

機関番号：82504

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591268

研究課題名 (和文) がんのゲノム・発現解析から同定した遺伝子による、*Mash1* の転写と細胞増殖の制御研究課題名 (英文) Regulation of *Mash1* transcription and cell growth by genes identified in gene expression analysis of cancer

研究代表者

磯貝 恵理子 (ISOGAI ERIKO)

千葉県がんセンター (研究所)・臨床ゲノムセンター・がんゲノム研究室・上席研究員

研究者番号：40300917

研究成果の概要 (和文) : *Mash1* は正常な神経発生の過程で一過性に発現するが、神経芽腫では恒常的に発現している。本研究では、予後不良な神経芽腫で高く発現している LIM-only protein、LM03 と bHLH protein、HEN2 が協調的に働いて *Mash1* の転写抑制因子である HES1 の機能を制御し、*Mash1* の転写の促進と神経芽腫の発生に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : *Mash1* is transiently and permanently expressed in normal developmental process and in neuroblastoma, respectively. In this study, it was suggested that LIM-only protein, LM03 and bHLH protein, HEN2, that are highly expressed in unfavorable neuroblastoma, cooperate for promoting *Mash1* transcription and development of neuroblastoma through interfering with the function of HES1, a negative regulator of *Mash1* transcription.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞医化学、神経芽腫、神経発生学
 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学
 キーワード：神経芽腫、神経発生

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は神経堤細胞の分化過程の異常により生じる腫瘍である。我々はこれまでに、神経芽腫の異なるサブセットから複数の cDNA ライブラリーを作製し、5,400 個の遺伝子を抽出して新規遺伝子を含む約 400 の予後に関連する遺伝子の同定と機能解析を進めている。

本研究で機能解析を行っている遺伝子 Nbla3267 について以下のことがわかっている。

(1) LIM-only proteins (LM0) の 1 つ LM03 であると同定された。

(2) LM03 は予後不良な神経芽腫で高発現しているが、LM03 と腫瘍発生との関連性については不明な点が多い。

(3) LM03 は成人及び胎児の脳で高発現している。さらに LM03 は、神経発生に必須で神経芽腫の発生に重要な働きをする遺伝子 *Mash1* の発現を正に制御することが推察されており、LM03 の神経発生過程との関連性が示されている。

(4) LM0 には DNA 結合能がなく、遺伝子の転写を制御するために DNA 結合能をもつ他の蛋白質と複合体を形成する必要がある。神経芽腫細胞株で LM03 と共に高発現しているものを検討した結果、neuronal-specific basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor である HEN2 が予後不良な神経芽腫及び神経芽腫細胞株で LM03 と共に高発現していた。HEN2 は LM03 と細胞内で結合することが示された。

(5) LM03 の発現が継続的に増加している神経芽腫細胞株を樹立してマウスに移植するとがんが発生し、その細胞株の細胞増殖能は増加することを観察した。従って、LM03 には神経芽腫を悪化させる作用があると考えられる。

(6) LM03 と HEN2 が相互作用し、神経芽腫の増殖分化をどのような機序で制御しているかを解析するために、アデノウイルスベクターを用いて LM03 と HEN2 を神経芽腫細胞 SH-SY5Y で一過性に高発現させ、遺伝子の発現を調べた。その結果、*Mash1* を含む、神経発生や分化に関連する遺伝子の発現量が増加していた。従って、LM03 と HEN2 は神経発生の過程で働く遺伝子の転写を制御していることが示唆された

2. 研究の目的

(1) 神経芽腫において *Mash1* の継続的な発現が細胞増殖を促進していることを確認する。

(2) 細胞増殖と *Mash1* の転写について LM03 の関連性を明らかにする。

(3) *Mash1* の転写は bHLH factor である HES1 によって負に制御されている。そこで、*Mash1* の転写に対する LM03、HEN2、HES1 の関連性について調べる。

(4) LM03、HEN2 と HES1 の分子間相互作用を検討する。

(5) *Mash1* 転写制御と細胞の増殖分化における HES1、N-myc、Id2 と HEN2 との関連性が

推察されている。一方、LM03 は、HEN2 と同様に HLH domain をもつ HES1、N-myc、Id2 と結合しその機能を修飾することが示唆されている。そこで HEN2 と LM03 が HES1、N-myc、Id2 とどのように相互作用しあい、*Mash1* の転写と細胞の増殖分化を制御して神経芽腫の発生に関与するかを明らかにする。

(6) *in vitro* の実験系で明らかになってきた結果を *in vivo* で確認、検討するために、神経堤細胞や末梢神経、副腎髄質で LM03、HEN2 の各遺伝子を高発現させたトランスジェニックマウスを作製し、交感神経節細胞や副腎髄質細胞の分化、増殖への効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト *Mash1* を継続的に高発現している株を、SH-SY5Y 細胞でレトロウイルスを用いて樹立し、その増殖能を調べる。

(2) ヒト LM03 の si-RNA を作製して、継続的に LM03 および *Mash1* を発現しているヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y に導入し、細胞増殖に対する効果を観察する。同時に LM03 および *Mash1* の転写への効果も半定量 RT-PCR 法と *Mash1* プロモーターを使った

Dual-Luciferase Reporter Assay で調べる。

(3) LM03、HEN2、HES1 による *Mash1* 転写制御の分子機構について検討する。

① *Mash1* プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流につないだプラスミドを構築し Dual-Luciferase Reporter Assay を行う。HES1 による *Mash1* 転写抑制効果に対して、HEN2 が濃度依存性にどのような影響を及ぼすか解析する。この時 LM03 を供発現させてその効果を観察する。

② *Mash1* のプロモーター領域の HES1 結合配列と bHLH factor が結合する E-box に HEN2 が結合して HES1 の結合に影響を与えるか検討するために ChIP Assay を行う。HES1 の存在により HEN2 の DNA への結合が、あるいは HEN2 の存在により HES1 の DNA への結合が影響されるか検討する。この時 LM03 を供発現させてその効果を観察する。

③ HES1 と HEN2 や LM03 が細胞内で結合することを免疫沈降法で確認し、相互作用について検討する。

(4) LM03、HEN2、HES1、N-myc、Id2 による *Mash1* 転写制御の分子機構について検討する。

① N-myc による *Mash1* 転写促進効果に対して、LM03 や HEN2 が濃度依存性にどのような影響を及ぼすか Dual-Luciferase Reporter Assay で解析する。

② *Mash1* のプロモーター領域上の E-box に N-myc が結合して HEN2 がその結合に影響

を与えるか検討するために ChIP Assay を行う。*Mash1* プロモーターへの HES1、HEN2 の結合に対する Id2 の効果を同様に検討する。LMO3 が HEN2、HES1、N-myc、Id2 と結合し、その *Mash1* プロモーターへの効果を修飾するか調べる。

③ 各蛋白質間の細胞内での結合を免疫沈降法で調べ、*Mash1* の転写制御に対する N-myc、Id2、HES1、HEN2、LMO3 の分子間相互作用を検討する。

(5) 神経芽腫の組織より抽出された RNA から作られた cDNA を用いて、神経芽腫の組織における各遺伝子の発現量を Real-Time PCR 法により比較し、その関係を検討する。

(6) *In vitro* の結果を *in vivo* で検証するために、神経堤細胞、末梢神経系、副腎髄質細胞で LMO3、HEN2、N-myc を高発現させたマウスを使用し、交感神経節細胞や副腎髄質細胞の分化、増殖への効果を検討する。そのためのプラスミドの構築を行なう。

① *Wnt1* promoter/enhancer による神経堤細胞での発現

② *Tyrosine hydroxylase (TH)* promoter による交感神経節細胞や副腎髄質細胞での発現

(7) 構築されたプラスミドを用いて、各遺伝子の受精卵へのインジェクションと解析、さらにトランスジェニックマウスの作製と解析を行なう。

①胎仔での解析

Wnt1 promoter/enhancer や *TH* promoter の下流に Myc-LMO3 や FLAG-HEN2 を組み込んだ発現ベクターをマウス受精卵にインジェクションし、マウス胎仔の神経堤細胞や交感神経節細胞、副腎髄質細胞で LMO3 や HEN2 を単独あるいは同時に発現させる。胎生期で経時的に神経堤細胞、交感神経節、副腎髄質について細胞数の増加、神経堤細胞や神経分化のマーカーの発現量を検討する。マイクロインジェクションによる目的遺伝子の発現が出来なかった場合はトランスジェニックマウスを作製し解析をおこなう。

②トランスジェニックマウスでの解析

Wnt1 promoter/enhancer の下流に Myc-LMO3 や FLAG-HEN2 を組み込んだトランスジェニックマウスを作製する。観察は、胎仔での解析と同様な点について行なう。

TH promoter の下流に LMO3 や HEN2 を組み込んだトランスジェニックマウスを作製する。さらに *TH* promoter の下流に N-myc 組み込んだマウスと LMO3 や HEN2 のトランスジェニックマウスと交配して末梢神経や副腎の変化を胎仔や個体で観察する。

③神経細胞の初代培養系で解析を行なう。トランスジェニックマウスから調整した末梢神経細胞の初代培養を行ない、遺伝子や蛋白質の変化について免疫染色法、RT-PCR 法、Real-Time PCR 法やウエスタンブロッティング法で解析する。

4. 研究成果

神経芽腫は、神経堤細胞の発生・分化の過程における異常により生じる腫瘍である。神経芽腫の組織から同定された遺伝子 LMO3 と HEN2 の機能について研究を進め、神経芽腫発生への両遺伝子の関与を示した。

(1) *Mash1* を継続的に高発現している株を神経芽腫細胞 SH-SY5Y でレトロウイルスを用いて樹立し、*Mash1* の継続的な発現が神経芽腫における細胞増殖を促進していることを確認した。

(2) LMO3 の si-RNA を作製して、LMO3 および *Mash1* を発現している SH-SY5Y に導入し、細胞増殖に対する効果を調べた。更に *Mash1* プロモーターを使った Reporter Assay と、半定量 RT-PCR 法により LMO3 の *Mash1* 転写への効果を観察し、LMO3 が神経芽腫において細胞増殖促進効果をもつと同時に *Mash1* の転写を促進していることを明らかにした。

(3) LMO3、HEN2、HES1 による *Mash1* 転写制御の分子機構について、*Mash1* プロモーターを使った Reporter Assay と ChIP Assay により検討した。

① HES1 による *Mash1* 転写抑制効果を HEN2 が阻害した。この HEN2 の HES1 阻害効果を LMO3 が促進することにより *Mash1* の転写増加が起こることが示唆された。

② *Mash1* プロモーターの HES1 結合配列に HEN2 が結合して HES1 の結合を阻害した。このとき LMO3 は HES1 の結合を抑制し、HEN2 の結合を促進した。

(4) HEN2 と LMO3 が HES1 と複合体を形成して、その効果を制御していることを免疫沈降法で示した。

(5) *Mash1* の転写は N-myc によって促進されるが、LMO3 と HEN2 はその N-myc の効果を阻害して *Mash1* の一過性の高い発現を抑制することが Reporter Assay によって示された。

(6) LMO3 と HEN2 は、N-myc の negative-autoregulation を抑制することにより、N-myc の転写を維持することが RT-PCR 法で示された。

(7) 免疫沈降法により調べたところ、LMO3 と HEN2 は N-myc と複合体を形成した。

(8) N-myc の negative-autoregulation は、histone deacetylase2 (HDAC2) を介してお

こることが報告されている。LM03 と HEN2 は N-myc と HDAC2 の結合に影響を及ぼして negative-autoregulation を抑制することが免疫沈降法で示唆された。

従って、LM03 と HEN2 は、神経幹細胞の維持に必要な HES1 や N-myc の効果を阻害することにより *Mash1* の継続的な発現を誘導し、その結果未成熟な神経発生が起こることが示唆された。

(9) 神経芽腫の組織より抽出された RNA から作られた cDNA を用いて、神経芽腫の組織における各遺伝子の発現量を Real-Time PCR 法により比較しその関係を検討した。LM03 と *Mash1* は、同一の予後不良な神経芽腫のサンプル群において高発現を示し、予後不良な神経芽腫発生における両遺伝子の高い相関性が示された。

(10) *In vitro* の実験系で明らかになってきた結果を *in vivo* で確認、検討するために、神経芽腫の発生母地である神経堤細胞や、神経芽腫が高頻度に発生する交感神経節細胞、副腎髄質細胞において、LM03、HEN2 の各遺伝子を高発現させたトランスジェニックマウスを作製した。

① 神経堤細胞に発現している *Wnt1* の promoter/enhancer を用いたトランスジェニックマウスでは神経系や分離培養した神経堤細胞において異常が観察された。

② 交感神経節細胞、副腎髄質細胞に発現している *tyrosine hydroxylase* の promoter を用いたトランスジェニックマウスでも異常な個体が生まれた。

今後、これらのマウスについて各遺伝子の発現と形質の関連性について詳細な解析を行い、個体における神経芽腫発生のメカニズムを検討する。

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1件)

- ① Eriko Isogai, Miki Ohira, Toshinori Ozaki, Shigeyuki Oba, Yohko Nakamura, and Akira Nakagawara, Oncogenic LM03 collaborates with HEN2 to enhance neuroblastoma cell growth through transactivation of *Mash1*, PLoS ONE,

査読有り、vol.6、2011、e19297

[学会発表] (計5件)

- ① 磯貝恵理子, Constitutive *Hen2* expression promotes proliferation and interferes with differentiation in neural crest cells、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪、大阪国際会議場
- ② Eriko Isogai, Constitutive *Hen2* Expression in Neural Crest Cells Could Be a Trigger of Neuroblastoma Development, Advanced in Neuroblastoma Research 2010、2010年6月23日、Sweden Stockholm、Stockholm City Conference Centre
- ③ 磯貝恵理子, *In vitro* and *in vivo* analyses of genes derived from neuroblastoma and involved in transcriptional regulation of *Mash1* 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日、横浜、パシフィコ横浜
- ④ 磯貝恵理子、神経芽腫由来遺伝子による、*Mash1* の転写制御、第24回日本小児がん学会、2008年11月15日、千葉、幕張メッセ国際会議場
- ⑤ 磯貝恵理子、Transcriptional regulation of *Mash1* by genes derived from neuroblastoma、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日、名古屋、名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯貝 恵理子 (ISOGAI ERIKO)
千葉県がんセンター (研究所)・臨床ゲノムセンター・がんゲノム研究室・
上席研究員
研究者番号：40300917

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：
