

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08212

研究課題名(和文) 神経芽腫の自然退縮・分化に関わる新規予後良好分子マーカーの検討と治療応用

研究課題名(英文) Examination of novel prognostic markers related to spontaneous regression and differentiation of neuroblastoma

研究代表者

家原 知子 (Iehara, Tomoko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20285266

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)：神経芽腫患者血清を用いて、低リスクで優位に発現しているmiRNA候補4種に絞りこんだ。神経芽腫細胞株のレチノイン酸を用いた分化モデルにおいて、この候補miRNAが上清およびExosome内に存在することを確認した。神経芽腫細胞株に候補miRNA mimic、miRNA inhibitorを導入し神経芽腫細胞が分化や増殖などの形態変化は見られなかった。分化の指標として、neurofilamentについて測定したところ、候補の1つの遺伝子導入においてneurofilamentが増加し、抑制においてneurofilamentが低下し、このX-miRNAは分化誘導に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫NBの特徴は、予後の多様性にあり、自然退縮するNBのマーカーは知られておらず、これを解明することで、無治療可能な腫瘍の判別が可能となり、新たな治療法の開発に繋がれ、重要な問いとなると考えられる。新たな非侵襲的な診断マーカー、予後マーカーに使えるだけでなく、NBの病態解明、新たな分子標的療法の開発につながることを期待出来る。

研究成果の概要(英文)：Using neuroblastoma patient sera, we found four miRNA candidates that were predominantly expressed at low risk. In a neuroblastoma cell line differentiation model using retinoic acid, we confirmed the presence of this candidate miRNA in the culture supernatant and exosomes. When candidate miRNA mimic and miRNA inhibitor were introduced into neuroblastoma cell lines, morphological changes such as differentiation and proliferation of neuroblastoma cells were not observed. As an indicator of differentiation, neurofilament was measured and transfection of one of the candidates increased neurofilament and repression decreased it, suggesting that this X-miRNA may be related in induction of differentiation.

研究分野：小児がん

キーワード：神経芽腫 分化

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫 NB の特徴は、無治療でも自然退縮し治癒する患者から、転移例、多剤併用療法をもってしても予後不良な患者にまでわたるその多様性にあると考えられる。この多様性は分子生物学的違いによるとされ、すでに MYCN 増幅、11q LOH が強力な予後不良因子として知られているが、これのみで十分リスク分類ができているとは言えず、新たなマーカーが存在すると考えられる。特に、自然退縮する NB のマーカーは知られておらず、これを解明することで、無治療可能な腫瘍の判別が可能となり、新たな治療法の開発に繋がれ、重要な問いとなると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は NB 患者血清 miRNA に注目し、新たな診断予後マーカーの検索、さらにその機能解析を進めていくことである。この実験計画から得られるであろう結果は、新たな非侵襲的な診断マーカー、予後マーカーに使えるだけでなく、NB の病態解明、さらに miRNA の標的遺伝子をターゲットにした新たな分子標的療法の開発につながることを期待出来る。

我々はすでに複数の NB 患者血清を用いた網羅的 miRNA アレイの予備実験(図3)と、神経芽腫細胞株培養上清からの exosome 抽出実験(図4)を行っている。さらに検体数を増やし、腫瘍検体、細胞株を用いたバリデーションを行うことで候補 miRNA を絞り込み、またその機能解析を行うことで NB の病態解明、治療戦略につなげるべく具体的に以下の研究計画をたてた

## 3. 研究の方法

### 1) 神経芽腫患者血清を用いた miRNA アレイデータの解析

高リスクおよび低リスクの神経芽腫患者の初診時血清を用いて、患者リスクと miRNA アレイは 3D-Gene® miRNA Oligo chip を用いた網羅的解析結果を比較検討を行い、候補 miRNA を絞り込む。

### 2) 候補 miRNA のバリデーション

神経芽腫細胞株にレチノイン酸を投与することで分化モデルを作成し細胞内および培養上清から抽出した exosome 内 miRNA の発現量を確認する。

### 3) 神経芽腫細胞株における miRNA の機能解析

神経芽腫細胞株に候補 miRNA の miRNA mimic、miRNA inhibitor を導入、増殖 (WST8 assay)、転移能 (wound-healing assay, invasion assay)、分化 (免疫染色) への影響を確認する。

## 4. 研究成果

神経芽腫は、MYCN などの悪性度のマーカーは知られているが、自然退縮するマーカーは知られていない。本研究の目的は、神経芽腫患者の初診時血清より抽出した miRNA を用いて網羅的に発現解析を行うとともに、神経芽腫細胞株を分化させた exosome から抽出した miRNA との相互解析から、新たな非侵襲的な NB の分化特異的診断及び予後

マーカーを検索することである。さらにその候補 miRNA の機能解析を行うことで新たな治療標的の検討を行い検証する。

当院での神経芽腫患者からの血清 14 検体（低リスク 6 検体、中間リスク 2 検体、高リスク 6 検体）を用いて、miRNA アレイは 3D-Gene miRNA Oligo chip を用い、受託サービスを利用し、低リスクと高リスクで優位に差があり、かつ低リスクで優位に発現している miRNA 候補を絞りこみ、さらに、連結した患者データ（年齢、病理、病期、MYCN 増幅、11q LOH）との比較検討、検証を行い候補 4 種に絞りこんだ。これらの miRNA が神経芽腫の分化退縮のマーカーである場合は、細胞株では低発現が予測され、細胞株にレチノイン酸を投与することで分化を促進して、候補 miRNA の上昇が期待できると考えた。神経芽腫細胞株のレチノイン酸を用いた分化モデルを作成し、分化モデルにおいて、腫瘍細胞および上清において、これらの miRNA がどのような変化を来すかを検証した。その結果、候補 4 種類の miRNA が分化モデルによって、上清中に上昇することを確認した。、分化モデルおよびコントロールの細胞培養の上清を用いて Exosome を回収し miRNA を測定したところ、分化モデル上清中の Exosome 内において候補 4 種類の miRNA が上昇しており、この候補 miRNA が Exosome 内に存在することを確認した。

さらに神経芽腫細胞株に候補 miRNA mimic、miRNA inhibitor を導入し神経芽腫細胞が分化や増殖などの形態変化を来すかについて観察したが、大きな変化は見られなかった。分化の指標として、neurofilament heavy chain と neurofilament middle chain について測定したところ、候補の 1 つの X-miRNA mimic において neurofilament heavy chain が増加し、X-miRNA inhibitor において neurofilament middle chain が低下し、この X-miRNA は分化の誘導に関与している可能性が示唆された。

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
研究分担者	柳生 茂希  (Yagyu Shigeki)  (10572547)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (24303)	
研究分担者	吉田 秀樹  (Yoshida Hideki)  (10643546)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (24303)	
研究分担者	菊地 顕  (Kikuchi Ken)  (40453104)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師    (24303)	
研究分担者	宮地 充  (Miyachi Mituru)  (40584983)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (24303)	
研究分担者	土屋 邦彦  (Tuchiya Kunihiko)  (90381938)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師    (24303)	

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