

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390475

研究課題名（和文） 神経芽腫における倍数性・異数性染色体異常の発生機構の解明

研究課題名（英文） The mechanism of polyploidy and aneuploidy formation in neuroblastoma

研究代表者

金子 安比古 (KANEKO YASUHIKO)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・所長

研究者番号：50373387

研究成果の概要：

神経芽腫は乳児に発生する予後良好な3倍体(3n)腫瘍と年長児の予後不良な2倍体(2n)腫瘍に大別される。染色体数が増加する要因の1つとして、体細胞分裂時に重要な役割をもつ中心体の異常が知られている。一方、3n神経芽腫は4n細胞の3極分裂により形成されると考えられているが、3極分裂には中心体数の異常を伴うと予想される。そこで、神経芽腫の染色体異常と中心体異常の関連を解析した。乳児と年長児の神経芽腫27例をFISH解析により、染色体 ploidy, 1p欠失およびMYCN増幅の有無を調べた。一方、抗γチューブリン抗体と抗βチューブリン抗体による免疫染色により、中心体の数を数え、その増幅の有無を検討した。染色体数が3倍体領域にある神経芽腫細胞株TGWにヒストンGFPを導入し、細胞分裂の様子をタイムラプス顕微鏡により経時的に観察した。

腫瘍組織27例を解析した結果、中心体増幅は3n腫瘍ではなく、2n腫瘍において検出された。2n腫瘍は予後良好群と不良群に分類され、年長児では2n細胞のみで構成されるが、乳児では多数の2n細胞の他に少数の3n細胞と4n細胞が含まれていた(ploidy divergence)。乳児と年長児の2n腫瘍に共通して中心体が増幅していたが、ploidy divergenceが認められるのは乳児2n腫瘍だけであり、両者における中心体異常の発生機構は異なると考えられた。既に神経芽腫においてMYCN増幅は中心体増幅と相関すると報告されていたが、両者に相関はみられず、MYCN増幅は中心体増幅を誘導しないという所見を得た。一方、3n腫瘍では中心体異常は検出されなかった。4n細胞の3極分裂により3n細胞が形成されるという仮説を踏まえると、親細胞である4n細胞に中心体異常があると推測されるが、3極分裂によって形成される3n細胞の中心体数は正常であり、その後3倍体細胞は2極分裂をして増殖すると考えられた。また、乳児の2n腫瘍と3n腫瘍は共通の4n前駆細胞の細胞質不分離により発生すると推測された。

3倍体細胞の発生に必要な3極分裂が神経芽腫で生じているかどうかを検証するために、神経芽腫細胞株TGWの細胞分裂の様子を調べた。タイムラプス顕微鏡による経時的な観察により3極分裂を確認するとともに、3極分裂により3つの娘細胞が形成される所見を得た。TGW

株は年長児の予後不良神経芽腫由来なので、乳児の3倍体腫瘍に想定される3極分裂と同様な機序で3極分裂が生じているかどうかについては、議論のあるところであるが、神経芽腫細胞は3極分裂を生じるポテンシャルをもつと考えられた。3n細胞は4n細胞を経て3極分裂により形成されるという仮説が支持された。

#### 交付額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：神経芽腫、倍数性・異数性染色体異常、3倍体腫瘍、2倍体腫瘍、中心体異常、3極分裂、MYCN増幅、細胞質不分離

#### 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫のマススクリーニング(マス)は1985年に開始され、2004年に中止された。この生後6ヶ月時のマスによりわかったことは、マスで発見される腫瘍の2/3は自然退縮すると推測されること、年長児腫瘍では18%にみられるに過ぎない3n腫瘍がマス発見腫瘍では88%を占めるということである。従来、乳児神経芽腫の予後は良好であり、年長児神経芽腫の予後は不良であることは知られていたが、3n腫瘍の発見は両者の臨床的予後の差異を生物学的に裏付けた。研究開始当時、テロメラーゼで不死化したケラチノサイト細胞株を用いて、2倍体細胞に生じた染色体不分離が4倍体細胞形成を導き、DNA複製後の4倍体細胞の多極分裂により、倍数性・異数性染色体異常が発生すると報告された(Shi & King, Nature 437:1038, 2005)。これに習って薬剤で2n細胞から4n細胞を形成する実験を試みたが、細胞が死んでしまうので、この

方法による研究を中止した。染色体数が変化する要因の1つとして、体細胞分裂時に重要な役割をもつ中心体の異常が知られている。腫瘍細胞では、染色体数が変化していることが多く、それに伴い中心体数の増幅が観察されている。そこで、神経芽腫の染色体異常と中心体異常の関連を解析した。また3n細胞は3極分裂により形成されるという仮説を実証するために、神経芽腫細胞株の細胞分裂の様子をタイムラプス顕微鏡により経時的に観察した。

#### 2. 研究の目的

神経芽腫は代表的な小児固形腫瘍である。この腫瘍が乳児期に発生すると予後は良好で、自然退縮する場合もあるが、年長児に発生すると、強力な治療を行っても死亡する例が少なくない。私たちはこれまでの研究結果から、予後良好腫瘍は3倍体/5倍体であり、予後不良腫瘍は2倍体/4倍体であることを発見し、神経芽腫の予後(悪性度)を決定して

いるのは倍数性異常であると報告してきた。さらに、3倍体細胞は4倍体細胞がDNA複製後、3極分裂により発生するという仮説を立てた。一方、年長児神経芽腫の一部は3倍体を示し、2倍体/4倍体と同様に予後不良であると報告されている。倍数性異常の発生には、中心体異常、細胞分裂中期チェックポイント遺伝子異常、P53遺伝子異常などが知られている。乳児および年長児に発生する3倍体腫瘍の形成機構を明らかにし、腫瘍の悪性度と倍数性異常の関係を解明することが研究の目的である。

### 3. 研究の方法

乳児と年長児の神経芽腫27例をFISH解析した。使用したプローブは1番染色体セントロメア領域のD1Z1, 同短腕末端領域のD1Z2, 2番染色体セントロメア領域のD2Z1, MYCN (2p24)である。間期核100個のFISHシグナルを数え、1番染色体と2番染色体の数、1p欠失およびMYCN増幅の有無を調べた。

一方、27例を短期間培養し、抗 $\gamma$ チューブリン抗体と抗 $\beta$ チューブリン抗体を用いて中心体と紡錘糸をそれぞれ免疫染色した。100細胞の中心体数を数えた。中心体数が1または2個であれば正常、3個以上であれば、増幅ありと判定した。

染色体数が3倍体領域にある神経芽腫細胞株TGWにヒストンGFPを導入し、細胞分裂の様子をタイムラプス顕微鏡により経時的に観察した。

### 4. 研究成果

腫瘍組織27例を解析した結果、中心体増幅は3n腫瘍ではなく、2n腫瘍において検出された。2n腫瘍は予後良好群と不良群に分類され、年長児では2n細胞のみで構成されるが、乳児では多数の2n細胞の他に少数の3n細胞と4n細胞が含まれていた(ploidy

divergence)。乳児と年長児の2n腫瘍に共通して中心体が増幅していたが、ploidy divergenceが認められるのは乳児2n腫瘍だけであり、中心体異常の発生機構は異なると考えられた。つまり、乳児2n腫瘍の中心体異常は細胞質不分離により生じるのに対して、年長児2n腫瘍の中心体異常は1細胞周期に複数回の中心体複製が起きるため生じると推測された。

神経芽腫においてMYCN増幅と中心体増幅の相関が報告されているが、私たちの研究では両者に相関はみられず、MYCN増幅は中心体増幅を誘導しないという所見を得た。

一方、3n腫瘍では中心体異常は検出されなかった。3n細胞は4n細胞を経て形成されるという仮説を踏まえると、3極分裂によって形成される3n細胞の中心体数は正常であることを示している。4n細胞形成時は細胞質不分離により中心体数が増幅するが、3倍体細胞は2極分裂をしているものと考えられる。以上の結果より、乳児の2n腫瘍と3n腫瘍は共通の4n前駆細胞の細胞質不分離により発生すると推測される。乳児2n腫瘍の1例においては1p<sup>-</sup>、MYCN増幅、中心体増幅を示した。この腫瘍では年長児2n腫瘍と同様な機序で中心体異常が生じていると考えられた。

3倍体細胞の発生に必要な3極分裂が神経芽腫で生じているかどうかを検証するために、神経芽腫細胞株TGWに、ヒストンGFPを導入して細胞分裂の様子を調べた。タイムラプス顕微鏡による経時的な観察により3極分裂を確認するとともに、3極分裂により3つの娘細胞が形成される所見を得た。神経芽腫由来の他2細胞株においても3極分裂が見られた。TGW株および他の2細胞株は年長児の予後不良神経芽腫由来なので、乳児の3倍体腫瘍に想定される3極分裂と同様な機序で3極分裂が生じているかどうかについては、議

論のあるところであるが、神経芽腫細胞は乳児腫瘍と年長児腫瘍の分類にかかわりなく、3 極分裂を生じるポテンシャルをもつと考えられた。3n 細胞は 4n 細胞を経て 3 極分裂により形成されるという仮説が支持された。

#### 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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Fukushi D, Watanabe N, Kasai E, Haruta M, Kikuchi A, Kikuta A, Kato K, Nakadate H, Tsunematsu Y, Kaneko Y. Centrosome amplification is correlated with ploidy divergence, but not with *MYCN* amplification in neuroblastoma tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 188: 32-41, 2009.
- ② Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, Nakagawara A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*, 27: 441-449, 2008.
- ③ Kaneko Y. Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer*, 48: 245-246, 2007.
- ④ Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, Nakagawara A. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood & Cancer*, 46: 285-291, 2006.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kaneko Y, Fukushi D, Watanabe N, Kasai E, Haruta M, Kikuchi A, Kikuta A, Tsunematsu Y. Centrosome amplification is correlated with ploidy instability in infant neuroblastoma (NB) tumors, but not with *MYCN* amplification in infant and childhood NB tumors or cell line. *Advances in Neuroblastoma Research.* 2008.5. 千葉
- ② 笠井文生、福士大輔、渡辺直樹、春田雅之、金子安比古：乳児と小児 2 倍体神経芽腫の特徴—中心体の増幅と異数性細胞の混在—。第 67 回日本癌学会。2008.10. 名古屋。
- ③ 福士大輔、渡辺直樹、春田雅之、金子安比古：神経芽腫の ploidy 異常の発生に 3 極分極が関与するのか？ 第 66 回日本癌学会。2007.10. 横浜
- ④ 金子安比古：Spontaneous regression of neuroblastoma and the mass screening program at 6 months of age. 第 1 回依存性受容体研究会および第 10 回神経芽腫研究会合同会議。2007.10. 東京。
- ⑤ 福士大輔：神経芽腫の ploidy 異常の発生に 3 極分極が関与する可能性。第 9 回神経芽腫(基礎)研究会。2007.3. 東京。
- ⑥ 福士大輔、渡辺直樹、春田雅之、金子安比古：神経芽腫の ploidy 異常の発生に中心体異常は関与するのか？ 第 22 回日本小児がん学会。2006.11. 大阪。
- ⑦ 春田雅之、大平美紀、中川原章、金子安比古：マススクリーニングで発見された神経芽腫におけるアポトーシス関連遺伝子のメチル化異常。第 22 回日本小児がん学会。2006.11. 大阪。

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

○取得状況（計 件）

〔その他〕

ホームページ

[http://www.saitama-cc.jp/rinsyousyuyou\\_lab0/index.html](http://www.saitama-cc.jp/rinsyousyuyou_lab0/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 安比古 (KANEKO YASUHIKO)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・  
所長

研究者番号：50373387

### (2) 研究分担者

春田 雅之 (HARUTA MASAYUKI)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・  
研究員

研究者番号：80392190

笠井 文生 (KASAI FUMIO)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・  
研究員

研究者番号：60393055

福士 大輔 (FUKUSHI DAISUKE)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・  
研究員

研究者番号：90397159

### (3) 連携研究者