of DHRS3, CYP26A1 and NROB1, highly expressed in favorable neuroblastoma transfected into neuroblastoma cell lines such as SKNSH, NH12, TGW, GOTO and NH6 with an overexpression and silencing system. DHRS3 and NROB1 induced cell proliferation, cell cycle suppression, decreased tumorigenic ability. In exhaustive transcriptome analysis using RNAseq, expression of genes related to cell cycle and cell proliferation was decreased. We found the group of genes involved in the suppression of TGF-signaling involved in the retinoid X receptor activation pathway, JNKsignaling, tumor suppression and promotion of tumor growth. Therefore, DHRS3 and NROB1 may be associated with spontaneous degeneration of neuroblastoma.

研究分野：小児がん

キーワード：小児がん 神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

神経芽細胞腫(NB)は、乳児において最も一般的な固形腫瘍であり、小児癌による死亡の大きな原因となる。交感神経節および副腎大で最もよく見られ、傍脊椎腫瘍、Horner 症候群、肝臓浸潤、骨髄転移および副腎腫瘍などの様々な臨床的な症状がみられる。神経芽腫は国際的な神経芽細胞腫病期分類システム(INSS)の病理分類に基づいて分類され、予後不良と予後良好の腫瘍がある。神経芽細胞腫の予後不良群は高悪性度であり、予後良好群は分化または退縮する。

これまでに当研究室では、オリゴマイクロアレイで神経芽腫の遺伝子発現解析を行い、腫瘍死した予後不良群と、長期生存した予後良好群を比較し、予後良好群で高発現していた遺伝子を抽出した。そのうち上位は短鎖デヒドロゲナーゼレクターゼの *DHRS3*、シトクロム P450 スーパーファミリーの *CYP26A1*、レチノイン酸受容体を仲介する転写調節因子の *NR0B1* であった。

2. 研究の目的

これらの遺伝子発現の予後調査では、神経芽腫と神経節腫でこれら3つの遺伝子が高発現していた群は有意に予後良好で、3つとも高発現していた群では長期にわたり全例生存していたため、本研究では、これらの遺伝子が神経芽腫細胞株にどのような効果を与えるかを検討した。

3. 研究の方法

実験にはヒト神経芽腫細胞株(NH12, TGW, SK-N-SH, GOTO, IMR-32, BE2, NH-6)を用いた。

まず、3遺伝子のcDNAライブラリをクローニングし、プラスミドの過剰発現ベクター、ノックダウンベクター、ドキシサイクリン依存的に発現調節の可能なレトロウイルス TetOn ベクターも構築した。これらのベクターを神経芽腫細胞株に導入し、FACSにてソートした後、安定発現株クローンを樹立し機能解析を行った。

4. 研究成果

はじめに、神経芽腫細胞株における3つの遺伝子の mRNA の発現量をリアルタイム PCR で調べた。その結果 *DHRS3* は、いずれの細胞株でも低発現で、*CYP26A1* と *NR0B1* では発現があった。それに対し、各遺伝子を強制発現した細胞株では、mRNA の高発現をみとめた。

ドキシサイクリンの添加による Tet-On での発現系では、発現誘導後6時間から mRNA の発現が誘導された。ウェスタンブロットで神経芽腫細胞株における内在性のタンパク質発現を調べると、導入前の神経芽腫では *DHRS3* の発現は検出できず、*CYP26A1* と *NR0B1* の発現も低レベルであったが、強制発現株ではタンパク質の発現を確認した。

各遺伝子を過剰発現させた細胞は継代中に殆どが死滅し、残ったものも *DHRS3* と *NR0B1* を発現させたものは扁平化した。*CYP26A1* では、細胞接着性が弱くなり、浮遊しているものがみられた。

細胞増殖アッセイの結果では、*DHRS3* は、NH12, SK-N-SH, TGW, NH6 のすべてで細胞増殖の抑制が誘導された。*CYP26A1* は、レトロウイルスの系ではベクターより増殖していたが、プラスミドでは増殖抑制された。*NR0B1* を導入した細胞は NH12 と TGW で増殖抑制され、レトロウイルスの系では差はなかった。

次に、ベクター-RNAi を行ったところ、*DHRS3* は SKNSH と NH12 で有意に増殖抑制効果がみられ、*CYP26A1* では NH12 と TGW では培養中に死滅し、*NR0B1* では全ての細胞で増殖阻害が引き起こされ、これらの遺伝子をノックダウンしても一部の神経芽腫で増殖阻害が誘導された。

遊走能を調べるために、過剰発現系で創傷治癒アッセイを行いスクラッチエリアを越えた細胞の浸潤を観察すると、*DHRS3* はベクターと比較して、NH12 で遊走脳の

低下がみられた。

CYP26A1 は TGW と SKNSH で、凝集が起こり、細胞間接着の増強が見られ創傷閉鎖の阻害を起こしていた。NR0B1 では TGW と NH12 で遊走能の低下がみられた。

これらの過剰発現クローンのうち、特に SK-N-SH および NH12 を発現する DHRS3 は、G1 細胞周期停止を誘導し、コロニー形成能力を低下させ、10 日以内に特徴を分化し、主に細胞死を誘導した。

次に、これらの過剰発現株にソフトアガーコロニーフォーメーションアッセイを行い腫瘍の足場依存性を調べると、SK-N-SH と NH12 ではコロニーサイズが優位に縮小していた。コロニー形成効率は、SK-N-SH の DHRS3 と NR0B1 では優位に低下したが、他の細胞株ではその傾向はみられなかった。

過剰発現させた神経芽腫細胞株をセルソーターにかけ、細胞周期解析を行った結果、DHRS3 を強発現させたとき、SK-N-SH と NH12 では細胞周期の G0-G1 停止がみられたのに対して、CYP26A1 と NR0B1 は停止しなかった。

また、DHRS3 と NR0B1 を強発現したとき、スキャッタープロット上で細胞の核の大きさは増加していた。タンパク質発現を蛍光免疫染色で可視化し、局在をしらべた。一過性のトランスフェクションでは外因性 DHRS3 は細胞膜や小胞体に広く分布していた。安定発現株では、DHRS3 は脂肪滴に局在しているのが観察された。p53 が DHRS3 の脂肪滴 (Lipid Droplet) への蓄積を行うと報告があり、p53WT の NH12 と SK-N-SH では小胞体 (ER) への集積が確認されたが、p53mutant の TGW では脂肪滴への移行がみられなかった。

DHRS3 過剰発現株を 超解像度顕微鏡 (DeltaVision OMX)、および透過型電子顕

微鏡で観察したところ、DHRS3 が脂肪滴へ集積している様子が観察された。

超解像度顕微鏡での観察においては、一過性発現では細胞全体に発現していたものが脂肪滴へと局在し、レチノイン酸代謝経路で代謝されていることが示唆された。

これらの細胞株の細胞老化の有無を調べるため SA-beta-gal で染色を行うと、NR0B1 を発現した細胞株は強陽性であり、強い細胞老化が示唆された。

RNAseq を用いた網羅的なトランスクリプトーム解析では、発現が変動している遺伝子のうち、ベクターと比較して2倍以上 up と down レギュレーションされている遺伝子数の中から、低リードの遺伝子をフィルターし、Strand NGS と IPA (Ingenuity PathwaysAnalysis)TM で解析を行った。

このうち細胞のプロファイルが類似している NH12 と SKNSH を比較し、Upregulation と Downregulation が共通していた遺伝子を抽出した。

DHRS3 過剰発現株では、44 の Entity List に対して、GO 解析とパスウェイ解析を行った結果、細胞運動や細胞形態変化、細胞死や細胞周期などのパスウェイの抑制が示唆された。

これらの遺伝子群の上流では、F2 や TGFB3 の阻害が予測された。

DHRS3 過剰発現株で NH12 と SKNSH でオーバーラップしていた遺伝子を絞りこみ、GO 解析とパスウェイ解析を行い、44 の遺伝子を抽出し、細胞運動や細胞形態変化、細胞周期のパスウェイの抑制が示唆され、そのうち 8 つの細胞形態と細胞周期に関与している遺伝子に着目した。

これらの 8 つの遺伝子の関与しているカノニカルパスウェイに関連遺伝子の発現をオーバーラップさせると、レチノイド X 受容体活性化パスウェイを介してその下流のジャンクシグナリングや、腫瘍の抑制および腫瘍増殖の促進

に關与する TGF- β シグナリングの抑制に關連する遺伝子群が抑制されていた。

CYP26A1 ではオーバーラップしていたトータル246の遺伝子をパスウェイ解析すると、細胞運動、細胞形態、細胞周期などの抑制が予測され、SK-N-SH と NH12 ではレチノイド X 受容体レチノイン酸媒介性遺伝子活性化パスウェイが示唆された。

NR0B1 からは27のオーバーラップした遺伝子を抽出し、それらをパスウェイ解析した結果、細胞形態や細胞死などのパスウェイが關連づけられ P38-MAPk signaling などのパスウェイの關連が示唆された。

これらのことから、DHRS3 と NR0B1 は神経芽腫の細胞株の自然縮退に關与するものと考えられる。

これら DHRS3 と NR0B1 の薬剤での発現制御については、過剰発現系であるため低分子化合物での活性化を行い調節する創薬標的とするのは困難であるが、これらのレチノイン酸受容体活性化パスウェイや、TGF- β シグナリングの上流または下流のシグナル伝達経路は、間接的な神経芽腫治療のためのターゲットになるとして、さらなる検討を続けている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 5 件)

山岡 絵美
日本癌学会学術総会
(2017、パシフィコ横浜)
DHRS3 と NR0B1 は神経芽腫細胞株の分化と増殖抑制を誘導する

山岡 絵美
日本分子生物学会学術総会 (2017、パシフィコ横浜)
予後良好な神経芽細胞腫で高発現していた DHRS3, NR0B1, CYP26A1 の機能解析

山岡 絵美
日本癌学会学術総会
(2016、パシフィコ横浜)
予後良好な神経芽細胞腫で発現していた 3 遺伝子の機能解析

山岡 絵美

日本分子生物学会学術総会 (2016、パシフィコ横浜)

Analysis of differentiation inducible factor candidates in human neuroblastoma cell lines.

山岡 絵美

日本分子生物学会学術総会 (2015、神戸ポートアイランド)

Functional analysis of DHRS3, CYP26A1 and NR0B1 genes expressed in favorable neuroblastoma.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 絵美 (Yamaoka, Emi)

広島大学・自然科学研究支援開発センター
研究員

研究者番号: 20403503

(2) 研究分担者

栗原 将 (Kurihara, Sho)

広島大学・医歯薬保健研究科・病院助教

研究者番号: 40724894