

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17361

研究課題名(和文) 神経芽腫のがん微小環境制御におけるEvi5の役割に関する研究

研究課題名(英文) Role of EVI5 in the regulation of tumor microenvironment in neuroblastoma

研究代表者

高藤 哲 (TAKAFUJI, SATORU)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70816800

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、その臨床的多様性によって特徴付けられ、特にStage4患者の50%以上が再発する一方で、Stage4S患者では転移があっても自然消滅し得ることが知られている。本研究では、Stage4S患者の染色体転座部位から単離されたEvi5遺伝子をプローブとして、神経芽腫細胞とそれらを取り巻くがん微小環境との相互作用に注目した。Evi5をノックダウンおよび過剰発現した神経芽腫細胞を用いて、Evi5に制御される神経芽腫細胞からの分泌因子の候補分子群を同定し、それらが神経芽腫細胞およびがん微小環境の主要な構成成分である間葉系幹細胞(MSC)におよぼす影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫患者の予後改善には、50%以上が再発するStage4患者と自然消滅し得るStage4S患者の違いを明らかにすることが重要だと考えられる。本研究では、Stage4S患者の染色体転座部位から単離されたEvi5遺伝子に注目して、Evi5に制御される神経芽腫細胞からの分泌因子の候補分子群を同定した。これらの分子群に関する知見は、神経芽腫の新たな診断・治療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Neuroblastoma (NB) is characterized by its clinical heterogeneity, especially in Stage 4 and 4S NB patients. Although more than 50% of Stage 4 NB patients have recurrent disease, spontaneous regression is possible in Stage 4S NB patients. In this study, we focused on the interaction between NB cells and their cancer microenvironment using the Evi5 gene isolated from chromosomal translocation sites of Stage 4S NB patients as a probe. By using Evi5 knockdown and overexpressed NB cells, we tried to identify candidate molecules of Evi5-regulated secreted factors from NB cells. We then examined their effects on NB cells and mesenchymal stem cells (MSCs), a major component of the cancer microenvironment in NB patients.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：神経芽腫 Evi5

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、小児がん死亡の約 15%を占める代表的な小児難治性固形がんであり、長期生存率が 40%に満たない Stage4 患者の予後改善は、現在の小児がん診療における緊急の課題である。転移を有し、高リスクに分類される Stage4 患者の 50%以上が再発する一方で、骨髄、皮膚、肝に限局した転移を有する Stage4S 患者は自然消滅し得ることが知られている。Stage4 患者と Stage4S 患者の転帰の違いをもたらす分子機構は未だ不明であった。

腫瘍の発症・進展には腫瘍細胞とそれらを取り巻くがん微小環境が重要な役割を果たすことが明らかになってきており、特にその主要な構成細胞であるマクロファージおよび間葉系幹細胞(MSC)の作用が注目されている。そこで申請者らは、神経芽腫 Stage4S 患者の非腫瘍細胞における染色体転座部位 t(1;10)(p22;q21)から単離された遺伝子 Evi5 に注目した。Evi5 は、最初に AKXD マウスの T 細胞性リンパ腫におけるレトロウイルス挿入部部位から同定された遺伝子で、その後 Runx1 関連白血病の発症に関与することや、ショウジョウバエの細胞運動を制御することが報告された。Evi5 は、Tre2-Bub2-Cdc16 に保存された~300 アミノ酸からなる TBC ドメインを有する TBC ドメイン Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 GTPase 活性化蛋白質(TBC/Rab GAPs)のメンバーでもある。44 のメンバーから成る TBC/Rab GAPs は、60 以上のメンバーから成る Rab の特定のメンバーを、その活性型である GTP 結合型から不活性型である GDP 結合型へ不活化することによって、細胞内小胞輸送の特異性・選択性を制御する。TBC/Rab GAPs のメンバーである Evi5 は、エンドソームに局在する Rab のメンバーである Rab11 を不活化することが報告されており、細胞膜とエンドソーム間のリサイクリングを制御すると予想されていた。

これまでに申請者らは、神経芽腫の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間葉系幹細胞(MSC)の役割を示してきた。そこで本研究では、Stage4 患者と Stage4S 患者における分子病態の違いの理解を目指して、Evi5 に制御される神経芽腫細胞からの分泌因子群を同定し、それらが神経芽腫のがん微小環境におよぼす影響を検討した。

2. 研究の目的

神経芽腫 Stage4S 患者の非腫瘍細胞における染色体転座部位 t(1;10)(p22;q21)から単離された遺伝子 Evi5 に制御される神経芽腫細胞からの分泌因子を同定し、それらが神経芽腫のがん微小環境におよぼす影響を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) Evi5 によって制御される神経芽腫細胞の分泌分子の同定

これまでに申請者らは、MSC の培養上清から、SDS-PAGE 上細胞老化した MSC からの分泌が亢進する分子群を質量分析(Mass Spectrometry)で同定している。同様に、Evi5 をノックダウンした神経芽腫細胞と過剰発現した神経芽腫細胞の培養上清に対して質量分析を行うことにより、各細胞間で分泌量の異なる分子群を同定した。

(2) 同定した分子の神経芽腫細胞における発現および機能解析

培養した神経芽腫細胞を用いて、Real-time PCR、ウェスタンブロットによる発現解析を行なった。さらに、同定した分子をノックダウンした神経芽腫細胞株を作成し、細胞増殖速度、スフェア形成能、コロニー形成能、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能の観点から同定した分子の機能解析を行なった。

(3) 同定した分子の MSC における発現および機能解析

上記(2)と同様に、MSC を用いて発現解析を行なった。

(4) 同定した分子の神経芽腫患者検体における発現解析

これまでに申請者らは、神戸大学小児科関連病院から神経芽腫症例を集めて、患者・家族の同意を得た末梢血、骨髄穿刺液、生検腫瘍組織を系統的に保存し、それらの検体から神経芽腫細胞を樹立している。これらの検体を用いて、同定した候補分子群の mRNA および蛋白質発現解析を real-time RT-PCR および同定した分子に対する特異抗体抗を用いて行なった。さらに、診断時の生検標本および外科手術時の切除標本を用いた病理学的な検討を行った。特に、MSC から誘導される腫瘍随伴繊維芽細胞(CAF)や活性化マクロファージ(TAM; tumor associated macrophage)に注目して、がん微小環境の評価を行った。

4. 研究成果

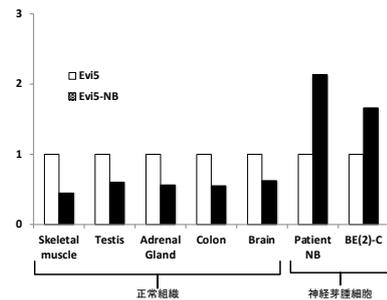
本研究は神経芽腫の分化・増殖において Evi5 が与える分子学的な影響を解析することを

目的として行った。

(1) 神経芽腫細胞における新規 Evi5 アイソフォーム (Evi5-NB)



Evi5/Evi5-NBの発現

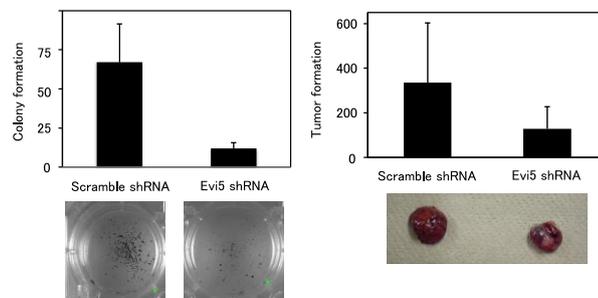


神経芽腫 BE(2)-C 細胞から Evi5 cDNA をクローニングする過程で、新規アイソフォーム Evi5-NB を単離した。アイソフォーム特異的なプライマーを用いた RT-PCR で発現解析を行うと、Evi5-NB は Canonical Evi5 に比して、正常組織での発現が少なく、神経芽腫細胞で高発現を認めた。

(2) 神経芽腫細胞における Evi5 の機能

胞を用いて、神経芽腫細胞における Evi5 の機能解析を行うと、Evi5 ノックダウン細胞ではコロニー形成能、ヌードマウスへの腫瘍形成能の減少が認められ、神経芽腫の発症・進展に関わっていることが示された。

神経芽腫細胞のコロニー・腫瘍形成におけるEvi5の役割



(3) Evi5 によって制御される神経芽腫細胞の分泌分子の同定と機能解析

Evi5 をノックダウンおよび過剰発現した神経芽腫 BE(2)-C 細胞の培養上清において、両者の間で発現量 (分泌量) が著しく異なる分子群を探索した。それぞれの培養上清を SDS-PAGE 後、銀染色して著しく濃さの異なるバンドを質量分析で同定した。同定した候補分子群の神経芽腫 BE(2)-C 細胞および骨髄由来 MSC における発現を real-time PCR、ウェスタンブロットで確認した。

次に、Evi5 に制御される分泌因子の候補分子群が、神経芽腫 BE(2)-C 細胞および骨髄由来 MSC の細胞増殖におよぼす効果を MTS アッセイ、細胞数カウントで検討を行った。同時に、これまでに神戸大学小児科関連病院から神経芽腫症例を集めて、患者・家族の同意を得て系統的に保存してきた末梢血、骨髄穿刺液、生検腫瘍組織を用いて、Evi5 に制御される分泌因子の候補分子群の発現を real-time PCR で解析した。

今後は、同定した候補分子群をノックダウンおよび過剰発現した神経芽腫 BE(2)-C 細胞および骨髄由来 MSC を用いて、Evi5 による神経芽腫がん微小環境制御の分子機構を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Uemura S, Lin KS, Mon Thwin KK, Nakatani N, Ishida T, Yamamoto N, Tamura A, Saito A, Mori T, Hasegawa D, Kosaka Y, Nino N, Nagano C, Takafuji S, Iijima K, Nishimura N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Limited correlation between tumor markers and minimal residual disease detected by seven neuroblastoma-associated mRNAs in high-risk neuroblastoma patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and clinical oncology	6. 最初と最後の頁 137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2021.2299.	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 Kyaw San Lina , Suguru Uemuraa , Khin Kya Mon Thwina , Naoko Nakatani a , Toshiaki Ishida b , Nobuyuki Yamamotoa , Akihiro Tamura b , Atsuro Saito b , Takeshi Mori b , Daiichiro Hasegawa b , Yoshiyuki Kosaka b , Nanako Ninoa , China Naganoa , Satoru Takafuji a , Kazumoto Iijimaa , Noriyuki Nishimura.	4. 巻 14
2. 論文標題 Minimal residual disease in high-risk neuroblastoma shows a dynamic and disease burden-dependent correlation between bone marrow and peripheral blood.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational oncology	6. 最初と最後の頁 101019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2021.101019.	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
研究協力者	西村 範行 (NISHIMURA NORIYUKI) (00322719)	神戸大学・小児科・特命教授 (14501)	
研究協力者	森 健 (MORI TAKESHI)	神戸大学・小児科・助教 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	植村 優 (UEMURA SUGURU) (40814348)	神戸大学・小児科・大学院生 (14501)	

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