

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15208

研究課題名（和文）MYCN-PRC2を基軸にしたエピゲノム異常による神経芽腫発生機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of neuroblastoma development by MYCN-PRC2 mediated epigenomic aberrations

研究代表者

坪田 庄真（Tsubota, Shoma）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10801657

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：小児がんの1つである神経芽腫は、がん遺伝子として知られるMYCNにより引き起こされる。これまで研究代表者は、MYCNによる神経芽腫の発生に、EZH2と言うエピゲノム制御因子が重要であり、MYCNと結合すること、EZH2機能を阻害することで神経芽腫の増殖を抑えられることを報告した。本研究課題では、MYCNとEZH2が結合することが神経芽腫の発生に必須であるかどうかを検討したが、そもそもMYCNの一部がEZH2との結合に必要であるという既報を再現できず、研究期間内に目的の達成には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MYCNの過剰発現は神経芽腫を引き起こす原因の1つであるが、その構造的特性から特異的な阻害剤の開発は困難である。そのため、MYCNによるがん化の詳細な機構を解明することで、MYCNそのものではなくMYCNにより引き起こされる異常を標的とした治療薬の開発が可能となる。本研究はその基盤となるMYCNとEZH2の結合が、MYCNによる神経芽腫の発生に必須であるということを確認するものであり、これが達成されればこの結合阻害が新たな治療標的になりうる。

研究成果の概要（英文）：Neuroblastoma is a childhood cancer, and is caused by the well-known oncogene, MYCN. The applicant previously reported that EZH2, an epigenomic regulator, is important for MYCN-induced neuroblastoma development, that MYCN binds to EZH2, and that inhibition of EZH2 function can prevent neuroblastoma growth. In this study, we investigated whether the binding of MYCN to EZH2 is essential for the development of neuroblastoma. Unfortunately, we could not reproduce the previous report that a part of MYCN is required for the binding of EZH2 in the first place, so we did not achieve our goal within the study period.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：神経芽腫 MYCN PRC2 EZH2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人がんは、分化細胞や組織幹細胞に点変異や融合遺伝子などのゲノム異常が生じることで発生する(図1)。一方、神経芽腫を含む小児がんではゲノム異常が極端に少なく、その発生機構は謎が多い。神経芽腫は、発生箇所や時期を考慮すると、副腎髄質に存在するクロム親和性細胞と交感神経節を構成する交感神経細胞の前駆細胞に異常が起きることで発がんすると思われる。発生したがんでは点変異などの遺伝子変異の割合は低いが、染色体レベルでの増幅や欠失が多い¹。中でも、がん遺伝子 MYCN は約 30%の悪性神経芽腫で遺伝子増幅しており、その発現とがんの悪性度や患者の予後は強く相関する²。しかし、転写因子である N-Myc (MYCN のタンパク質名) に対する特異性の高い阻害剤の開発は難しく、N-Myc と合成致死を示す Aurora Kinase A や CDK4/6 などが分子標的治療の候補になっているが、未だ臨床試験中である³。一方で、MYCN や ALK、LIN28B などを導入した遺伝子改変マウスが神経芽腫を引き起こすことが報告されているが、神経芽腫の詳細な発生機構は未だよく理解されていない。

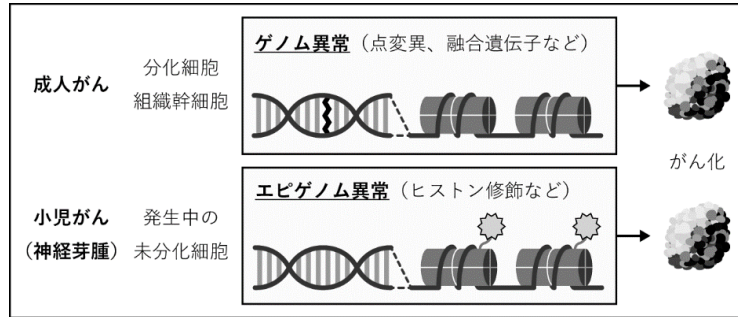


図1 エピゲノム異常が小児がん(神経芽腫)を引き起こす

体細胞点変異など説明可能なゲノム異常が見つからない神経芽腫が多いことから、正常発生における分化プログラムの異常(エピゲノム異常)が神経芽腫発生の引き金になっているのではないかと考えられる(図1)。本研究課題では、新たに確立した培養法を活用し、エピゲノム異常が神経芽腫を引き起こす際の詳細な機構を明らかにする。特に、MYCN とヒストン修飾分子群の Polycomb repressive complex 2 (PRC2)、またその責任分子である EZH2 との関わりを基軸として、神経芽腫発生機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

研究代表者は先行研究により、MYCN によるがん化の初期異常として、ゲノム異常ではなく転写状態の変化を見出した⁴。特に、MYCN ターゲット遺伝子の発現増加と、PRC2 ターゲット遺伝子の発現低下が顕著であり、N-Myc と EZH2 が物理的に結合すること、PRC2 の責任分子である EZH2 が神経芽腫の増殖に必須であることを報告した。これらの結果は、N-Myc による形質転換に EZH2 との結合が必要不可欠である可能性を示唆している。本研究課題では、N-Myc と EZH2 の結合様式を明らかにし、その結合が神経芽腫の発生や悪性化に必須であるかどうかを検証し、この複合体による神経芽腫発生の詳細な機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

PRC2 には様々なタンパク質や長鎖非翻訳 RNA などが結合し、その活性やゲノム上での局在が制御されているが、神経芽腫における PRC2 の役割とターゲット遺伝子の発現抑制機構はほとんど分かっていない。PRC2 の責任分子である EZH2 と N-Myc の結合は研究代表者の先行研究で報告した⁴。また、EZH2 が N-Myc のドメイン Myc box (MB) を介して結合するという報告がある⁵。この MYCN との結合を手がかりにして、神経芽腫への EZH2 (を含む PRC2) の寄与とその分子機構を明らかにするため、本研究課題では以下の3つの実験を計画した。

実験1 | MYCN と EZH2 の結合が MYCN による神経芽腫の発生に必須かどうか

神経芽腫は、副腎髄質のクロム親和性細胞や交感神経節細胞への分化能を有する前駆細胞(神経芽細胞)から生じる。この未分化な神経芽細胞の時期は EZH2 が高発現していることが分かっており¹、MYCN による神経芽腫発生には、この環境が必須であると考えられる。すなわち、時期と細胞特異的に実現する N-Myc と EZH2 の結合が、MYCN による形質転換に不可欠なイベントであるという作業仮説を検討する。具体的には、MYCN、EZH2 との結合領域を欠損した MYCN(

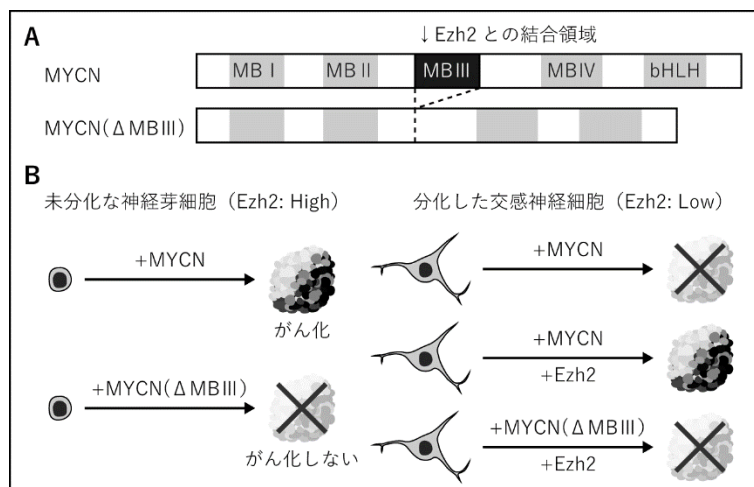


図2 作業仮説: MYCN と Ezh2 の結合が神経芽腫発生に必須

MB)、及び EZH2 を過剰発現させるレンチウイルスを準備する (図 2A)。EZH2 が高発現している未分化な神経芽細胞をマウスの胎仔期もしくは生後直後の交感神経節や副腎髄質から得る。また、EZH2 の発現が低下した分化細胞 (交感神経細胞や副腎髄質細胞) を生後 3-4 週齢マウスから得る。これら細胞を初代培養し、用意した 2 種類の MYCN と EZH2 を過剰発現させるレンチウイルスを感染させ、主に in vitro でのスフェア形成能や in vivo での皮下腫瘍形成能を指標として形質転換能の比較を行う (図 2B)。既に、未分化な神経芽細胞へ MYCN を過剰発現させると in vitro で形質転換することを確認している。出来たスフェアを対象に網羅的な遺伝子発現解析を行う。作業仮説として MYCN (MB) の導入ではがん化しないと予想しているが、仮にがん化した場合も、形成したスフェアや皮下腫瘍を対象に解析を行い、発生した神経芽腫の特徴を調べる。これら実験を通して、MYCN と EZH2 の結合が神経芽腫の発生に必須であると立証された場合、遺伝子改変マウスを作成し in vivo で検証していく。

実験 2 | MYCN と EZH2 の複合体によって発現制御される遺伝子群の網羅的な同定

先行研究で PRC2 ターゲット遺伝子の発現低下が発生初期の異常として顕著であることを報告したが¹、どのように PRC2 の制御状態が変化しているかはわかっていない。しかし、N-Myc と EZH2 が結合しているという事実は、転写因子である N-Myc が EZH2 を特定のゲノム領域へリクルートしている可能性を示唆している (図 3)。本実験では PRC2 の制御状態を明らかにするために、実験 1 で得た MYCN もしくは MYCN (MB) を過剰発現させたスフェアを材料として用意する。クロマチン免疫沈降シーケンスを行うことで、N-Myc と EZH2 のゲノム上の局在や EZH2 により触媒される抑制性のヒストン修飾マーク (H3K27me3) を解析し、神経芽腫における MYCN や PRC2 ターゲット遺伝子を網羅的に同定する。また、先行研究で参照した PRC2 ターゲットは ES 細胞における遺伝子群である。そのため、本実験により神経芽腫における真の PRC2 ターゲットを同定でき、正常発生におけるエピゲノム異常ががん化を引き起こす際の詳細な制御状態が明らかになる。

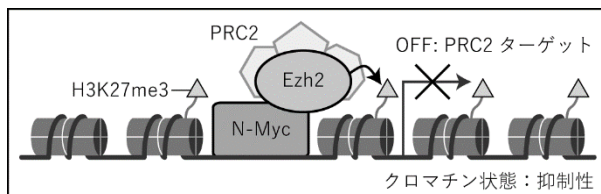


図 3 MYCN と Ezh2 結合による発現抑制の推定モデル

実験 1 で得た MYCN もしくは MYCN (MB) を過剰発現させたスフェアを材料として用意する。クロマチン免疫沈降シーケンスを行うことで、N-Myc と EZH2 のゲノム上の局在や EZH2 により触媒される抑制性のヒストン修飾マーク (H3K27me3) を解析し、神経芽腫における MYCN や PRC2 ターゲット遺伝子を網羅的に同定する。また、先行研究で参照した PRC2 ターゲットは ES 細胞における遺伝子群である。そのため、本実験により神経芽腫における真の PRC2 ターゲットを同定でき、正常発生におけるエピゲノム異常ががん化を引き起こす際の詳細な制御状態が明らかになる。

実験 3 | MYCN と EZH2 の複合体構造解析

上記 2 つの実験によって N-Myc と EZH2 の結合が神経芽腫の発生や悪性化に必須であることが明らかになれば、この複合体は治療標的の候補になると考えられる。本実験では、N-Myc と EZH2 のタンパク質を大腸菌もしくは in vitro 翻訳システムにより調整し、精製タンパク質を用いて複合体を形成させる。X 線結晶構造解析 (もしくはクライオ電子顕微鏡) を用いて、N-Myc と EZH2 の複合体の構造解析を行い、その結合様式を決定する。全長タンパク質での複合体調整が困難だった場合は、N-Myc 側の EZH2 結合ドメイン MB と、EZH2 側の N-Myc 結合ドメインのみをそれぞれ用意し、構造解析を行う。また EZH2 側の N-Myc 結合ドメインは分かっているため、先にこれを同定する。これらの成果は、N-Myc と EZH2 による神経芽腫発生の詳細な制御機構解明だけでなく、将来的には結合阻害を目的とした分子標的薬の開発に繋がる。

4. 研究成果

準備実験 | MYCN が MB を介して EZH2 と結合していることの確認

本研究は、先行研究で EZH2 が N-Myc の MB を介して結合するという報告⁵を前提条件としているが、実際 Corvetta らは、MYCN と EZH2 の細胞内における結合については結果が不十分であった。そこで、MB3 を欠損した MYCN を MYCN 非増幅型の神経芽腫細胞株 SH-SY5Y で発現させ、タンパク質同士の結合を確認する 2 つの手法、免疫沈降と近接ライゲーションアッセイを行った。その結果、

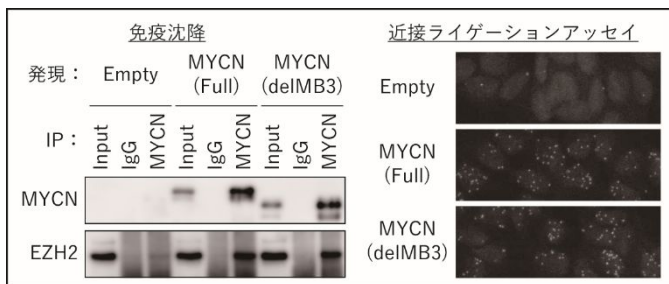


図 4 | MB3 欠損 MYCN (delMB3) は EZH2 と結合する

MB3 を欠損した MYCN も十分に EZH2 と結合するということが明らかになった (図 4)。この結果から、MYCN は MB3 以外のドメインで EZH2 と結合している可能性が示唆され、当初の計画を大幅に変更せざるを得ない状況になった。

実験 1 | MYCN と EZH2 の結合が MYCN による神経芽腫の発生に必須かどうか

上記の準備実験と並行して MYCN、EZH2 との結合領域を欠損した MYCN (MB) を過剰発現させるレンチウイルスを準備し、EZH2 が高発現している未分化な神経芽細胞を生後マウスの副腎から得た。この細胞を初代培養し、用意した 2 種類の MYCN を過剰発現させるレンチウイルスを感染させ、主に in vitro でのスフェア形成を指標として形質転換能の比較を行った。MYCN 及び MYCN (MB) のどちらも副腎由来細胞を形質転換、すなわち継代後も増殖す

るスフェアを形成させた(図5)。しかし、上記の準備実験により MYCN (delMB3)も EZH2 と結合することが確認されたので、本実験の結果は、MB3 ドメインは MYCN の形質転換能に関与していないという事実を明らかにするまでに留まった。

実験2 | MYCN と EZH2 の複合体によって発現制御される遺伝子群の網羅的な同定

MYCN と EZH2 の複合体によって発現制御される遺伝子群を網羅的に同定するために、EZH2 が発現し

ており MYCN と細胞内での結合を確認した神経芽腫細胞株 Kelly を用いてクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)を行った。実験条件の検討やシーケンスデータの取得に時間がかかり本研究期間内にデータ解析が完了しなかった。今後、公共データに蓄積されている MYCN や H3K27me3 を含むヒストン修飾の ChIP-seq データと発現データを併せて、MYCN と EZH2 が結合するゲノム領域を網羅的に同定し、その生物学的意義を明らかにする。

実験3 | MYCN と EZH2 の複合体構造解析

MYCN と EZH2 の複合体構造解析へ向け、幾つかの方法で各タンパク質を大腸菌及び in vitro 翻訳システムを用いて発現させたが、残念ながら全長タンパク質の発現効率が著しく低く、大腸菌では不溶性画分となった。現状タンパク質合成は難しいと判断した。今後、細胞内での結合実験により、まずは MYCN と EZH2 が結合するドメインをそれぞれ明らかにし、各ドメインを大腸菌や in vitro 翻訳システムで用意し、in vitro での結合を確認した後に構造解析を行いたい。

結論 | 本研究のきっかけは「MYCN の MB3 ドメインを介して EZH2 が結合している」という先行研究であったが、そもそも MB3 ドメインを介して結合していないということが明らかになった。すなわち、全体の研究計画を見直し、MYCN が EZH2 と結合するドメインを再度調査する必要性が生じた。残念ながら本研究期間内にその目的は達成されなかったため、今後の研究課題として引き続き続けていく。一方で、同時並行で進めていた MYCN と EZH2 の結合領域の同定についてはデータ取得までは終わったため、今後の解析により明らかになると思われる。構造解析についてはそもそもタンパク質の調整(MYCN と EZH2 の可溶性画分の取得)が困難であることが分かり、当初の予定通り遂行できなかった。

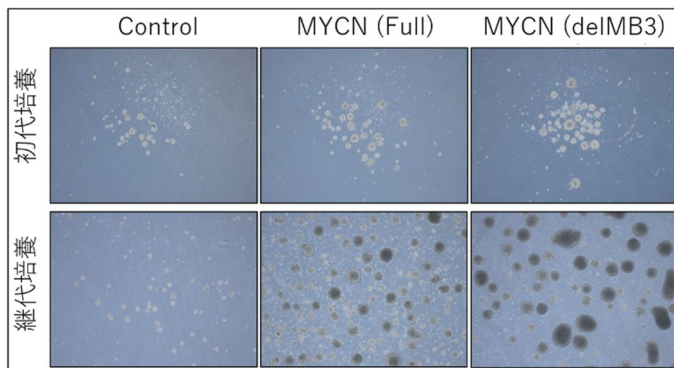


図5 | MYCN (delMB3)は副腎髄質細胞を形質転換する

引用文献

- (1) Pugh TJ, et al., Nat Genet. 2013.
- (2) Brodeur GM, et al., Science. 1984.
- (3) Cheung NK, et al., Nat Rev Cancer. 2013.
- (4) Tsubota S, et al., Cancer Res. 2017.
- (5) Corvetta D, et al., J Biol Chem. 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----