

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16355

研究課題名(和文) MYCNとEZH2が引き起こすエピゲノム異常による神経芽腫発生機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of neuroblastoma development caused by epigenetic abnormalities induced by MYCN and EZH2

研究代表者

坪田 庄真(Tsubota, Shoma)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10801657

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)：小児がん神経芽腫は、がん遺伝子として知られるMYCNにより引き起こされる。これまで研究代表者は、MYCNとエピゲノム制御因子のEZH2によるがん化機構の解明に向け研究を行ってきた。本研究で、MYCNのMB2ドメインがEZH2と結合するという既報を再現できなかった。しかしMB2ドメインは、MYCNの形質転換能に必須である可能性を示唆するデータを得た。また、MYCNとEZH2がゲノム上のMYCNターゲット遺伝子のプロモーター部位に共局在し新たな遺伝子発現制御機構の存在を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MYCNの過剰発現は神経芽腫を引き起こす原因の1つであるが、その構造的特性から特異的な阻害剤の開発は困難である。そのため、MYCNによるがん化の詳細な機構を解明することで、MYCNそのものではなくMYCNにより引き起こされる異常を標的とした治療薬の開発が可能となる。本研究はその基盤となるMYCNとEZH2の結合が、MYCNによる神経芽腫の発生に必須であるということ調査するものであり、これが達成されればこの結合阻害が新たな治療標的になりうる。

研究成果の概要(英文)：Neuroblastoma is a childhood cancer and caused by MYCN, a well-known oncogene. We have been working to elucidate the mechanism of oncogenesis by MYCN and the epigenomic regulator EZH2. In this study, we could not reproduce the previous report that the MB2 domain of MYCN is bound to EZH2. However, we obtained data suggesting that the MB2 domain may be essential for the transforming ability of MYCN. In addition, MYCN and EZH2 co-localized at the promoter sites of MYCN target genes in the genome, suggesting the existence of a new regulatory mechanism for gene expression by MYCN and EZH2.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：神経芽腫 MYCN EZH2

1. 研究開始当初の背景

成人がんは、分化細胞や組織幹細胞にゲノム異常（点変異や融合遺伝子など）が生じることで発生する（図1）。一方、神経芽腫を含む小児がんではゲノム異常が極端に少なく、その発生機構は謎が多い。神経芽腫は、副腎髄質に存在するクロム親和性細胞と交感神経節を構成する交感神経細胞の共通前駆細胞が発生の起源だと考えられている。発生したがんでは点変異などの遺伝子変異の割合は低いが、染色体レベルでの増幅や欠失が多い。中でも、がん遺伝子 MYCN は約 30%の悪性神経芽腫で遺伝子増幅しており、その発現とがんの悪性度や患者の予後は強く相関する。しかし、転写因子である MYCN に対する特異性の高い阻害剤の開発は難しく、MYCN と合成致死を示す Aurora Kinase A や CDK4/6 などが分子標的治療の候補になっているが、未だ臨床試験中である。一方で、MYCN や ALK、LIN28B などを導入した遺伝子改変マウスが神経芽腫を引き起こすことが報告されているが、神経芽腫の詳細な発生機構は未だよく理解されていない。体細胞点変異など説明可能なゲノム異常が見つかっていない神経芽腫では、正常発生における分化プログラムの異常（≒エピゲノム異常）が神経芽腫発生の引き金になっているのではないかと考えられる（図1）。

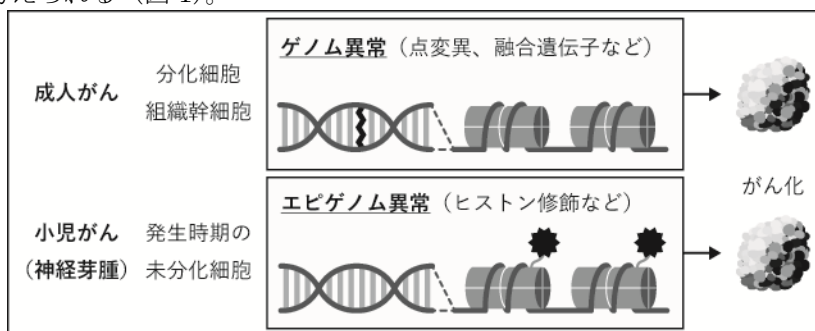


図1 | エピゲノム異常が小児がん（神経芽腫）を引き起こす

2. 研究の目的

申請者は先行研究により、MYCN によるがん化の初期異常として、ゲノム異常ではなく転写状態の変化を見出し報告した（Tsubota et al., Cancer Res. 2017）。特に、MYCN ターゲット遺伝子の発現増加と、PRC2 ターゲット遺伝子の発現低下が顕著であり、MYCN と EZH2 が物理的に結合すること、PRC2 の責任分子である EZH2 が神経芽腫の増殖に必須であることを世界に先駆けて報告した。これらの結果は、MYCN による形質転換に EZH2 との結合が必要不可欠である可能性を示唆している（図2）。本研究課題では、MYCN と EZH2 の結合様式を明らかにし、その結合が神経芽腫の発生や悪性化に必須であるかどうか検証し、この複合体による神経芽腫発生の詳細な機構解明を試みた。

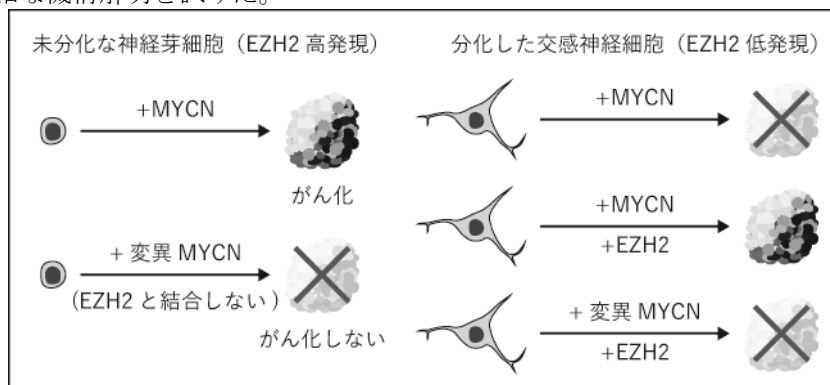


図2 | 作業仮説：MYCN と EZH2 の結合が神経芽腫発生に必須

3. 研究の方法

PRC2 は様々なタンパク質や長鎖非翻訳 RNA などと結合し、その活性やゲノム上での局在が制御されているが、神経芽腫における PRC2 の役割とターゲット遺伝子の発現抑制機構はほとんど分かっていない。PRC2 の責任分子である EZH2 と MYCN の結合は申請者の先行研究で報告した。MYCN と EZH2 の結合を手がかりにして、神経芽腫への EZH2 (を含む PRC2) の寄与とその分子機構を明らかにするため、本研究課題では以下の3つの実験を行った。

実験1 | MYCN の EZH2 結合部位を同定する

MYCN の各ドメインを欠損した変異 MYCN を作成し、MYCN 非増幅の神経芽腫細胞株 SH-SY5Y で強制発現させ、免疫沈降や近接ライゲーションアッセイにより細胞内での EZH2 との結合を調べた。実験 2 | MYCN と EZH2 の結合が MYCN による神経芽腫の発生に必須かどうか
 神経芽腫は、副腎髄質のクロム親和性細胞や交感神経節細胞への分化能を有する前駆細胞（神経芽細胞）から生じる。この未分化な神経芽細胞の時期は EZH2 が高発現していることが分かっており、MYCN による神経芽腫発生には、この環境が必須であると考えられる。すなわち、時期と細胞特異的に実現する MYCN と EZH2 の結合が、MYCN による形質転換（神経芽腫発生）に不可欠なイベントであるという作業仮説を検討した（図 2）。具体的には、MYCN、EZH2 と結合しない変異 MYCN（欠損）、及び EZH2 を過剰発現させるレンチウイルスを準備した。EZH2 が高発現している未分化な神経芽細胞をマウスの生後直後の副腎組織から得た。これら細胞を初代培養し、用意した MYCN と変異 MYCN、EZH2 を過剰発現させるレンチウイルスを感染させ、主に in vitro でのスフェア形成能・細胞増殖能や in vivo での皮下腫瘍形成能を指標として形質転換能の比較を行った。

実験 3 | MYCN と EZH2 の複合体によって発現制御される遺伝子群の網羅的な同定
 先行研究で、PRC2 ターゲット遺伝子の発現低下が発生初期異常として顕著であることを報告したが、どのように PRC2 の制御状態が変化しているかは明らかになっていない。しかし、MYCN と EZH2 が結合しているという事実は、転写因子である MYCN が EZH2 を特定のゲノム領域へリクルートしている可能性を示唆している（図 3）。本実験では、MYCN が増幅している神経芽腫細胞株 KELLY を用意した。網羅的な遺伝子発現解析と併せて、クロマチン免疫沈降シーケンスを用いて MYCN と EZH2 のゲノム上の局在や EZH2 により触媒される抑制性のヒストン修飾マーク (H3K27me3) を解析し、神経芽腫における MYCN や EZH2 ターゲット遺伝子を網羅的に解析した（図 3）。

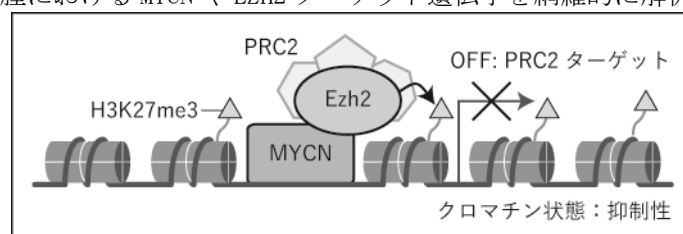


図 3 | MYCN と Ezh2 結合による発現抑制の推定モデル

4. 研究成果

上記 3 つの実験を行い以下の結果を得た。

(1) MYCN の各ドメインを欠損した変異 MYCN を作成し、神経芽腫細胞株 SH-SY5Y で強制発現させ、近接ライゲーションアッセイにより EZH2 との結合を調べた。予想外に、全ての欠損変異 MYCN が EZH2 と結合してしまうという結果となった。最近、MYCN の MB2 ドメインが EZH2 と結合しているとの報告が出たため、MB2 ドメインを欠損した MYCN を用意し同様に検証を行ったが、本手法において再現性は見られなかった。近接ライゲーションアッセイが正しく評価できていない可能性もあるため、別の手法を用いて結合を評価する必要があると考える。免疫沈降法も試してみたが、過剰発現した全長 MYCN と内在性 EZH2 との結合が共沈降により見られなかった。実験方法の最適化など改善すべきポイントがあると考察した。

(2) 結合ドメインが同定されていないが、報告された MYCN の MB2 ドメインを欠損した変異体を用いてマウス副腎由来細胞の形質転換実験を行った。全長 MYCN を導入すると、増殖性のスフェア細胞が形成され、免疫不全マウスの皮下に移植した結果、病理学的に疑いのない神経芽腫が形成した。一方、興味深いことに、MB2 ドメインを欠損した変異体では、スフェア細胞形成が見られず、MYCN によるがん化が著しく抑制された。MB2 ドメインが真に EZH2 との結合に関与していれば、この結合ががん化の鍵となると想定される。

(3) MYCN が増幅している神経芽腫細胞株 KELLY を用いて、EZH2 の ChIP-seq を行い、MYCN やヒストン修飾の ChIP-seq 公共データと統合し、ゲノム上での結合領域を調査した。その結果、予想とは異なり、MYCN が結合しているプロモーター領域で EZH2 が共に結合しており、ターゲット遺伝子の発現を正に制御している可能性が示唆された。EZH2 による発現制御を明らかにするために、EZH2 のノックダウンもしくは阻害剤を用いたときの遺伝子発現変化を CAGE-seq により取得し、現在データ解析中である。

これらの実験を通して、本来の予定とは若干変更があったが、概ね MYCN と EZH2 による発がん機構解明に向け進展しており、引き続き研究を推し進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坪田 庄真、門松 健治
2. 発表標題 EZH2はメチル基転移活性非依存的にMYCN標的遺伝子発現を亢進し神経芽腫細胞の生存を制御する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪田 庄真、門松 健治
2. 発表標題 EZH2はメチル基転移活性非依存的にMYCN標的遺伝子発現を亢進し神経芽腫細胞の生存を制御する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------