

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18022

研究課題名(和文)患者由来同所性異種移植(PDOX)モデルを用いた神経芽腫難治性メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of the refractory neuroblastoma using Patient-Derived Orthotopic Xenograft

研究代表者

秦 佳孝 (Shinno, Yoshitaka)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号：90815094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全マウスを用いて患者由来腫瘍の移植実験を行ったが生着しなかった。そこで Neurosphere 形成法によりがん幹細胞を濃縮し、得られた sphere で移植実験を行ったが同様だった。このため神経芽腫細胞株の sphere 形成時に発現上昇するポリコム複合体 PRC2 サブユニットである EZH1 に着目した。複数の細胞株において EZH1 のノックダウンはアポトーシスによる細胞死をもたらした。マイクロアレイ法および ChIP シーケンス法により、EZH1 は MYCN と協調して下流の cell cycle に関わる遺伝子群の発現を調整していた。EZH1 阻害により難治性神経芽腫に対する新規治療法開発の可能性が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫は小児悪性固形腫瘍としては脳腫瘍に次いで多く、良性に近いものから極めて悪性度の高いものまで、多彩な character を示す腫瘍である。進行神経芽腫は集学的治療により約7割が寛解となるが、その約半数は再発をきたす。再発腫瘍は治療抵抗性を獲得し、様々なサルベージ治療が奏功せず不幸な転帰をたどる場合が多い。今回の研究では神経芽腫の難治性に関わるとされる、がん幹細胞を標的とした治療の可能性を示した。今後標的遺伝子の同定と阻害効果を検討したい。

研究成果の概要(英文)：We performed a transplantation of tumor experiment derived from patients using an immunodeficiency mouse, but did not engraft. Therefore, we transplanted the thing which concentrated cancer stem cells by the Neurosphere formation method, but, after all, did not engraft. We paid our attention to EZH1 which is one of the polycomb complex PRC2 subunits. EZH1 expression was increased when neuroblastoma cell line changed in sphere. The knockdown of EZH1 resulted in cell death by the apoptosis in the several cell line. By the microarrays method and the ChIP sequence method, EZH1 coordinated the expression of gene cluster about cell cycle in collaboration with MYCN. We can develop a new therapy for the refractory neuroblastoma by EZH1 inhibition.

研究分野：小児外科

キーワード：神経芽腫 PDOX がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児悪性固形腫瘍としては脳腫瘍に次いで多く、良性に近いものから極めて悪性の高いものまで、多彩な character を示す腫瘍である。進行神経芽腫は集学的治療により約7割が寛解となるが、その約半数は再発をきたす。再発腫瘍は治療抵抗性を獲得し、様々なサルベージ治療が奏功せず不幸な転帰をたどる場合が多い。こうした治療抵抗性の獲得にはがん幹細胞(cancer stem cell, 以下 CSC)を中心とした腫瘍組織の不均一性と、それを支持する微小環境の存在が関わっているとされる。

神経芽腫 CSC 研究モデルとしては無血清培地中で形成される高い造腫瘍能を持つ細胞集塊(sphere)を用いた方法があり(Hansford et al., Cancer Res., 2007)、当研究室でも同様の手法を用いて患者由来神経芽腫細胞からの primary sphere の樹立に成功している。

患者由来同所性異種移植モデル(Patient-Derived Orthotopic Xenograft, 以下 PDOX)とは、患者由来の腫瘍検体を同所性に免疫不全マウスに移植したモデルである。このモデルでは患者の腫瘍と同様に、腫瘍組織の不均一性・微小環境などが忠実に再現される。これにより移植された原発腫瘍は増大し、遠隔転移を生じる、極めて臨床に近いモデルとなる。神経芽腫の臨床像から、転移組織中には CSC 由来のクローンが凝縮されていることが予想される。これを解析することで神経芽腫の難治化のメカニズムを解明する糸口になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では神経芽腫 PDOX モデルを樹立し、PDOX マウスに発生した原発腫瘍・転移腫瘍に対して網羅的ゲノム/遺伝子発現解析を行うことにより、神経芽腫が難治性を獲得するメカニズムを解明するための基盤を得ることを当初の目的とした。

しかしながら、後述するように PDOX の生着は困難であり、実際には PDOX から転移巣の抽出と継代培養を行うことは叶わなかった。そこで前述した CSC 研究モデルである sphere の発現解析により、CSC の維持に重要と思われるエピゲノム因子に着目し、神経芽腫の難治性獲得のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 神経芽腫 PDOX の作成

患者由来腫瘍細胞を破碎し、 10^5 個相当を 50%マトリゲルと混濁して 20 μ l とし、5 週齢の免疫不全マウス(NOD/ShiJic-scid)に移植した。マウスを全身麻酔下に開腹し、腎上極の被膜下を穿刺して副腎周囲脂肪織に患者由来腫瘍細胞の懸濁液を注入し、PDOX モデルを作成した。腫瘍の生着は触診により観察し、マウスが死亡した場合は開腹して副腎組織を肉眼・組織学的に観察した。

2) 神経芽腫 CSC 維持に必要な分子に着目した難治性メカニズムの解明

神経芽腫細胞株の sphere 形成における発現解析にてポリコーン複合体 PRC2 サブユニットである EZH1 の上昇が見られた。ポリコーン複合体 PRC2 はヒストンメチル化を介したクロマチン凝縮を制御することにより、発生分化過程における遺伝子発現をダイナミックに変化させるが、コアサブユニットである EZH1 と EZH2 ではその作用が異なることが既報で証明されている。

細胞株を用いた EZH1 のノックダウン実験により、神経芽腫の腫瘍増殖における変化と遺伝子発現変化を解析した。

4. 研究成果

1) 神経芽腫 PDOX の作成

初年度は予備実験として神経芽腫細胞株を用いた同所移植実験によりマウス副腎への腫瘍生着を得たが、患者由来腫瘍細胞の懸濁液では副腎周囲脂肪織内のスペースに限りがあるため必要な細胞数を播種することができず、生着には至らなかった。そこで患者由来腫瘍細胞を手術によって得られた神経芽腫患者の生検検体(10歳、stage M、MYCN 非増幅)を 1-2mm 角となるよう破碎し、sphere culture method により 1 週間培養した。これによって得られた sphere を顕微鏡下に回収し、20-30 個/10 μ l となるようマトリゲルに混濁した。5 週齢の NOD/ShiJic-scid マウスを麻酔下に開腹し、副腎周囲脂肪織内に直視下に細胞混濁液を穿刺注入した。移植マウスは術後 28 週で死亡するまで腫瘍の発生は認めなかった。

当初生着率を上げるために組織保存方法の検討や移植手技の改良を計画したが、新型コロナウイルス流行による影響で移植実験を継続することが困難となった。

2) 神経芽腫 CSC 維持に必要な分子に着目した難治性メカニズムの解明

当研究室では過去の実験で神経芽腫細胞株の sphere 形成における発現解析にてポリコーン複合体 PRC2 サブユニットである EZH1 の上昇が見られていた。神経芽腫 CSC の維持に重要な役割

を担っていると仮定し、神経芽腫細胞株を用いた EZH1 ノックダウン実験を行った。

神経芽腫細胞株における EZH1 のノックダウンによる腫瘍抑制効果

複数の神経芽腫細胞株においてウエスタンブロット法により EZH1 のタンパク発現を観察したところ、MYCN 増幅のある細胞株において優位にその発現が高いことが分かった。そこで MYCN 増幅のある IMR32、NGP、SMS-SAN の 3 種類の神経芽腫細胞株に対して 2 種類の shRNA を用いた EZH1 ノックダウン実験を行ったところ、すべてにおいて腫瘍増生の抑制を認めた。また、EZH1 をノックダウンした NGP と IMR32 を免疫不全マウスに移植したところ、腫瘍増生は抑制され、組織の HE 染色により核崩壊像(karyorrhexis)を認めた(図1)。フローサイトメトリーによる細胞周期解析では sub-G1 割合の増加が見られ、アポトーシスが関与していることが考えられた。

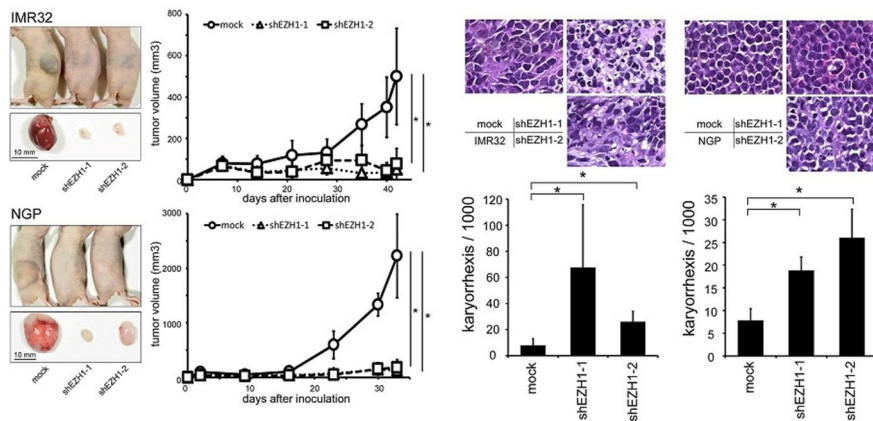


図1 EZH1 ノックダウンによるマウス Xenograft モデルにおける腫瘍増生抑制効果
(左：腫瘍体積の経時的変化、右：腫瘍組織の HE 染色と核崩壊像の比較)

EZH1 と MYCN のタンパク複合体の証明

MYCN と EZH1 を強制発現させたヒト線維芽細胞の細胞株 293T を用いて免疫沈降実験を行い、両者がタンパクレベルで複合体を形成していることが示唆された(図2)。

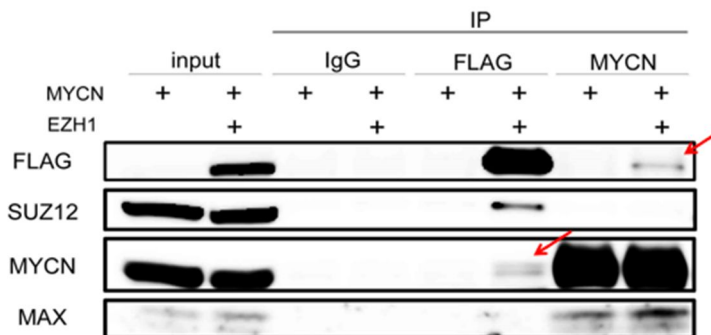


図2 MYCN, EZH1(-FLAG) 強制発現 ヒト線維芽細胞の免疫沈降 (IP) 実験

MYCN は神経芽腫における強力な予後因子であり、転写因子として様々な下流遺伝子の発現に関与している。このことから、EZH1 のヒストン修飾が MYCN と強調して下流のがん遺伝子の発現促進に寄与すると仮定した(図3)。

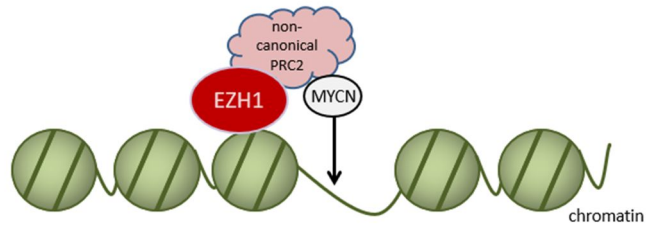


図3 仮説：EZH1 はクロマチン構造を open にし，転写因子 MYCN の結合を促進してがん遺伝子発現活性化に寄与する

EZH1 による遺伝子発現と MYCN 結合変化の網羅的解析

EZH1 をロックダウンした神経芽腫細胞株 IMR32 を用いて、遺伝子発現と MYCN 結合変化をそれぞれマイクロアレイ法と ChIP シーケンス法により網羅的に解析した。その結果、MYCN 結合が低下し、かつ遺伝子発現が低下した遺伝子として Cell cycle に関わる遺伝子群が抽出された（図4）。

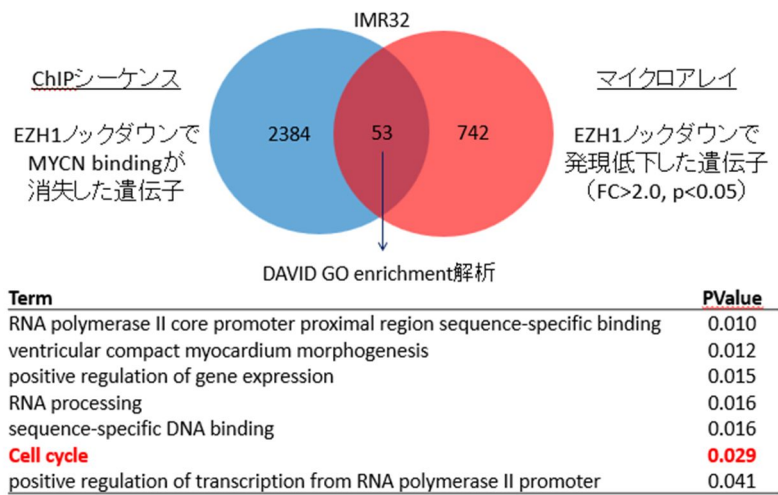


図4 EZH1 ロックダウンによる MYCN 結合変化と遺伝子発現変化の網羅的解析

これらの知見より、MYCN 増幅のある神経芽腫に関しては EZH1 が MYCN と協調して下流のがん遺伝子発現に寄与している可能性が示唆された。この EZH1 は CSC を模倣した sphere においてその発現量が増加しており、CSC の維持に重要な働きをしていると考えられる。EZH1 を抑制することで難治性神経芽腫に対する新規治療法の開発の可能性はある。今後は下流遺伝子の特定と阻害効果の検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshitaka Shinno, Keita Terui, Mamiko Endo, Takeshi Saito, Mitsuyuki Nakata, Shugo Komatsu, Satoru Oita, Yoshio Katsumata, Yukiko Saeda, Genta Ozeki, Yoshiteru Ohsone, Tomoro Hishiki	4. 巻 37
2. 論文標題 Optimization of surgical timing of congenital diaphragmatic hernia using the quantified flow patterns of patent ductus arteriosus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 197, 203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-020-04788-9. Epub 2021 Jan 3.	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 -

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

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
---------	---------