

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591272
 研究課題名 (和文) 小児腫瘍におけるエピゲノム変異：ポリコームによるクロマチン修飾のダイナミック解析
 研究課題名 (英文) Epigenetic modification in pediatric malignancies: Analysis of chromatin regulation by Polycomb proteins
 研究代表者
 上條 岳彦 (KAMIJO TAKEHIKO)
 千葉県がんセンター (研究所) 発がん制御 (生化学) 研究部・部長
 研究者番号：90262708

研究成果の概要：

これまでの研究によって、神経芽腫における MYCN の新規ターゲット検索を行った結果、遺伝子発現の抑制を介して発がん起序に深く関与するポリコーム複合体の構成分子 BMI1 を見出した。MYCN によって BMI1 の転写が調節され、In vivo における MYCN の BMI1 プロモーターへの結合を ChIP アッセイで検証した。BMI1 の発現は神経芽腫細胞の増殖を促進した。また神経芽腫細胞の分化誘導において BMI1 が分化を抑制していることが示された。さらに、BMI1 のノックダウン系および過剰発現系の実験を行った結果、神経芽腫細胞の増殖・分化に関する BMI1 の発現調節標的分子として、がん抑制遺伝子 p14ARF と p16INK4a 以外の重要な分子の存在が推定された。この BMI1 標的遺伝子のスクリーニングを BMI1 ノックダウン細胞での発現チップ解析にて行った結果、当研究所でこれまで神経芽腫で予後を左右する因子であり、がん抑制遺伝子であると報告していた分子が標的である可能性を見出した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

ポリコーム複合体の中で、Bmi1 は当初 B 細胞性腫瘍において c-Myc と協調的に発がんを促進する蛋白として同定され、その後 *Drosophila polycomb* と相同性があることが判明した蛋白である。B 細胞性腫瘍などの悪性腫瘍において高発現し、ARF/INK4a の転写を抑制する機能が判明しており、この機能によって c-Myc による ARF/p53 経路の活性化を抑制して発がんに寄与する。しかしながら、

Bmi1 KO で認められたフェノタイプの一部のみが ARF/p16INK4a KO とのダブル KO で改善されないことから、Bmi1 の制御している重要遺伝子群が他にも存在すると考えられている。この ARF/p16 非依存性の Bmi1 機能で最も注目されるのが、神経幹細胞の増殖細胞死制御である。Bmi1 KO では中枢神経系の形成異常が認められ、これはどのような経路を介するのかわかっていない。また、近年がんの増殖においてがん幹細胞の概念が注目され、

この同定とその形質の解析研究が盛んに行われている。神経芽腫においてもがん幹細胞の存在は推定されているが、がん幹細胞マーカーとして有効な分子は見い出されておらず、解析は進行していない。進行期神経芽腫の治療法として有効な手段が開発されていない現在、神経芽腫の増殖・悪性化機構、神経芽腫幹細胞における Bmi1 の役割の解析は重要な事項と考えられ、分子標的治療開発のターゲットとなり得ると推測される。このような現状の中で、多くの小児がんにおいてエピゲノム解析の重要性は近年高まりを見せている。特に ARF/p16INK4a はプロモーターDNA メチル化解析が多く腫瘍で行われており、発現とエピゲノム変異の相関、さらにエピゲノム変異(多くはDNA メチル化)と予後との相関が検討されている。しかしながら、ヒストン修飾の解析については未だ少なく、さらにヒストン修飾におけるポリコームの役割を小児固形腫瘍で解析した報告はこれまでにほとんどない。

2. 研究の目的

小児腫瘍特に神経芽腫の新たな治療法開発に向けて、神経芽腫における Bmi1 の転写制御機構を明らかにする。

またポリコーム複合体蛋白 Bmi1 のターゲット分子として、神経芽腫発がんに関するエピゲノミック変異を解析する系を確立する。

2-1. 神経芽腫においては MYCN の発がん、悪性化に関わる意義が非常に大きい。我々は Bmi1 プロモーターに MYCN 結合部位の候補を見出しており、この研究で Bmi1 の転写制御における MYCN の重要性を検討し、その機構を明らかにする。

2-2. ポリコーム遺伝子産物のなかでも発がん過程に深く関与することが知られている Bmi1 のターゲットの網羅的解析をゲノミック・エピゲノミック双方から実施する。神経芽腫腫瘍検体を用いて Bmi1 と ARF および p16INK4a の発現解析の相関を検討する。

2-3. Bmi1 の制御ターゲットは ARF/p16INK4a 以外にも存在することが予測されており、とくに神経発生に関与するターゲット遺伝子群を網羅的に解析し、これらの機能解析へ研究を進展させる。

3. 研究の方法

3-1. がん遺伝子 MYCN による Bmi1 の発現調節の解析

コンピューターによる *in silico* 解析によって、Bmi1 プロモーターに MYCN 結合部位の候補を検討する。

MYCN 増幅神経芽腫株では、Bmi1 の mRNA および蛋白質の発現解析を行う。

Bmi1 のプロモーター部分をゲノムから増幅し、このゲノムフラグメントにプロモーター

活性があるかをルシフェラーゼアッセイで確認する。

Bmi1 のプロモーターゲノムフラグメントの欠失変異体を作成し、プロモーター活性に重要な部分を同定する。

この Bmi1 のプロモーターゲノムフラグメントには MYCN 結合配列があるので、ChIP アッセイによって MYCN の直接結合を確認する。

3-2. Bmi1 強制発現系における神経芽腫エピゲノム変化の影響の解析と Bmi1 knockdown 系による神経芽腫エピゲノム変化の解析

近年ポリコームは Molecular Lock として注目されているが、成体細胞においてその Molecular Lock がどのような状況で変化するかは詳細に解析されていない。特にポリコームはがん細胞での変化が発がんに関連していることを示すデータが集積しつつあるが、神経芽腫における報告は乏しく、その役割の詳細は明らかでない。

神経芽腫細胞のうち Bmi1 発現が比較的低値である SH-SY5Y と Tet21/N (MYCN 誘導株) にて Bmi1 が神経芽腫細胞の増殖を促進できることを前年度に見出した。この2種類の細胞系で増殖への影響をコロニーアッセイ、軟寒天培養、WST アッセイを行い、データを取得する。

Bmi1 のノックダウンをレンチウイルスを用いた shRNA 系で神経芽腫細胞にて行い、増殖に対する影響を検討する。コロニーアッセイ、軟寒天培養、WST アッセイを行う。強制発現系と相反する結果となることが推測される。さらに細胞死に対する影響を Doxorubicin, VP-16, Cis-platinam 投与時の subG0/G1 分画の FACScan 解析で調べる。Bmi1 knockdown 後に ARF/INK4 部位に対するポリコーム結合を Real-time genome ChIP 法で検討し、特に p16INK4a のプロモーター部分へのヒストン修飾の変化と p16INK4a 発現の相関を検討する。

4. 研究成果

(結果)

4-1. コンピューターによる *in silico* 解析によって、Bmi1 プロモーターに MYCN 結合部位の候補を検索した。エクソン1の5'末端を+1とすると、-181に CACGTG 配列を見出した。

4-2. 神経芽腫細胞株10種を解析し、MYCN 蛋白質質量が豊富な株では Bmi1 mRNA 量、Bmi1 蛋白質量が増加していることを見出した。また、神経芽腫腫瘍検体では免疫染色法によって、MYCN 増幅検体で Bmi1 の核内発現が増加していることを見出した。

4-3. 推定 Bmi1 プロモーター部位を-1069まで PCR にてクローニングし、PGL4 ベクタ

ーにクローニングしてルシフェラーゼアッセイを行った。-181E-box (MYCN 結合 CACGTG 配列) を含む 88 塩基対がコントロールに比較して 20 倍以上の活性を示していた。この 88 塩基対の E-box に点変異を導入すると活性は 1/10 以下に低下することから、Bmi1 転写活性化における MYCN の重要性が明らかになった。またこの E-box の近傍に E2F 結合部位があるが、これを前述の 88 塩基対に付加しても、活性は 1.3 倍ほど上昇したのみであったので、E2F 結合に比して MYCN 結合が重要な意義を持っていることが示された。

4-4. Bmi1 プロモーター E-box に対する MYCN の結合をクロマチン免疫沈降法で行った。MYCN 増幅神経芽腫株では MYCN-single 株と比較して Fold enrichment で 3 倍以上の濃縮が認められた。また、MYCN 誘導 Tet21/N 株では MYCN 誘導時に結合の増加が認められた。以上から、細胞内での Bmi1 プロモーター E-box に対する MYCN の結合が確認された。

4-5. Bmi1 による神経芽腫細胞の増殖促進 Bmi1 による神経芽腫細胞の増殖への影響を検討するために、レンチウイルスで Bmi1 を過剰発現させた。複数の株で Bmi1 による増殖促進、コロニー形成能の促進が認められた。これは Bmi1 ノックダウンで細胞増殖が抑制されることから証明された。

4-6. Bmi1 による神経芽腫細胞の分化抑制 神経芽腫細胞を TPA, RA など分化誘導すると、神経突起延長、分化マーカー蛋白の転写増加と共に、Bmi1 が蛋白質レベルで減少した。逆に Bmi1 をノックダウンすると神経突起の延長と共に分化マーカー蛋白 (Gap43, NF68) の増加が認められた。

4-7. 神経芽腫細胞における Bmi1 新規ターゲット遺伝子の検索

Bmi1 過剰発現系およびノックダウン系実験から既知の p14ARF および p16INK4a 以外の重要なターゲットが存在することが推測された。そこで Bmi1 ノックダウン神経芽腫細胞を用いて Bmi1 抑制で転写が増加する遺伝子群を当研究所で中川原らが開発した発現 chip を用いてスクリーニングした。その結果、神経芽腫において予後を作用する重要ながん抑制遺伝子 (NBXXXX1, NBXXXX2) が Bmi1 によって発現抑制を受ける遺伝子の No. 1 と No. 2 にランクされることが明らかになった。Semi-quantitative RT-PCR で Bmi1 による NBXXXX1, NBXXXX2 の転写抑制は検証され、これらの遺伝子のプロモーターへの Bmi1 の結合は ChIP アッセイで示された。

(考察)

高等哺乳動物におけるポリコームの機能解析は遺伝子改変マウスの作成によって従来検討されてきた。その結果、ポリコーム欠損

(Bmi1, MEL18, Rae28 KO) マウスでは造血幹細胞、神経幹細胞、小脳前駆細胞などの機能低下が報告され、ポリコームの幹細胞性の維持における重要な役割が示唆されてきた。ポリコーム、特に Bmi1 は腫瘍におけるその機能的役割が、p14ARF/p16INK4a という重要ながん抑制遺伝子群の制御によって注目され、実際のヒト腫瘍でも骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、悪性リンパ腫、大腸がん、髄芽腫、乳がん、非小細胞性肺がんなどで Bmi1 は高発現することが知られており、発がん過程におけるその重要度は高いと考えられてきた。

今回の我々の報告では、小児固形腫瘍の重要な腫瘍である神経芽腫において、がん遺伝子産物 MYCN が Bmi1 のプロモーターに結合してその転写を更新させることを初めて明らかにし、Bmi1 が神経芽腫細胞の増殖に促進的な作用を持ち、さらに細胞分化を抑制して幹細胞性の維持に関与していることを見出した。この分化の抑制は神経突起の伸展、および分化マーカー (GAP43, NF68 など) の指標で示された。この神経芽腫における Bmi1 の作用機序を明らかにするために、我々は当研究所で中川原らが開発した発現 chip を用いてスクリーニングした結果、神経芽腫において予後を作用する重要ながん抑制遺伝子 (NBXXXX1, NBXXXX2) が Bmi1 によって発現抑制を受けることが明らかになった。これらの遺伝子のプロモーターへの Bmi1 の結合は ChIP アッセイで示された。

これらの結果はこれまでに他に報告は無く、神経芽腫におけるポリコームの機能を体系的に解析して明らかにし、がん抑制遺伝子群の転写抑制に新治験をもたらした報告である。 今後は ChIP on chip 実験によって神経芽腫細胞で Bmi1 がプロモーターに結合する遺伝子群の検索を網羅的に行い、Bmi1 ノックダウン細胞での発現チップ解析の結果とあわせて検討して、神経芽腫における Bmi1 のターゲットをさらに明らかにしていきたい。

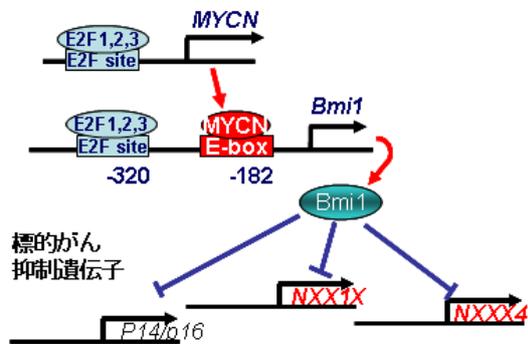


図. 神経芽腫における MYCN/Bmi1 経路はがん抑制遺伝子群の転写を抑制する

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)

〔雑誌論文〕(計15件、2007-2009年)

1. Takada Y, Isono K, Shinga J, Turner JM, Kitamura H, Ohara O, Watanabe G, Singh PB, Kamijo T, Jenuwein T, Burgoyne PS, Koseki H.

Mammalian Polycomb Scmh1 mediates exclusion of Polycomb complexes from the XY body in the pachytene spermatocytes. *Development*. 2007 Feb;134(3):579-90.

2. Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A.

Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line.

Biochem Biophys Res Commun. 2007 Mar 23;354(4):892-8.

3. Nakazawa Y, Saito S, Hasegawa Y, Yanagisawa R, Sakashita K, Kamijo T, Miyazaki T, Sato S, Ikeda H, Ikebuchi K, Koike K.

A possible role for the production of multiple HLA antibodies in fatal platelet transfusion refractoriness after peripheral blood progenitor cell transplantation from the mother in a patient with relapsed leukemia.

Transfusion. 2007 Feb;47(2):326-34.

4. Takahashi M, Ozaki T, Takahashi A, Miyauchi M, Ono S, Takada N, Koda T, Todo S, Kamijo T, Nakagawara A.

DFF45/ICAD restores cisplatin-induced nuclear fragmentation but not DNA cleavage in DFF45-deficient neuroblastoma cells.

Oncogene. 2007 Aug 16;26(38):5669-73.

5. Miki J, Fujimura Y, Koseki H, Kamijo T. Polycomb complexes regulate cellular senescence by repression of ARF in coordination with E2F3

Genes To Cells. 2007 Dec;12(12):1371-82.

6. Kurata K, Yanagisawa R, Ohira M, Kitagawa M, Nakagawara A, Kamijo T.

Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells.

Oncogene. 2008 Jan 31;27(6):741-54.

7. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kamijo T, Nakagawara A, Kizaki H.

Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress.

J Biol Chem. 2008, Feb 15;283(7):3979-87.

8. Koida N, Ozaki T, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Ando K, Okoshi R, Kamijo T, Omura K, Nakagawara A.

Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation.

J Biol Chem. 2008 Mar 28;283(13):8555-63.

Epub 2008 Jan 3.

9. Wang H, Ozaki T, Shamim Hossain M, Nakamura Y, Kamijo T, Xue X, Nakagawara A.

A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53.

Biochem Biophys Res Commun. 2008 Jun 13;370(4):594-8.

10. Hossain MS, Ozaki T, Wang H, Nakagawa A, Takenobu H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A.

N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma.

Oncogene. 2008 Oct 16;27(46):6075-82.

Epub 2008 Jun 30.

11. Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A.

Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation.

Int J Cancer. 2008 Nov 1;123(9):2087-94.

12. Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Tanaka M, Shikama N, Kamijo T, Shiohara M, Koike K.

Low toxicity of a conditioning with 8-Gy total body irradiation, fludarabine and cyclophosphamide as preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric hematological malignancies.

Pediatr Transplant. 2008 Dec 16. [Epub ahead of print]

13. Abe M, Kamijo T, Matsuzawa S, Miki J, Nakazawa Y, Sakashita K, Okabe T, Honda T, Mitsuyama J, and Koike K

High incidence of meropenem resistance among alpha-hemolytic streptococci in children with cancer

Pediatr Int. 2009 Feb;51(1):103-6.

14. 神経芽細胞腫の予後因子解析の手法と意義

上條岳彦

日本小児科学会雑誌 2008 年 112 巻 12 月号 1761-1768

15. 肺がんの癌幹細胞

木村昌樹, 上條岳彦

Surgery Frontier 16(1): 52-59, 2009

[学会発表] (計 33 件/2008 年)

① MYCN regulates Bmi1-related cell proliferation and differentiation in neuroblastoma cells MYCN は Bmi1 を介して細胞増殖と分化を制御する

Ochiai H, Takenobu H, Nakamura Y, Koseki H, Nakagawara A, Kamijo T

Div. Biochemistry and Molecular Carcinogenesis

第 67 回日本癌学会総会、2008 年

② 神経芽腫増殖・分化における幹細胞性制御因子 Bmi1 の役割

落合秀匡、竹信尚典、山口陽子、古関明彦、中川原章、河野陽一、上條岳彦

第 24 回日本小児がん学会、2008 年

③ MYCN regulates stemness-related genes in neuroblastoma. Takehiko Kamijo, MD, PhD

Chiba Cancer Center Research Institute
Div. of Biochem. & Mol. Carcinogenesis

Advances of Neuroblastoma Research 2008, Makuhari, Chiba, Japan, 2008

[図書] (計 1 件)

1. Encyclopedia of Cancer. 2nd edition, Editor: Manfred Schwab, "INK4a", Springer, Germany.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

特記なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上條岳彦 (KAMIJO TAKEHIKO)

千葉県がんセンター (研究所)

発がん研究グループ・部長

研究者番号: 90262708

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中川原章 (NAKAGAWARA AKIRA)

千葉県がんセンター・センター長

研究者番号: 50117181