

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10110

研究課題名(和文) 神経芽腫のがん微小環境制御におけるRab蛋白質の役割に関する研究

研究課題名(英文) Role of Rab family small G proteins in the regulation of neuroblastoma microenvironment

研究代表者

西村 範行(Nishimura, Noriyuki)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：00322719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：半数以上の患者が再発する高リスク神経芽腫は、著しい治療抵抗性を示す代表的な小児がんである。遺伝子変異を伴わず、がん微小環境および治療ストレスによって誘導されるがんの多様性は、治療抵抗性の根本的な要因となり、種々のサイトカインの分泌・取り込みを調節するRabファミリー低分子量G蛋白質(Rab)によって制御されると考えられる。本研究では、がん微小環境の主要な構成細胞で様々なサイトカインを分泌する間葉系幹細胞に注目し、神経芽腫のがん微小環境制御におけるRab蛋白質の役割を明らかにすることを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高リスク神経芽腫は、著しい治療抵抗性を示し、患者の半数以上が再発する代表的な小児がんである。がんの治療抵抗性獲得には、がん微小環境や治療ストレスによって誘導され、種々のサイトカインの分泌・取り込みを調節するRabファミリー低分子量G蛋白質(Rab)によって制御されるがんの多様性が重要だと考えられる。そこで本研究では、神経芽腫のがん微小環境におけるRab蛋白質の役割を明らかにすることを試みた。その成果は、神経芽腫の治療抵抗性獲得メカニズムを明らかにし、新たな治療法の開発、予後の改善に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：High-risk neuroblastoma causes more than 50% relapse and shows therapy resistance. This is mainly due to tumor heterogeneity that is induced by tumor microenvironment and therapy stress and controlled by Rab family small G proteins (Rabs), key regulators of membrane traffic. In the present study, we have identified some members of Rabs, which potentially control the secretion of growth factors and tumor markers in neuroblastoma microenvironment.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：神経芽腫細胞 がん幹細胞 間葉系幹細胞 腫瘍随伴線維芽細胞 Rab

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、小児がん死亡の約 15% を占める代表的な難治性小児がんである。特に、その半数以上が再発し、治療困難な高リスク群患者の予後改善は、現在の小児がん診療における喫緊の課題である。近年の大規模なゲノム解析によって、がん組織は、遺伝子変異の違いに基づいて性質の異なるがん細胞の集団から構成される不均一な組織であると示された。さらに、自己複製能および多分化能を持ち少数の細胞からがん組織を形成できるがん幹細胞(CSC)と呼ばれる細胞集団は、分化度の異なるその他のがん細胞(non-CSC)を生み出している。がんの多様性は、がんの進展・再発の根本的な要因となっている。特に、同一の遺伝子変異を有するがん細胞が微小環境の違いや治療ストレスによって異なる性質を示すようになったがん細胞集団は、極めて治療困難である。

この遺伝子変異に起因しないがんの多様性には可塑性があり、微小環境から分泌されるエクスソーム、マイクロベジクル、サイトカイン、ケモカイン、メタボライトといった様々な因子が一部の non-CSC に CSC 形質を誘導する。一方、がん細胞から分泌された様々な因子は、微小環境中の間葉系幹細胞(MSC)に腫瘍随伴線維芽細胞(CAF)形質を誘導してがん細胞の形質を維持する微小環境を形成する。つまり、様々な分泌因子を介したがん細胞と微小環境の相互作用が、がんの多様性の本態だと考えられるが、神経芽腫の多様性を誘導する分子機構は不明である。

様々な分泌因子の制御には、細胞内小胞輸送の中心的な制御系である Rab 蛋白質(Rab)が関与すると考えられる。Rab は、特定の膜ドメインに局在する 60 以上のメンバーから構成される低分子量 G 蛋白質ファミリーで、細胞内小胞輸送の特異性・選択性を制御する。Rab のメンバーは、GTP と結合した活性型または GDP と結合した不活性型として存在する分子スイッチであり、GTP 結合型 Rab は、標的蛋白質(複合体)と特異的に結合してその作用を発揮する。Rab の活性化・不活性化は、GDP/GTP 交換因子(Rab GEF)、GTPase 活性化蛋白質(Rab GAP)、GDP 解離抑制因子(Rab GDI)によって時空間的に制御されており、その破綻は、幾つかのヒト疾患の原因となり、神経芽腫を含むがんの発症・進展・再発に関与することが報告されている。

これまでに研究代表者らは、細胞内小胞輸送の制御機構に注目して、Rab GDI の神経特異的に発現するアイソフォームの同定と神経芽腫患者検体におけるその発現を示してきた。また、神経芽腫がん幹細胞を単離し、その活性制御に関わる Rab のメンバーとその新規標的蛋白質を単離・同定してきた。次に、神経芽腫腫瘍検体の病理学的検討と *in vitro* 共培養実験によって、神経芽腫の進展における微小環境、特にその主要な構成細胞であるマクロファージおよび MSC の役割を明らかにしてきた。同時に、早産児および正常産児の臍帯から MSC を単離し、それらの遺伝子発現解析および分泌因子の単離・同定を行ってきた。

一方、臨床的な観点からは、がんの治療抵抗性、再発は、微小残存病変(MRD)として捉えられるがん細胞の除去不全(残存)再活性化と捉えられる。神経芽腫では、腫瘍細胞特異的な遺伝子変異が同定されないため、正常細胞に比して腫瘍細胞で高発現する複数の mRNA を組み合わせると MRD が検出されてきた。しかし、組み合わせるマーカー自体が異なり、MRD の臨床的意義は確立されていなかった。これまでに研究代表者らは、神経芽腫 CSC での発現量に基づいた MRD マーカーの再評価を行ってリアルタイム PCR(qPCR)による新しい MRD 評価法を開発し、継続的な MRD モニタリングによって神経芽腫の再発を早期診断できることを示してきた。

### 2. 研究の目的

神経芽腫のがん微小環境制御における Rab の役割を明らかにし、神経芽腫におけるがん細胞と微小環境の相互作用を明らかにすること。

### 3. 研究の方法

#### (1) Rab の発現解析

培養した神経芽腫細胞および MSC から RNA を抽出して、qPCR によって全ての Rab メンバーの発現解析を行った。神経芽腫細胞株として BE(2)-C、IMR-32、SH-SY5Y、NB-69 細胞を、MSC として骨髄および臍帯からの MSC(BM-MSC および UC-MSC)を用いた。

#### (2) MSC の CAF 形質評価

MSC の CAF マーカー( $\alpha$ SMA)の発現誘導活性を qPCR で解析した。qPCR で  $\alpha$ SMA の発現上昇を認めた場合に、CAF 形質を抗  $\alpha$ SMA 抗体による免疫染色で評価した。

#### (3) 神経芽腫細胞の CSC 形質評価

神経芽腫細胞の CSC マーカー(NANOG、OCT4)の発現誘導活性を qPCR で解析した。qPCR で NANOG、OCT4 の発現上昇を認めた場合に、CSC 形質をスフェアアッセイで評価した。

#### (4) 分泌因子の同定

MSC の培養上清中の目的分子を、銀染色した SDS-PAGE 上のバンドとして Mass Spectrometry で同定した。

#### (5) MRD モニタリング

神経芽腫患者の骨髄、末梢血、末梢血幹細胞検体から有核細胞を単離、total RNA を抽出して、

デジタル PCR ( ddPCR ) によって 7 マーカー ( CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2B、TH ) の発現を定量した。

#### 4 . 研究成果

##### (1) 神経芽腫細胞および MSC における Rab の発現解析

培養した神経芽腫細胞株 BE (2) -C、IMR-32、SH-SY5Y、NB-69 細胞および骨髄および臍帯からの MSC ( BM- MSC および UC- MSC ) における Rab の全メンバーの発現解析を行い、各細胞において発現している Rab のメンバーを同定した。

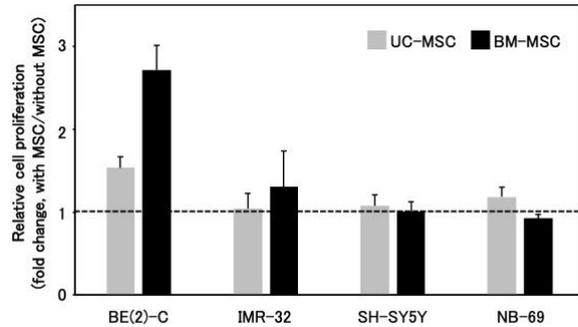
##### (2) 共培養した神経芽腫細胞の CSC 形質および MSC の CAF 形質を制御する Rab の同定

神経芽腫患者の腫瘍検体では、CAF マーカー (  $\alpha$  SMA ) の発現量は神経芽腫の病期、組織学的分類、病理学的悪性度、臨床的リスク分類と有意な相関を示した。また、BE (2) -C 細胞の培養上清は、BM- MSC の CAF 形質を誘導した。

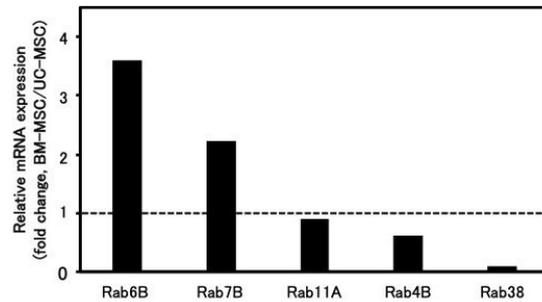
そこで、BM- MSC と UC- MSC の 4 種の神経芽腫細胞株 BE (2) -C、IMR-32、SH-SY5Y、NB-69 に対する増殖促進活性を検討した。IMR-32、SH-SY5Y、NB-69 細胞に対しては、効果のバラツキが大きかったが、UC- MSC と BM- MSC は、BE (2) -C 細胞に対して増殖促進作用を示し、両者の作用に顕著な違いが認められた。

次に、この増殖促進作用の違いを担う Rab メンバーの同定を目指して、UC- MSC と BM- MSC における Rab の発現を qPCR で定量した。Rab6B および Rab7B は、UC- MSC に比して BM- MSC で発現量が顕著に増加し、逆に Rab38 は顕著に低下した。

さらに、神経芽腫細胞と MSC を共培養した際の神経芽腫細胞における CSC マーカー ( NANOG、OCT4 ) および MSC における CAF マーカー (  $\alpha$  SMA ) の発現を定量した。顕著な促進 ( 2 倍以上 ) または抑制 ( 2 分の 1 以下 ) を示す神経芽腫細胞と MSC の組み合わせは認められなかった。そこで、UC- MSC と BM- MSC で発現量に顕著な違いを認めた Rab6B、Rab7B、Rab38 に注目し、それらの Rab をノックダウンおよび過剰発現した神経芽腫 BE-2 ( C ) 細胞を作製し、それらの MSC における CAF マーカー (  $\alpha$  SMA ) の発現誘導活性を系統的に評価した。



神経芽腫細胞増殖におけるMSCの役割



骨髄・臍帯のMSCで発現量の変化するRab蛋白質

##### (3) 共培養した MSC の CAF 形質を制御する Rab をノックダウンおよび過剰発現した神経芽腫から分泌される因子の同定

神経芽腫細胞からの分泌因子の同定には、Rab6B、Rab7B、Rab38 をノックダウンおよび過剰発現した細胞の培養上清を用いた。培養上清を SDS-PAGE、銀染色したゲルの泳動パターンを、各 Rab メンバーをノックダウンした細胞と過剰発現した細胞間で比較し、著しく濃さが変化したバンドを Mass Spectrometry で同定した。

##### (4) 神経芽腫患者の MRD モニタリング

神戸大学病院、兵庫県立子ども病院および神戸大学小児科関連病院から神経芽腫症例を広く集める体制を構築し、患者・家族の同意を得て生検腫瘍組織、骨髄、末梢血、末梢血幹細胞検体を収集した。これまで一般的に行われてきた qPCR よりも、感度、再現性の向上した ddPCR を用いて、MRD マーカーの再評価を行った。神経芽腫細胞株は、神経系の形質を示す N-type、基質接着性を示す S-type、両者の中間の形質を示す I-type に分けられるが、これまでに研究代表者らは、全 types の神経芽腫細胞株および患者検体から樹立した神経芽腫細胞をスフェアーとして培養することによって、ヌードマウスに移植すると神経芽腫を形成する神経芽腫 CSC を単離できることを示してきた。そこで、神経芽腫細胞のスフェアーでの発現量に基づいて、7 マーカー ( CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2B、TH ) を選択し、健常者のコントロールおよび神経芽腫患者検体を用いて、ddPCR による 7 マーカー全てを組み合わせた MRD の評価法を開発した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Thwin KK, Ishida T, Uemura S, Yamamoto N, Lin KS, Tamura A, Kozaki A, Saito A, Kishimoto K, Mori T, Hasegawa D, Kosaka Y, Nino N, Takafuji S, Iijima K, Nishimura N	4. 巻 22
2. 論文標題 Level of Seven Neuroblastoma-Associated mRNAs Detected by Droplet Digital PCR Is Associated with Tumor Relapse/Regrowth of High-Risk Neuroblastoma Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Mol Diagn	6. 最初と最後の頁 236 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmoldx.2019.10.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uemura S, Ishida T, Thwin KK, Yamamoto N, Tamura A, Kishimoto K, Hasegawa D, Kosaka Y, Nino N, Lin KS, Takafuji S, Mori T, Iijima K, Nishimura N	4. 巻 9
2. 論文標題 Dynamics of Minimal Residual Disease in Neuroblastoma Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Oncol	6. 最初と最後の頁 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2019.00455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iwatani S, Yoshida M, Yamana K, Kurokawa D, Kuroda J, Thwin KK, Uemura S, Takafuji S, Nino N, Koda T, Mizobuchi M, Nishiyama M, Fujioka K, Nagase H, Morioka I, Iijima K, Nishimura N	4. 巻 143
2. 論文標題 Isolation and Characterization of Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells from Preterm and Term Infants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vis Exp	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/58806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwatani Sota, Shono Akemi, Yoshida Makiko, Yamana Keiji, Thwin Khin Kyae Mon, Kuroda Jumpei, Kurokawa Daisuke, Koda Tsubasa, Nishida Kosuke, Ikuta Toshihiko, Fujioka Kazumichi, Mizobuchi Masami, Taniguchi-Ikeda Mariko, Morioka Ichiro, Iijima Kazumoto, Nishimura Noriyuki	4. 巻 2017
2. 論文標題 Involvement of WNT Signaling in the Regulation of Gestational Age-Dependent Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cells Int	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/8749751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwatani S, Harahap NIF, Nurputra DK, Tairaku S, Shono A, Kurokawa D, Yamana K, Thwin KKM, Yoshida M, Mizobuchi M, Koda T, Fujioka K, Taniguchi-Ikeda M, Yamada H, Morioka I, Iijima K, Nishio H, Nishimura N	4. 巻 5
2. 論文標題 Gestational Age-Dependent Increase of Survival Motor Neuron Protein in Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Pediatr	6. 最初と最後の頁 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2017.00194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Thwin KK, Lin KS, Ishida T, Uemura S, Yamamoto N, Nishimura N.
2. 発表標題 Expression of seven neuroblastoma-associated mRNAs is correlated between bone marrow and peripheral blood in high-risk neuroblastoma patients
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uemura S, Ishida T, Thwin KK, Lin KS, Yamamoto N, Tamura A, Kishimoto K, Mori T, Hasegawa D, Kosaka Y, Nino N, Takafuji S, Iijima K, Nishimura N.
2. 発表標題 Level of seven neuroblastoma-associated mRNAs analyzed by droplet digital PCR is correlated between bone marrow and peripheral blood in high-risk neuroblastoma.
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Thwin KK, Ishida T, Uemura S, Yamamoto N, Tamura A, Kozaki A, Saito A, Kishimoto K, Hasegawa D, Kosaka Y, Nino N, Takafuji S, Mori T, Iijima K, Nishimura N.
2. 発表標題 Elevated minimal residual disease marker expression in peripheral blood of three high-risk neuroblastoma cases.
3. 学会等名 Advances in Neuroblastoma Research Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Thwin KK, Ishida T, Uemura S, Yamamoto N, Tamura A, Kozaki A, Saito A, Kishimoto K, Hasegawa D, Kosaka Y, Nino N, Takafuji S, Mori T, Iijima K, Nishimura N.
2. 発表標題 Expression profiles of seven minimal residual disease markers in bone marrow and peripheral blood of patients with high-risk neuroblastoma.
3. 学会等名 The 50th Congress of the International Society of Pediatric Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 串田良祐, 若尾昌平, 西村範行, 岩谷壮太, 香田翼, 森岡一朗, 溝淵雅巳, 飯島一誠, 出澤真里.
2. 発表標題 臍帯組織由来Muse細胞の多能性の解析 - 栄養膜細胞分化の可能性 - .
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishimura N, Ishida T, Uemura S, Yamamoto N, Hasegawa D.
2. 発表標題 Detection of minimal residual disease in high-risk neuroblastoma patients by digital PCR.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishimura N, Ishida T, Thwin KK, Uemura S, Yamamoto N, Tamura A, Nino N, Kozaki A, Saito A, Kishimoto K, Hasegawa D, Kosaka Y, Takafuji S, Mori T, Iijima K.
2. 発表標題 Quantitation of minimal residual disease by droplet digital PCR in high-risk neuroblastoma patients.
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto N, Thwin KK, Takafuji S, Uemura S, Nino N, Mori T, Ishida T, Hasegawa D, Kosaka Y, Iijima K, and Nishimura N.
2. 発表標題 Involvement of DENND2A and Rab9B in the progression of neuroblastoma.
3. 学会等名 3rd Asia-Pacific International Symposium of Neuroblastoma (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩谷壮太, 庄野朱美, 山名啓司, Khin Kyae Mon Thwin, 黒川大輔, 西田浩輔, 西山将広, 藤岡一路, 生田寿彦, 吉田牧子, 溝淵雅巳, 森岡一朗, 飯島一誠, 西村範行.
2. 発表標題 早産児の臍帯由来間葉系幹細胞の増殖におけるWNTシグナル経路の役割.
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山名啓司, 岩谷壮太, 黒川大輔, Kyae Mon Thwin Khin, 西田浩輔, 西山将広, 藤岡一路, 庄野朱美, 生田寿彦, 吉田牧子, 溝淵雅巳, 森岡一朗, 飯島一誠, 西村範行.
2. 発表標題 プレオマイシン誘発肺障害モデルラットにおける臍帯由来間葉系幹細胞の効果.
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 串田良祐, 若尾昌平, 西村範行, 岩谷壮太, 香田翼, 森岡一朗, 溝淵雅巳, 飯島一誠, 出澤真里.
2. 発表標題 臍帯組織中に存在する非腫瘍性多能性幹細胞Muse細胞の機能解析.
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山本 暢之  (Yamamoto Nobuyuki)  (20596043)	神戸大学・医学部附属病院・特定助教    (14501)	