

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2008 ～ 2009
課題番号：	20790251
研究課題名(和文)	神経芽腫モデルマウスを用いたミッドカイン標的治療の評価と更なる治療標的の探索
研究課題名(英文)	The evaluation of Midkine as a therapeutic target in neuroblastoma model mice and the further search for other targets
研究代表者	
	岸田 聡 (Satoshi Kishida)
	名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
	研究者番号：20402563

研究成果の概要(和文)：難治性の小児がんで、悪性度の高い症例に対しては未だ有効な治療法がない神経芽腫について、モデルマウスを用いて分子治療の新規標的候補の評価・探索を行った。まず、我々が発見したミッドカインという遺伝子について、神経芽腫の発生や進展に関わることを見出し、分子治療の効果的な標的となり得る可能性を示した。一方、同マウスを用いた遺伝子発現の網羅的解析によって神経芽腫に関わる新規因子を探索し、将来の治療への応用可能性を踏まえた候補をいくつか同定した。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the novel therapeutic target of neuroblastoma, a pediatric solid tumor, in model mice. We showed that Midkine, the gene we identified before, was involved in the tumorigenesis of neuroblastoma, and could be an effective target for molecular therapy. On the other hand, we searched the other genes involved in neuroblastoma by comprehensive expression analysis, and identified some potent candidates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：神経芽腫、モデルマウス、ミッドカイン、分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、交感神経系組織である副腎髄質や神経節から発生する小児がんである。神経芽腫の原因遺伝子としては転写因子 MYCN が考えられており、がん細胞において MYCN 遺伝子が「増幅」している 20-30%の

症例では、予後が著しく悪いことが知られている。また、神経芽腫の基礎研究を行う目的で作成されたマウスモデルでは、ヒトの MYCN 遺伝子を組み込んでいる (MYCN トランスジェニック (Tg) マウス)。MYCN Tg マウスは腹部にある交感神経節 (SMG と呼

ぶ)から神経芽腫を自然発症し、ヒトの病態をよく再現した優れたモデルとなっている。MYCN 遺伝子の増幅に代表される、より悪性度の高い神経芽腫については、現在の大量化学療法(抗がん剤)や放射線治療だけではほとんど救命することができず、効果的な新規治療法の開発が待たれている。その一つの候補は分子標的治療であり、白血病や乳がんなどにおいては目覚ましい効果を上げている。しかしながら、神経芽腫においてはまだ分子標的治療は確立されていない。

## 2. 研究の目的

我々の研究室ではミッドカインという遺伝子を同定し、その機能について解析を行ってきた。その結果、ミッドカインががんと深い関わりを持つことが明らかになっている。ミッドカインは種々のがん細胞から分泌されているが、siRNAを用いてそれを抑えると、がん細胞の増殖が抑制された。つまり、ミッドカインはがん細胞の増殖を促していると考えられる。また、がんを患っていない正常個体の場合、ミッドカインの発現はほとんど胎児の時期に限られる。つまり、誕生後の個体では、がん細胞のみがミッドカインを産生しているため、治療の標的とした場合には正常細胞への悪影響(副作用)はほとんどないと考えられる。ミッドカインは神経芽腫細胞からも分泌されており、その量が多い程、予後が悪くなることがわかっている。また、MYCN Tg マウスを用いた我々の研究から、ミッドカインは神経芽腫の発生前後から進行期に至る全てのステージで発現していること、そしてミッドカイン遺伝子を欠失させたノックアウトマウスでは、神経芽腫の発生頻度と進行速度が遅くなることが明らかになった。これらの結果は、ミッドカインが神経芽腫の発生と進展に関わっており、しかも効果的な治療の標的になり得る可能性を示している。そこでこれらの点について、更なる検討と評価を行うことを本研究の目的とした。

また、ミッドカインの下流で働く因子や、神経芽腫に関与して治療標的になり得るような他の新規因子を同定する目的のもとに、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的な解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 神経芽腫へのミッドカインの関わりを検討する上で、転写因子である MYCN が直接ミッドカインの発現を誘導している可能性を想定し、その検証を行った。まず、ミッドカインのプロモーター領域に MYCN タンパク質が結合しているかどうかをクロマチン免疫沈降アッセイで検討した。また、ミッドカインのプロモーター領域を組み込んだ

レポーターを作成し、MYCN がそのレポーターの発現を誘導するかどうか、また、プロモーター内の MYCN 結合部位に変異を入れた場合に、レポーターの誘導が起こらなくなるかどうかを検討した。

(2) ミッドカインが神経芽腫の分子治療標的になり得るかどうかを検討するために、神経芽腫細胞株におけるミッドカインの発現抑制が細胞増殖へ及ぼす効果を検討した。

(3) マウスを用いて、ミッドカインを標的とした分子治療の効果を検討した。MYCN Tg マウスに生じた神経芽腫腫瘍を摘出・細片化した後に同系統野生型マウスの皮下に移植し、自家移植のモデルを作成した。ミッドカインを標的とする治療としては、抗ミッドカイン抗体を腹腔内に投与することで、血中に分泌されたミッドカインをトラップして受容体との結合を阻害するというストラテジーを取った。また抗ミッドカイン抗体の投与は、副作用を生じない程度の低容量抗がん剤(シスプラチン)投与との併用で行った。

(4) MYCN Tg マウスのサンプルを用いて mRNA 発現の網羅的な解析を行い、新規神経芽腫制御因子の探索を行った。具体的には、ミッドカインの下流で働く因子を同定するために、MYCN Tg マウスのバックグラウンドで、ミッドカイン遺伝子に関して野生型、あるいはノックアウトであるマウスに生じた腫瘍サンプルを用いた。また、神経芽腫の発生に伴う遺伝子発現の変化を検討するために、野生型マウスの正常 SMG(原発巣)と、MYCN Tg マウスの初期腫瘍(部分的にがん細胞を含む2週齢の SMG)を用いた。

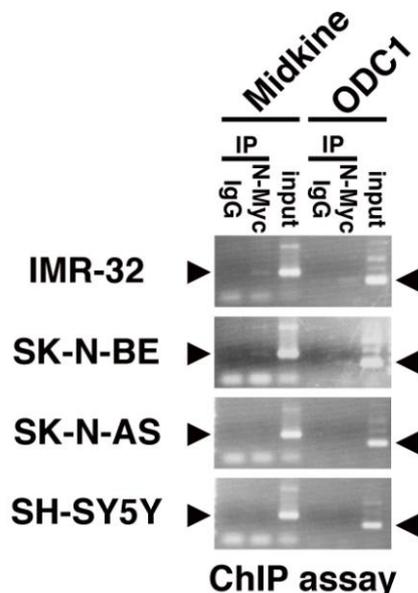


図1 神経芽腫細胞株を用いたクロマチン免疫沈降アッセイ

## 4. 研究成果

(1) 神経芽腫細胞株を用いてクロマチン免

疫沈降アッセイ (ChIP アッセイ) を行った結果、細胞内において MYCN タンパク質はミッドカインのプロモーター領域に結合していた (図 1)。次に、ミッドカインのプロモーター領域を組み込んだレポーターを作成した。MYCN はこのレポーターの発現を誘導したことから、ミッドカインが MYCN の標的遺伝子の一つであることが示唆された。ミッドカインのプロモーター領域には、MYCN の認識配列である E-box が複数存在している。その中で、マウスとヒトとの間で保存されているものは一つだけだったので、その E-box に変異を導入したレポータープラスミドを作製した。MYCN がそのレポーターの発現を誘導できるかどうかを検討したところ、変異型プロモーターは野生型プロモーターと変わらない応答を示した。この結果は、その E-box が責任配列ではないことを示唆している。ミッドカインのプロモーター領域には、それぞれヒトだけ、マウスだけに存在している E-box も存在するため、それらを介してミッドカインの発現が誘導されているものと考えられる。

(2) ミッドカインが神経芽腫の分子治療標的となり得るかどうかを考える上で、ミッドカインの除去が神経芽腫細胞株に及ぼす影響を検討した。神経芽腫細胞株は一般的にトランスフェクションの効率が低いため、レトロウイルスを用いた shRNA の導入によって、ミッドカインの産生を抑制した。その結果、shRNA によってミッドカインの産生が抑制された神経芽腫細胞株 (図 2 の黄と赤) では、コントロールの細胞株 (同青) と比較して増殖能が著しく低下していた。つまり、神経芽

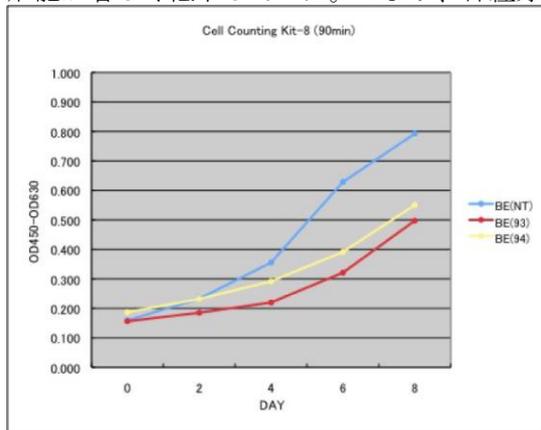


図 2 ミッドカインをノックダウンした神経芽腫細胞株の増殖アッセイ

腫細胞は自らが分泌するミッドカインに依存して増殖を行っていることが示され、この結果は、分子治療の標的としてのミッドカインのポテンシャルを強く支持するものと言える。また、ミッドカインは分泌タンパク質であるため、細胞内のタンパク質よりは標的にし易いという利点があり、これは将来の臨床応用を考える上で大きなメリットと言え

る。(3) マウスを用いた *in vivo* のモデルにおいて、ミッドカインを標的とした治療の効果を検討した。当初は MYCN Tg マウスに自然発生した腫瘍に対して治療実験を行う計画であったが、実験に供する為に条件を揃えたマウスを充分数揃えることが困難であったため、次善の系として、前述の自家移植モデルを用いることとした。自家移植モデルの皮下腫瘍に対してミッドカインを標的とした治療を行ったところ、抗がん剤シスプラチン (図 3 青) や抗ミッドカイン抗体 (同オレンジ) のそれぞれ単独投与治療と比較して、両者の併用治療 (同水色) においては相加的な治療効果 (腫瘍増大の抑制効果) が得られた。

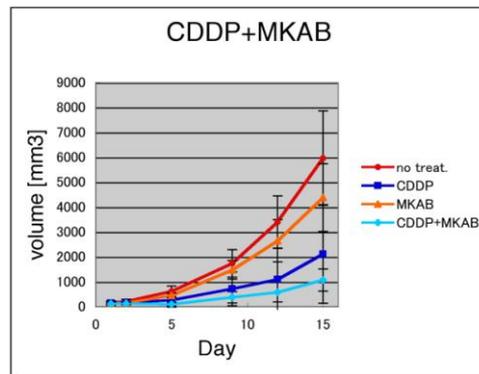


図 3 自家移植モデルを用いた抗ミッドカイン抗体投与による治療実験

(4) MYCN Tg マウスの組織サンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現プロファイルを網羅的に検証することで、ミッドカインの下流で働く因子、及び他の神経芽腫関連因子の同定を目指した。ミッドカイン有無の腫瘍細胞における発現プロファイルを比較することにより、ミッドカインを欠失した腫瘍でのみ発現している新規遺伝子を同定した。神経芽腫細胞株においてミッドカインをノックダウンした場合にも、この遺伝子の発現が上昇したことから、この遺伝子がミッドカインの下流で負に制御されている可能性が強く示唆された。また、神経芽腫の発生に伴って発現が増加する遺伝子 600 余りと、減少する遺伝子 1600 余りを同定した。動物モデルでしか得られない初期腫瘍サンプルを用いた発現解析で同定したこれらの遺伝子群の中には、腫瘍の発生と進展に関わる新規因子が含まれていると考えられる。今後、発現が増加していったいくつかの転写因子をピックアップし、神経芽腫の発生に関与している可能性を検討していく必要がある。最後に、MYCN Tg マウスの hemizygote と homozygote という表現型の異なる遺伝子型について、腫瘍細胞における遺伝子発現プロファイルの点から両者を比較した。遺伝子全

体のパターンで捉えた場合、両者に大きな差は見られなかった。また、ヒトにおいて予後に影響を与えることが報告されている遺伝子群について比較してみたところ、やはり両者間で明確な差はなかった。他のグループからは、染色体異常の点からは、hemizygoteの方がヒトの症例を良く再現していることが報告されているため、モデルとしてはhemizygoteの方が再現性としては良いと考えられる。

#### 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2件)

- (1) Yin, J., Sakamoto, K., Zhang, H., Ito, Z., Imagama, S., Kishida, S., Natori, T., Sawada, M., Matsuyama, Y., and Kadomatsu, K. (2009). Transforming growth factor- $\beta$ 1 upregulates keratan sulfate and chondroitin sulfate biosynthesis in microglia after brain injury. *Brain Res.*, refereed, 1263, 10-22.
- (2) Ikematsu, S., Nakagawara, A., Nakamura, Y., Ohira, M., Shinjo, M., Kishida, S., and Kadomatsu, K. (2008). Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci.*, refereed, 99, 2070-2074.

[学会発表] (計5件)

- (1) 岸田聡, MYCN Tg マウスを用いた CGH 及び発現アレイ解析による神経芽腫発生制御因子の探索., 第25回日本小児がん学会, 2009年11月27日, 東京ベイホテル 東急
- (2) 岸田聡, Genome-wide screen with CGH and gene expression array to identify novel factors involved in murine neuroblastoma model., 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月1日, パシフィコ横浜
- (3) 岸田聡, Midkine, a potent target of MYCN transcription factor, is involved in Neuroblastoma., BMB2008, 2008年12月12日, 神戸ポートアイランド
- (4) 岸田聡, Midkine, a target of MYCN transcription factor, is involved in neuroblastoma development., 第67回日本癌学会学術総会, 2008年10月28日, 名古屋国際会議場
- (5) Satoshi Kishida, Midkine is Involved in the Initiation and Progression of Neuroblastoma., ANR2008, May 21-24, 2008, Makuhari Messe, Chiba, JAPAN

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岸田 聡 (Satoshi Kishida)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 20402563