

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08283

研究課題名(和文) 神経芽腫創薬開発を目指したAZ2によるMYCNのユビキチン非依存的分解機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of ubiquitin-independent MYCN degradation mechanism mediated by AZ2 in neuroblastoma tumors

研究代表者

村井 法之(MURAI, NORIYUKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60300927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫は希少がんではあるが、患者の6割程度は転移となり、5年生存率は40%と予後の悪い疾患である。神経芽腫では予後不良因子としてがん原遺伝子産物MYCNが知られている。

本研究において申請者は、アンチザイム2(AZ2)タンパク質が介するMYCNの新規分解経路を見だし、その詳細を解析しAZ2が発現しないと細胞レベルでは、MYCN増加に伴って増殖が亢進し、マウス個体では腫瘍形成が増大することを見出した。さらに遺伝子発現解析および代謝解析によってAZ2の発現がMYCNを分解とがん細胞増殖抑制に関連していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンチザイム2(AZ2)タンパク質が、神経芽腫の最も強力なリスクファクターであるがん原遺伝子産物MYCNをユビキチン非依存的に分解促進する新規経路を発見しその詳細について解析した。神経芽腫の細胞のAZ2発現を抑えると(ノックダウン)、MYCNが増加し細胞増殖が亢進すること、AZ2をノックダウンしたがん細胞をマウスに移植すると、ノックダウンされていない細胞に比べて明らかに腫瘍形成が増大したことから、AZ2がMYCNを分解促進することによってがん細胞の増殖を抑制できる可能性を見いだした。このことを利用して、神経芽腫においてMYCNをターゲットとした新規分子標的薬開発への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although neuroblastoma is a rare cancer, about 60% of patients become metastases and the 5-year survival rate is 40%, which is a disease with a poor prognosis. In neuroblastoma, the protooncogene product MYCN is known as a poor prognosis factor. In this study, we found a novel pathway of MYCN degradation mediated by the antizyme 2 (AZ2) protein. We performed knockdown of AZ2 in neuroblastoma cell lines using siRNA and revealed that knockdown of AZ2 causes stabilization of MYCN and increased cell proliferation. In addition, transplantation of AZ2 knockdown cells into mice caused increased tumorigenesis. Furthermore, gene expression analysis and metabolic analysis using AZ2 knockdown cells revealed that the expression of AZ2 suppresses MYCN level, and resulted in decrease of the expression of MYCN target genes, which cause the suppression of cancer cell growth.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：神経芽腫 MYCN アンチザイム ユビキチン非依存的分解 プロテアソーム がん細胞増殖抑制

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、小児固形がんの中で脳腫瘍に次いで多いがんである(150人/年)。希少がんではあるが、患者の6割程度は遠隔転移となり、再発なしの5年生存率は40%と予後の悪い疾患である。神経芽腫の予後を左右する最も強力なリスクファクターとしてがん原遺伝子産物 MYCN が知られていた。MYCN 遺伝子が高発現するハイリスクタイプの神経芽腫の治療では、多剤併用療法が行われているが、副作用も強く効果がない場合も多かった。したがって副作用の少ない新規分子標的薬の開発が待たれていた。研究代表者は、細胞内ポリアミン濃度調節タンパク質アンチザイムの機能研究から、そのファミリーであるアンチザイム2 (AZ2) が、がん原遺伝子産物 c-Myc をユビキチン非依存的に分解促進する新規経路を発見していた。さらに c-Myc のファミリーである MYCN も AZ2 によって同様に分解促進されるというプレリミナリーなデータを得ていた。国外の臨床研究においては、「AZ2 の mRNA レベルが高いほど神経芽腫患者の予後が良い」という結果が報告されており、神経芽腫における AZ2 と MYCN の関連に注目し、AZ2 による MYCN のユビキチン非依存的分解促進機構とがん細胞の増殖抑制について研究を進めていた。

2. 研究の目的

研究代表者が見出した AZ2 を介した MYCN のユビキチン非依存的分解機構を生化学的、構造学的に解析し、神経芽腫における MYCN をターゲットとした新規分子標的薬の開発へつなげることが本研究の目的である。具体的目的は、以下に記す。

- (1) AZ2 を介する MYCN の分解促進の意義を生化学的・分子生物学的に明らかにする。
- (2) AZ2-MYCN 分解系が腫瘍増殖に与える影響を動物・培養細胞の実験から明らかにする。
- (3) AZ2-MYCN 複合体の立体構造解析を行い、結合部位の詳細と AZ2 による MYCN の分解促進の詳細を構造的に明らかにする。
- (4) (1)~(3)の成果を元に、MYCN を特異的に分解促進し神経芽腫の増殖を抑制する低分子ペプチドや化合物を開発し、ハイリスクタイプの神経芽腫に効果のある創薬へ展開する。

3. 研究の方法

生化学・分子生物学的解析(動物実験含む)

- (1) MYCN と AZ2 の相互作用に必要な両分子の結合領域の決定
AZ2 および MYCN の部分領域の発現系の構築。
HA や FLAG などのタグを付加した AZ2 と MYCN 各々の部分領域の発現系を構築する。
結合部位の決定
の発現系を浮遊細胞(293-F)に導入し、タグ抗体による免疫沈降解析を行い両分子の結合部位の決定。
- (2) MYCN の分解に必要な AZ2 領域の決定
(1) で構築した AZ2 の部分領域の発現系を用い、神経芽腫細胞株に MYCN と共発現させ、MYCN の分解を解析しに必要な AZ2 の最小領域を決定する。内在性 MYCN の分解も解析する。
- (3) AZ2 ノックダウン神経芽腫細胞株の遺伝子発現解析
AZ2 をノックダウンした細胞株の遺伝子発現変化を、RNA ディープシーケンスを行い詳細に解析し、関連遺伝子を明らかにする(RNA 精製後外部委託)。
- (4) AZ2 ノックダウンおよび過剰発現による細胞増殖の解析
AZ2 過剰発現やノックダウンされている神経芽腫細胞株を、レンチウイルスまたは siRNA を用いて作製し、細胞増殖能を軟寒天培地によるコロニーアッセイにより解析する。

- (5) ゼノグラフトマウスモデル解析による AZ2 ノックダウンによる腫瘍形成能
AZ2 のノックダウンが神経芽腫の悪性を高めるかどうか、AZ2 の shRNA をレンチウイルスベクターを用いて神経芽腫細胞株に導入し AZ2 ノックダウン細胞を作製する。これを免疫不全マウスに移植し腫瘍形成能を個体で明らかにする。
*レンチウイルスを使用した場合、細胞株のゲノムのどこに、何コピー導入されるか予測できないので、siRNA 処理とは異なった細胞の性質が現れた場合、siRNA でノックダウンした細胞を使用し、マウスに移植した細胞に直接、週に一度 siRNA を接種する方法を行う。

構造学的解析

- (6) MYCN と AZ2 タンパク質の発現系の構築と精製
大腸菌または動物細胞により His, FLAG, HA などのタグを付加した発現系の構築し精製する。タグと目的タンパク質の間にプロテアーゼ認識配列を導入し、最終的にタグ無しのタンパク質を精製する。
- (7) タンパク質の結晶化
(6)より精製した AZ2 および MYCN タンパク質の単独および複合体の結晶化を試みる。結晶化の条件検討はキットを用いて行う。
*タンパク質全体の結晶化が困難な場合
MYCN あるいは AZ2 の全アミノ酸の含んだ結晶化が困難な場合は、生化学的解析の 2 から明らかになる相互作用の部分領域を用いて結晶化を試みる。MYCN はすでに結晶構造が解析されているのでその条件を参考にする。

4. 研究成果

生化学・分子生物学的解析(動物実験含む)

- (1) MYCN と AZ2 の相互作用に必要な両分子の結合領域の決定
HA や FLAG タグを付加した MYCN 部分領域および AZ2 の発現系を構築し浮遊細胞に共発現させタグ抗体を用いたプルダウンアッセイ（免疫沈降を用いた解析）により MYCN の AZ2 結合領域をおおよそ特定した。この領域は、ユビキチンリガーゼである Fbxw7 が結合するドメインとは異なる領域に位置していた。現在詳細な解析を進行中である。
- (2) AZ2 ノックダウン神経芽腫細胞株の遺伝子発現解析
神経芽腫細胞株 BE(2)-C の AZ2 を siRNA によりノックダウンすると MYCN が安定化されること見だしていたので、AZ2 ノックダウンによる遺伝子発現の変化を RNAseq (RNA シーケンス) により網羅的に解析した。
AZ2 ノックダウンした細胞株は、神経芽腫のがん遺伝子と考えられている ID ファミリー (ID1-ID4) の mRNA の発現は、全て 5 倍以上上昇していた。ID2 および ID3 は、タンパク質レベルにおいても 2 倍以上上昇していた。また ID ファミリーの下流で、血管新生に重要な因子である EGR1 は 2 倍以上に、細胞増殖に重要な c-Fos は 3 倍に各々上昇していた。神経芽腫細胞株において、AZ2 をノックダウンすると MYCN がタンパク質レベルで 2 倍以上に上昇することから、神経芽腫における AZ2 の発現低下は、MYCN のターゲット遺伝子の発現を上昇させ、腫瘍細胞の増殖を促進させると考えられる。
- (3) AZ2 ノックダウンおよび過剰発現による細胞増殖の解析
国外の研究から AZ2 の mRNA の発現が低いと神経芽腫の予後不良となることが報告されていたので、AZ2 ノックダウンによって神経芽腫細胞株の増殖にどのように影響を与えるか、軟寒天コロニーアッセイにより足場非依存性の増殖能を定量的に評価した。コントロールの細胞株に対し AZ2 をノックダウンした細胞ではコロニー形成

が2倍に増加しコロニーサイズも明らかに大きくなった。このことはAZ2の発現が抑えられると神経芽腫のがん細胞の増殖が亢進すると考えられる。

(4) ゼノグラフトマウスモデル解析

当初神経芽腫細胞株のAZ2をノックダウンさせるレンチウイルスの系を構築したが、コントロールのshRNAによってもMYCNの発現増加が見られるクローンが確認されたため、レンチウイルスの系ではなくsiRNAにより細胞株をノックダウンする方法を用いた。この場合、コントロールsiRNAとAZ2のsiRNA (siAZ2) おいて常にsiAZ2でMYCNの安定化が確認されコントロールではそれが起こらないことが確認された。これらの細胞をヌードマウスに移植し3週間経時的に腫瘍形成(サイズ)および体重を観察すると、AZ2をノックダウンした細胞は、体重増加率はコントロールに比べ変化しないが、明らかに腫瘍サイズが増大し、3週間の時点でサイズは4倍に達し、摘出した腫瘍重量も明らかに増加していた。このことはAZ2の発現が抑えられた神経芽腫のがん細胞は、個体レベルにおいても腫瘍形成能を亢進させると考えられる。

構造学的解析

(5) MYCN と AZ2 タンパク質の発現系の構築と精製

MYCN と AZ2 タンパク質結晶化のためのタンパク質精製を行うにあたり、大腸菌や培養細胞への発現系のコンストラクトを作製した。His や HA および Strep-tacti タグと目的タンパク質の間にプロテアーゼ認識部位を挿入し精製過程でタグを除くことができるように設計した。また IPTG で発現を誘導可能なように設計した。これらを実験系に発現させ、目的タンパク質の発現の程度を SDS-PAGE で確認した。しかしどちらのタンパク質もインクルージョンボディ (不溶性の凝集塊) となり可溶性画分に発現してこなかった。可溶性に移行するように大腸菌の株をいくつか健闘したが結果は変わらなかった。また、タグをチオレドキシニンなどの可溶性を期待できるものに置換し試みたが同様に不溶性のままであった。現在培養細胞の系での発現と精製を検討している。

(6) タンパク質の結晶化

上記(5)に述べたように、目的タンパク質は、発現はするが可溶性画分に移行しないことから、結晶化まで至らなかった。

上述の様に生化学・分子生物学的解析 (動物実験含む) では解析が進み、神経芽腫の培養細胞株や個体を用いたゼノグラフトマウスモデル解析において、AZ2の発現が抑えられるとAZ2によるMYCNの分解が抑えられることによりMYCNが安定化し、増殖に関するMYCNのターゲット遺伝子の発現が上昇することによってがん細胞の増殖が亢進する可能性が高い。これらの結果は、神経芽腫患者におけるAZ2のmRNA発現と予後との相関を部分的に説明しており、創薬に繋げるための重要成果である。一方構造解析の方は、試行錯誤はしたが目的タンパク質は、発現はするが可溶性に移行しなかった。今後は培養細胞の系に移行するなど解決していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村井法之
2. 発表標題 神経芽細胞腫の腫瘍増殖におけるアンチサイム2の役割
3. 学会等名 日本ポリアミン学会 第11回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Murai N.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 IntechOpen.	5. 総ページ数 111
3. 書名 Ubiquitin-independent proteasomal degradation mediated by antizyme. In: Xianquan Zhan. Ubiquitin-proteasome pathway.	

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------