

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18053

研究課題名（和文）神経芽細胞腫の治療後再発予防に対するAcyclic retinoidの研究

研究課題名（英文）Preventing recurrence of high risk Neuroblastoma with Acyclic retinoid

研究代表者

石橋 脩一（Ishibashi, Shuichi）

島根大学・医学部・医科医員

研究者番号：70834795

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）：MYCN遺伝子が増幅している神経芽細胞腫(NB)は、集学的治療後の再発が大きな問題となっている。我々はMYCN遺伝子増幅したNBのcell lineを用いてAcyclic retinoidの有用性をcell viabilityおよびMYCN遺伝子の発現量で検証した。cell viabilityでは薬剤投与によって有意に低下を示したが、他の比較した薬剤も同様の効果がみられた。またMYCN遺伝子の発現量の変化は認めなかった。追加で分化誘導療法の併用についても検証を行った。cell viabilityでは一部で単剤より併用で有意な効果を認めたが、MYCN遺伝子の発現量は明らかな効果を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽細胞腫株を用いた今回の実験では、ACRの有効性は証明できなかった。また、分化誘導療法の併用によるcell viabilityの低下、MYCN遺伝子発現の低下を一部に確認できたが、その機序やタンパク質発現については不明であり、さらなる検証が必要である。これらの実験が発展し、高リスク群神経芽細胞腫の再発予防に対する分化誘導療法がより有効な治療法となることを期待したい。

研究成果の概要（英文）：We examined the effect of acyclic retinoid (ACR) on cell viability and MYCN gene expression level using neuroblastoma (NB) cell lines. All-trans-retinoic acid (ATRA) and 13-cis-retinoic acid (13-cis RA) were used for comparison of ACR. Cell viability was significantly reduced by drug administration, but ACR was less effective than ATRA/13-cis RA. In addition, the expression level of MYCN gene was not observed in any of drugs. Based on recent reports, we also investigated the combination of differentiation therapy (ATRA+13-cis RA, 13-cis RA+ACR ATRA+ACR). In terms of cell viability, significant effects were observed in some cases with combination therapy rather than with single therapy.

研究分野：小児外科

キーワード：神経芽細胞腫 Acyclic retinoid 分化誘導療法

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、MYCN 遺伝子増幅した神経芽細胞腫(NB)に対する Acyclic retinoid(ACR)を用いた再発予防法を開発することである。MYCN 遺伝子が増幅している NB は、化学療法、手術療法、放射線療法および自家末梢血幹細胞移植併用大量化学療法による集学的治療後の再発が大きな問題となっている。現在、13-cis-retinoic acid(13-cis RA)による分化誘導療法が行われているが、十分な効果を得られていない。最近、13-cis RA と同じビタミン A の誘導体である ACR が肝細胞がん(HCC)の MYCN 遺伝子発現を抑制することが明らかとなり<sup>1)</sup>、HCC の再発予防薬として治験が行われている。また、ACR はがん細胞に対して抗がん効果を有することも報告されている<sup>2)</sup>。そこで、MYCN 遺伝子が増幅している NB に対して、ACR の有効性を in vitro および in vivo の両面から明らかにする。この研究成果を踏まえて、MYCN 遺伝子が増幅している NB に対する集学的治療後の再発予防薬として ACR を用いた臨床研究を行い、ACR を再発予防薬の標準治療として確立させたい。

## 2. 研究の目的

MYCN 遺伝子増幅した NB の cell line を用いて、ACR の有効性を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

4 種類の NB cell line である、NB9、GOTO、IMR-32、NB69 を用いて種々の実験を行った。MYCN 遺伝子が増幅している cell line は NB9、GOTO、IMR-32 で MYCN 遺伝子の増幅していない cell line が NB69 である。薬剤の有効性については all-trans-retinoic acid(ATRA)、13-cis RA で比較検討を行った。cell viability を MTT アッセイ、MYCN 遺伝子発現についてリアルタイム PCR で評価している。

## 4. 研究成果

はじめに濃度調整を行った。ATRA、13-cis RA、ACR とともに  $5\mu\text{M} < \text{EC}_{50} < 15\mu\text{M}$  であったため、各 cell line で cell viability をみた(図 1)。各薬剤で濃度依存性に cell viability の低下を認めたが、ATRA・13-cis RA に対する ACR の有効性は示されなかった。また、MYCN 遺伝子の発現についてリアルタイム PCR で評価を行ったが、いずれの薬剤においても MYCN 遺伝子の発現低下は見られなかった(図 2)。遺伝子とタンパク質では発現が異なるとして現在、western blotting を施行中だが、結果が出ていない。

近年、ATRA が MYCN と同じ 2 番染色体に存在する ALK 遺伝子の発現を低下させることが報告された<sup>3)</sup>。これに基づき分化誘導療法の併用を提案し、追加で研究を行った。まず、試薬の濃度調整を行った。ATRA+13-cisRA、13-cis RA+ACR、ATRA+ACR の 3 つのコンビネーションで実験を行い、 $2\mu\text{M} + 2\mu\text{M} < \text{EC}_{50} < 4\mu\text{M} + 4\mu\text{M}$  であったため、すべてのコンビネーションで  $3\mu\text{M} + 3\mu\text{M}$  で濃度調整を行い、薬剤なし、単剤投与、コンビネーションで MTT アッセイおよびリアルタイム PCR を施行した。MTT アッセイでは ACR 単剤に対し、ATRA+13-cis RA、ATRA+ACR で有意に cell viability を低下させた cell line を認め、 $15\mu\text{M}$  の単剤よりも少ない投与量で同等の効果を得ている(図 3)。リアルタイム PCR では IMR-32 の cell line でのみ ATRA+ACR で有意な発現量低下を認めたが、それ以外は単剤同様であった。

以上が研究成果である。これら以外にも、cell cycle やレチノイン酸受容体βの発現増加などを現在施行中である。

## 参考文献：

- 1) Qin XY, Suzuki H, Honda, et al : Prevention of hepatocellular carcinoma by targeting MYCN-positive liver cancer stem cells with acyclic retinoid. Proc Acad Sci USA 2018;115(19):4969-4974
- 2) R Shrestha, H Tatsukawa, R Shrestha, et al : Molecular mechanism by which acyclic retinoid induces nuclear localization of transglutaminase 2 in human hepatocellular carcinoma cells. Cell Death Dis 2015;339:doi:10.1038/cddis
- 3) Futani H, Sakai R : All-trans retinoic acid downregulates ALK in neuroblastoma cell lines and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with activated ALK. Cancer Lett 2010;297(2):220-225

図 1：薬剤の濃度による cell viability

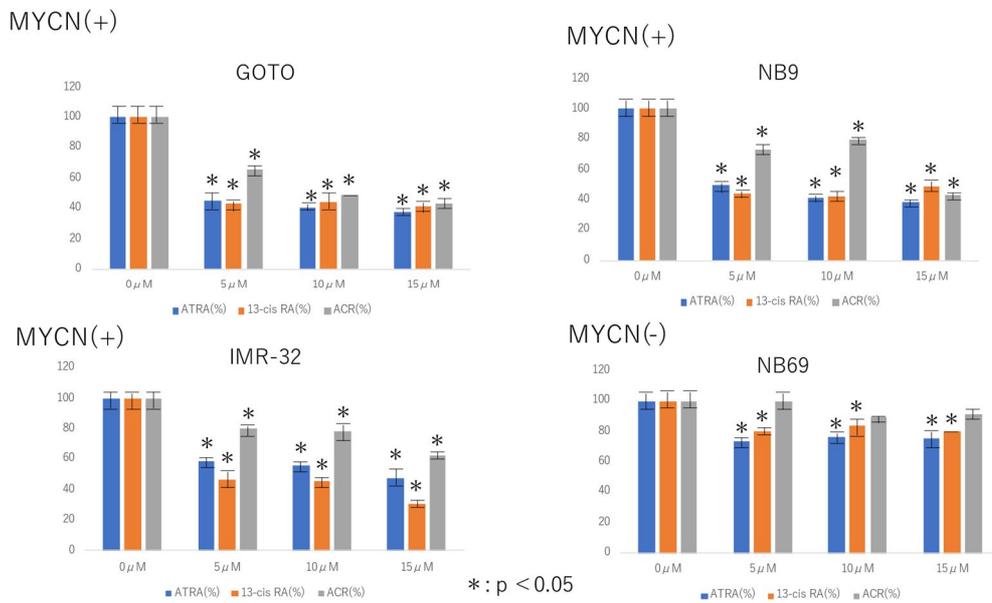


図 2 : 薬剤の濃度による MYCN 遺伝子の発現量

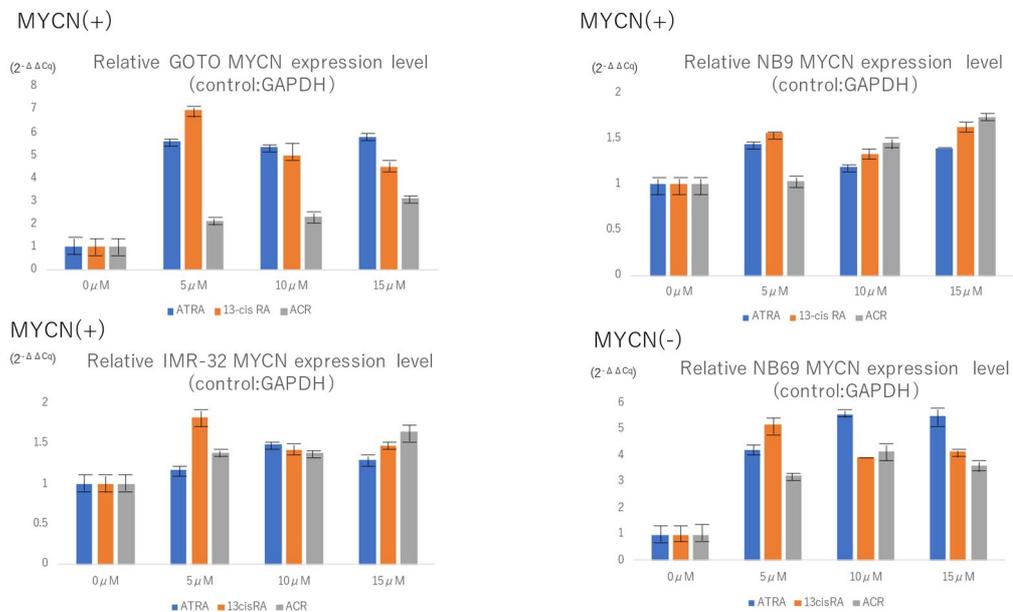
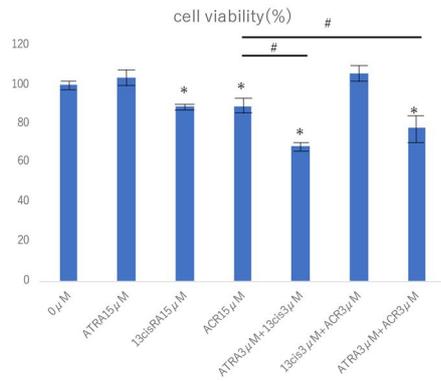


図 3 : 分化誘導療法の併用による cell viability

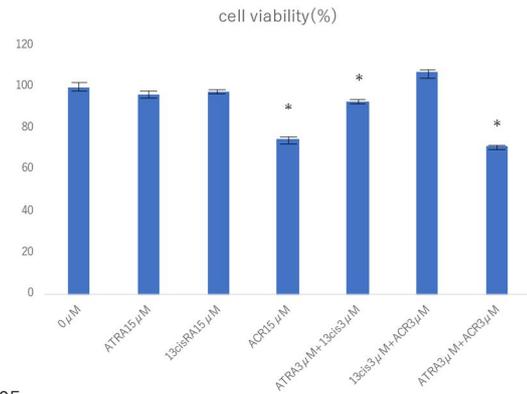
MYCN(+)

GOTO



MYCN(+)

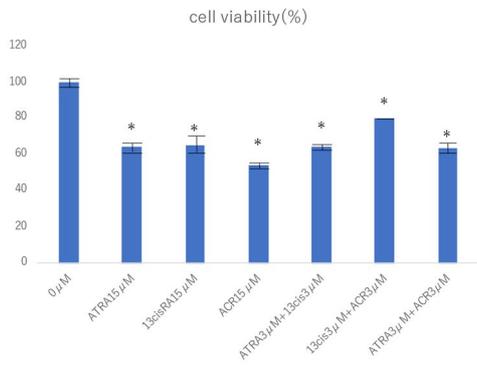
NB9



\*: p < 0.05

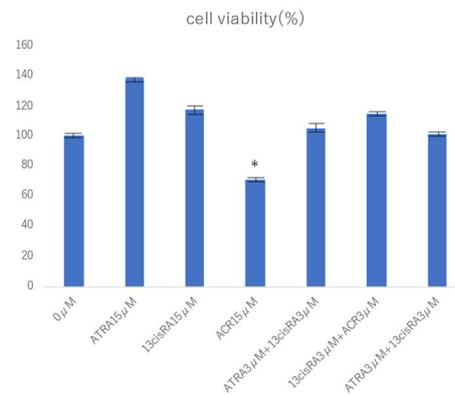
MYCN(+)

IMR-32



MYCN(-)

NB69

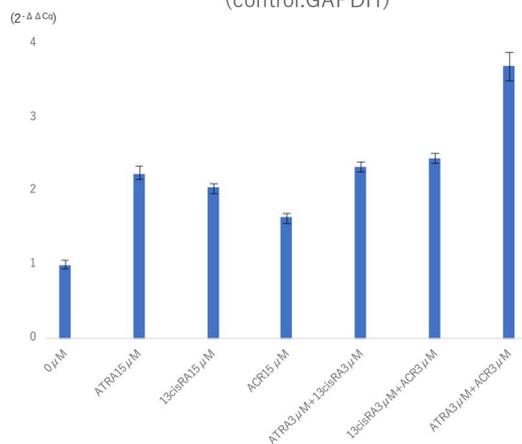


\*: p < 0.05

図 4 : 分化誘導療法の併用による MYCN 遺伝子の発現量

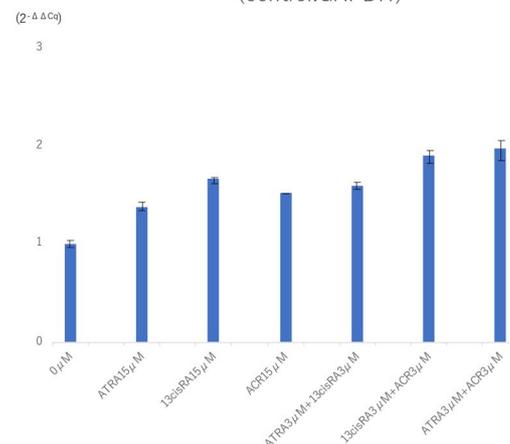
MYCN(+)

Relative GOTO MYCN expression level (control:GAPDH)



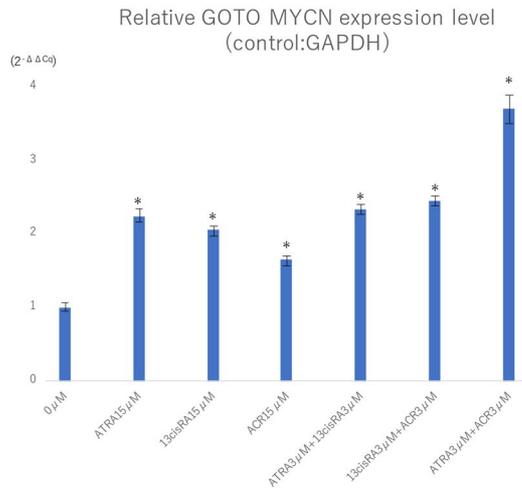
MYCN(+)

Relative NB9 MYCN expression level (control:GAPDH)

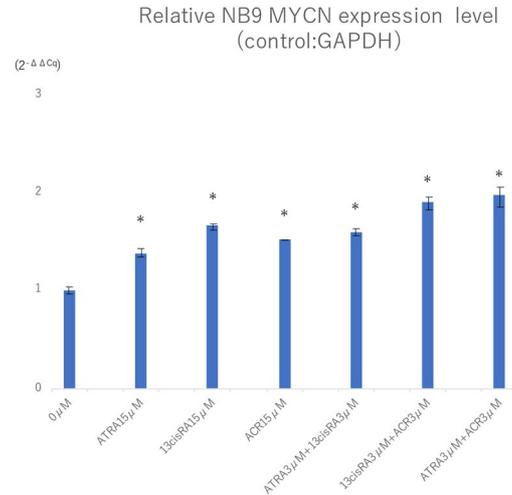


\*: p < 0.05

MYCN(+)

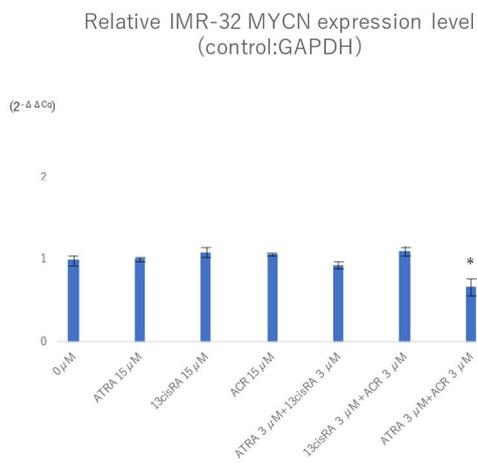


MYCN(+)

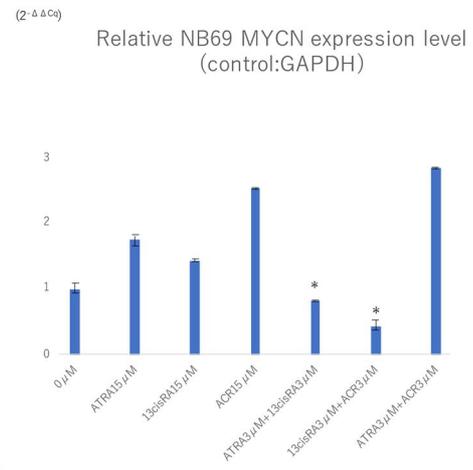


\*: p < 0.05

MYCN(+)



MYCN(-)



\*: p < 0.05

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

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