

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K17566
研究課題名（和文）神経芽腫の栄養飢餓耐性獲得と抗がん剤耐性獲得機序におけるTFAP2Eの役割の検討

研究課題名（英文）Elucidating the mechanism of resistance to nutrient deprivation and anticancer drugs via TFAP2E in neuroblastoma

研究代表者
長崎 瑛里（NAGASAKI, Eri）
日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：70845354
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに研究代表者らは、神経芽腫においてTFAP2E低発現の患者は予後が悪く、TFAP2Eの発現抑制は抗がん剤耐性を増強させることを報告したが、本研究ではさらに、グルコース欠乏耐性も増強させることがわかり、その機序として神経芽腫細胞が低ATPに対する耐性を獲得している可能性が考えられた。また、TFAP2Eの標的遺伝子の候補としてSUSD2を同定し、SUSD2高発現の神経芽腫患者は予後が悪いことがわかった。SUSD2は他癌腫において抗がん剤耐性に寄与することが報告されていることから、神経芽腫においてTFAP2EがSUSD2を介して抗がん剤耐性を示し、予後の増悪に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫の治療成績は集学的治療の発達により著しく改善したが、進行期の神経芽腫では抗がん剤耐性を示す腫瘍細胞が多く存在する。本研究結果から、TFAP2Eの発現低下は栄養飢餓耐性と抗がん剤耐性の両者に関与することが示唆された。将来的には、TFAP2Eの発現を増強させる脱メチル化剤による治療法や、TFAP2Eの下流にある栄養飢餓耐性/抗がん剤耐性に関与する分子を標的とした新規治療薬開発に発展させ、予後の改善に寄与することが期待できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that depletion of TFAP2E enhanced chemoresistance in neuroblastoma (NB) cells, and that a lower expression TFAP2E level was related to a poor prognosis in patients with NB. In this study, we demonstrated that TFAP2E-depleted NB cells were also resistant to glucose deprivation, and the results of an ATP assay indicated that NB cells acquired resistance to low ATP levels. Furthermore, a microarray analysis showed that the expression of SUSD2 was significantly higher in TFAP2E-depleted NB cells, and a public database analysis showed that the higher expression of SUSD2, which has been reported to confer chemoresistance in other types of cancer, was associated with a poor prognosis in patients with NB. These findings indicated that underexpression of TFAP2E in NB probably promotes chemoresistance through increasing the expression of SUSD2, leading to a poor prognosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経芽腫 栄養飢餓耐性 抗がん剤耐性 TFAP2E

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は胎生期の神経堤細胞に由来する未分化な胎児性腫瘍であり、脳腫瘍を除く小児悪性固形腫瘍で最も高頻度に認められる。治療成績は集学的治療の発達により著しく改善したが、進行期の神経芽腫では抗がん剤耐性を示す腫瘍細胞が多く存在することが明らかになっているため、そのメカニズムの解明と克服が治療成績向上には必須の課題である。

これまでに研究代表者らは、より効果的な治療法を模索していく中で、神経芽腫特異的な DNA メチル化解析から予後規定因子の探索を行い、*transcription factor activator protein-2 epsilon (TFAP2E)* を候補として同定した。public database を用いた Kaplan-Meier 生存分析では、神経芽腫において *TFAP2E* 低発現の患者は高発現の患者に比べ有意に予後が悪い。さらに神経芽腫細胞を用いた実験では、この遺伝子の発現を抑制すると、DNA 損傷後に誘導される細胞のアポトーシスが抑制され、シスプラチン (CDDP) やアドリアマイシン (ADR) などの抗がん剤に対する耐性の増強が観察される¹⁾。しかし、*TFAP2E* がどのように抗がん剤耐性に関与するのか、その詳細な作用機序は不明である。

一方で、近年、がんの悪性化や抗がん剤耐性の原因としてがん微小環境が注目されている。細胞増殖が盛んながん組織には血管新生が追い付かず、がん細胞は局所的に低酸素、低栄養といったストレス環境に晒される。しかしがん細胞は自身の代謝系を変化させることで耐性を獲得し、生存・増殖し続ける。さらにこのようなストレス環境に対する耐性を獲得したがん細胞は同時に化学療法や放射線治療にも耐性を獲得することが知られている。

研究代表者は preliminary data として、*TFAP2E* の発現を抑制した神経芽腫細胞がグルコース欠乏下でも生存率の低下を示さないことを発見した。この結果は、*TFAP2E* の低発現が神経芽腫細胞の栄養飢餓耐性獲得に寄与していることを示唆し、さらに、前述既報告の栄養飢餓耐性と抗がん剤耐性の関係性から、*TFAP2E* の抑制による栄養飢餓耐性の獲得が抗がん剤耐性の増強に関与することが予想された。そこで、栄養飢餓に対する神経芽腫細胞の応答機構を解明すれば、これを標的とした治療法を開発することで、治療成績の向上に寄与できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

TFAP2E の発現抑制により神経芽腫細胞がグルコースを中心とした栄養飢餓耐性と抗がん剤耐性を獲得するメカニズムを解明し、*TFAP2E* やその下流分子が神経芽腫の治療標的となりうるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞生存率の解析

24 well plate に NB1 細胞を 4×10^4 個/well の密度で播種し、24 時間培養した。通常培地またはグルコース不含培地に置換し、Lipofectamine 3000 (Life Technologies) を用いて control siRNA または *TFAP2E* siRNA を細胞に導入した。48 時間後に生存細胞数を Countess II FL 自動セルカウンター (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

(2) 細胞内 ATP 量の検討

96 well plate に NB1 細胞を 10^4 個/well の密度で播種し、24 時間培養した。通常培地またはグルコース不含培地に置換し、siRNA を添加した。48 時間培養後、ATP 測定試薬 (東洋ビーネット) を使用して細胞内 ATP 量を測定した。

(3) マイクロアレイによる *TFAP2E* の標的遺伝子の検索

6 well plate に NB1 細胞を 2×10^5 個/well の密度で播種し、24 時間培養した。siRNA を添加して 48 時間培養後に、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて細胞から total RNA を抽出した。サンプルのクオリティチェックを行った後、cRNA の増幅ラベル化を行った。ハイブリダイゼーションを行い洗浄後、Agilent SureScan Microarray Scanner G4900DA (Agilent Technologies) により蛍光検出を行い蛍光強度を数値化して遺伝子解析を行った。生データを正規化してサンプル間での比較可能な発現値に変換し、発現比 1.5 倍で変動遺伝子を抽出した。

上記のうちサンプルのクオリティチェック以降の行程を DNA Chip Research Inc. (Tokyo, Japan) に委託した。

(4) 候補遺伝子の発現と予後との相関について public database を用いた検討

R2 platform (<http://r2.amc.nl>) から microarray dataset gse16476 を使用し、Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成した。

4. 研究成果

(1) 細胞生存率の解析

TFAP2E の発現を抑制した NB1 細胞はグルコース欠乏下でも生存率の低下を示さなかった (図 1. * $p < 0.05$).

(2) 細胞内 ATP 量の検討

TFAP2E の発現を抑制した NB1 細胞はグルコース欠乏下でも生存率の低下を示さないことから、ミトコンドリア呼吸または解糖系が活性化され ATP が産生されているか、低 ATP に対する耐性を獲得している可能性が考えられた。そこで、グルコース欠乏培地および正常培地における細胞内 ATP 量が *TFAP2E* の発現抑制により変化するか、intracellular ATP 測定キットを用いて解析した。

結果、グルコース欠乏下における *TFAP2E* 発現抑制細胞の ATP 量はコントロール細胞と同程度であり、通常培地における *TFAP2E* 発現抑制細胞やコントロール細胞の ATP 量よりも有意に低かった (図 2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). このことから、*TFAP2E* の発現を抑制した細胞は低 ATP に対する耐性を獲得している可能性を考えた。

(3) マイクロアレイによる *TFAP2E* の標的遺伝子の検索

TFAP2E 発現抑制により発現が変化する遺伝子を絞り込むことを目的にマイクロアレイを用いた網羅的発現解析をおこなった。結果、*TFAP2E* 発現抑制により有意に発現が亢進する遺伝子として *SUSD2*

(*sushi domain containing 2*)と *RHOB* (*ras homolog family member B*)を、*TFAP2E* 発現抑制により有意に発現が低下する遺伝子として *CMTM6* (*CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6*)と *CERK* (*ceramide kinase*)を同定した (表 1)。

一方で、(2)の結果から AMPK pathway に関わる分子にも着目して検討を行った。AMPK は ATP 濃度の低下により活性化され、p53 との相互作用により下流のシグナルを活性化し、細胞増殖の停止を引き起こす。*TFAP2E* の発現抑制下ではこの経路が不活化されている可能性を考えたが、関連分子の有意な発現変化は認めなかった。

表 1: *TFAP2E* の標的遺伝子の候補

Gene Symbol	Gene Name	Corrected p-value	Fold change (<i>TFAP2E</i> siRNA vs Control siRNA)	Regulation (<i>TFAP2E</i> siRNA vs Control siRNA)
<i>SUSD2</i>	<i>sushi domain containing 2</i>	0.033762	2.48	up
<i>RHOB</i>	<i>ras homolog family member B</i>	0.048084	1.67	up
<i>CMTM6</i>	<i>CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6</i>	0.009708	-2.82	down
<i>CERK</i>	<i>ceramide kinase</i>	0.045227	-1.79	down

(4) 候補遺伝子の発現と予後との相関について public database を用いた検討

神経芽腫における *SUSD2* の臨床的意義を検討するため、public database を用いて Kaplan-Meier 生存分析を行った。結果、*SUSD2* 高発現の神経芽腫患者は低発現の患者に比べ予後が悪いことがわかった (図 3)。同様に、*RHOB*、*CMTM6*、*CERK* についても検討したが、期待される発現変化と予後との関連は認めなかった。

(5) 考察

これまでに研究代表者らが報告してきた研究成果と本研究結果から、*TFAP2E* 低発現の神経芽腫患者は高発現の患者に比べ有意に予後が悪く、さらに神経芽腫細胞において *TFAP2E* 発現

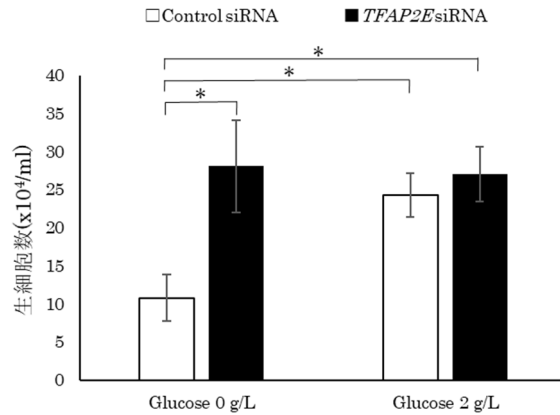


図 1: 細胞生存率の検討

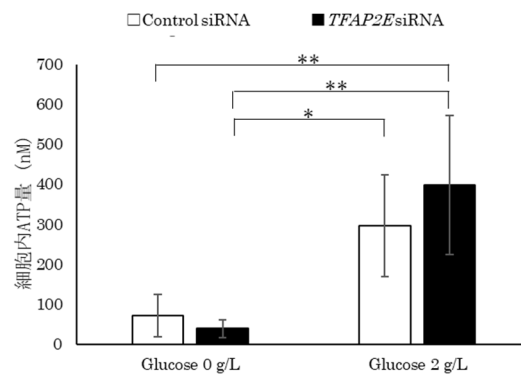


図 2: 細胞内 ATP 量の検討

抑制下では抗がん剤耐性増強とグルコース欠乏耐性増強の両者を示すことがわかった。また *TFAP2E* 発現抑制により有意に発現が亢進する遺伝子として *SUSD2* を同定した。さらに、*SUSD2* 高発現の神経芽腫患者は低発現の患者に比べ予後が悪いことがわかった。

TFAP2E は転写因子である AP-2ε をコードし、多くの臓器や組織の発達・分化において遺伝子発現を調節する。がんに関する既報告では、大腸癌²⁾や胃癌³⁾で *TFAP2E* の高メチル化・低発現がフルオロウラシル耐性との関連を認めており、*TFAP2E* の下流標的としては dickkopf homolog 4 protein をコードする遺伝子 *DKK4* や、transcription factor *E2F-1* (*E2F1*)、mammalian target of rapamycin (*MTOR*)、signal transducer and activator of transcription (*STAT3*)などが報告されている⁴⁾。本研究で *TFAP2E* の標的候補として同定した *SUSD2* は、1型膜タンパク質であり、細胞同士や細胞と基質の接着に重要な役割を有する。腎細胞がんや肺癌においてしばしば低発現であり、がん抑制因子として機能すると報告されている⁵⁾。一方で、*SUSD2* は高悪性度漿液性卵巣がんにおいては転移を促進しシスプラチン耐性に寄与することが報告されている⁶⁾。この既報告と本研究結果から、神経芽腫において *TFAP2E* が *SUSD2* を介して抗がん剤耐性を示し、予後の増悪に關与している可能性が考えられた。

さらに本研究では、*TFAP2E* の発現抑制により神経芽腫細胞がグルコースを中心とした栄養飢餓耐性を示すメカニズムの解明を試み、その機序として低 ATP に対する耐性を獲得している可能性が示唆された。そこで AMPK pathway が不活性化されている可能性を考えたが、関連分子の有意な発現変化は認めなかった。また本研究期間内に、栄養飢餓耐性と抗がん剤耐性の両方の機序に關与する分子は同定できなかった。現在、*SUSD2* がグルコース代謝や低 ATP 耐性に關与しているか解析中である。

がん組織では正常組織とは異なり慢性的な低栄養状態にあることから、栄養飢餓耐性を解除できれば選択的にがん細胞の生存・増殖を阻止できる。この点は、細胞分裂が盛んな性質を利用して抗腫瘍効果を発揮する従来の抗がん剤とは異なるため、副作用が少ない治療法の開発につながりうる。加えて、低酸素や低栄養に耐性を獲得したがん細胞は抗がん剤にも抵抗性を獲得することから、栄養飢餓耐性に關わる分子を標的とした治療により、抗がん剤耐性を克服できる可能性がある。

本研究は現時点では基礎的段階ではあるが、将来的には、*TFAP2E* の発現を増強させる脱メチル化剤による治療法や、*TFAP2E* の下流にある栄養飢餓耐性/抗がん剤耐性に關与する分子を標的とした新規治療薬開発に発展させることが期待できると考えられる。

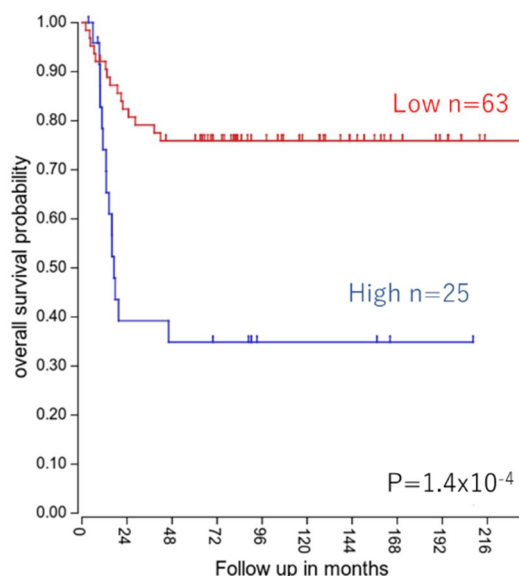


図3：神経芽腫における *SUSD2* の発現と予後との相関

<引用文献>

- 1) Hoshi R, Watanabe Y, Ishizuka Y, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Ohashi K, Sugito K, Fukuda N, Nagase H, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Fujiwara K. Depletion of *TFAP2E* attenuates adriamycin-mediated apoptosis in human neuroblastoma cells. *Oncol Rep.* 2017; 37:2459-2464.
- 2) Ebert MP, Tänzer M, Balluff B, Burgermeister E, Kretzschmar AK, Hughes DJ, Tetzner R, Lofton-Day C, Rosenberg R, Reinacher-Schick AC, Schulmann K, Tannapfel A, Hofheinz R, Röcken C, Keller G, Langer R, Specht K, Porschen R, Stöhlmacher-Williams J, Schuster T, Ströbel P, Schmid RM. *TFAP2E-DKK4* and chemoresistance in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366: 44-53.
- 3) Sun J, Du N, Li J, Zhou J, Tao G, Sun S and He J. Transcription factor AP2ε: A potential predictor of chemoresistance in patients with gastric cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2016; 15: 285-295.
- 4) Jingyue S, Xiao W, Juanmin Z, Wei L, Daoming L, Hong X. *TFAP2E* methylation promotes 5-fluorouracil resistance via exosomal miR-106a-5p and miR-421 in gastric cancer MGC-803 cells. *Mol Med Rep.* 2019; 20: 323-331.
- 5) Cheng Y, Wang X, Wang P, Li T, Hu F, Liu Q, Yang F, Wang J, Xu T, Han W. *SUSD2* is frequently downregulated and functions as a tumor suppressor in RCC and lung cancer. *Tumour Biol.* 2016; 37:9919-9930.

- 6) Xu Y, Miao C, Jin C, Qiu C, Li Y, Sun X, Gao M, Lu N, Kong B. SUSD2 promotes cancer metastasis and confers cisplatin resistance in high grade serous ovarian cancer. *Exp Cell Res.* 2018; 363:160-170.
- 7) Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 966-77.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagasaki Maeoka Eri, Ikeda Kazuhiro, Takayama Ken ichi, Hirano Takayuki, Ishizuka Yoshiaki, Koshinaga Tsugumichi, Tsukune Naoya, Takayama Tadateru, Inoue Satoshi, Fujiwara Kyoko	4. 巻 111
2. 論文標題 Polyethylene glycol derivative 9bw suppresses growth of neuroblastoma cells by inhibiting oxidative phosphorylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2943 ~ 2953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14512	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 長崎 瑛里[前岡], 藤原 恭子, 大日方 大亮, 石橋 直也, 越永 従道, 金田 英秀	4. 巻 8
2. 論文標題 生体における新規ポリエチレングリコール化合物PEG-BIによる抗腫瘍効果の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学部総合医学研究所紀要	6. 最初と最後の頁 31 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaoka Bin, Nagasaki-Maeoka Eri, Uekusa Shota, Hidaka Ayano, Hijikata Kohei, Kato Reona, Fujiwara Kyoko, Koshinaga Tsugumichi, Uehara Shuichiro	4. 巻 37
2. 論文標題 Exosomal miR-214-3p as a potential novel biomarker for rhabdoid tumor of the kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1783-1790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-021-04989-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 上原秀一郎, 長崎瑛里[前岡]	4. 巻 53
2. 論文標題 【小児外科疾患の家族内発生】神経芽腫	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 1296-1298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nagasaki Eri, Ikeda Kazuhiro, Takayama Kenichi, Hirano Takayuki, Ishizuka Yoshiaki, Koshinaga Tsugumichi, Tsukune Naoya, Takayama Tadateru, Inoue Satoshi, Fujiwara Kyoko
2. 発表標題 ポリエチレングリコール誘導体9bwは酸化的リン酸化を阻害して神経芽腫細胞の増殖を抑制する (Polyethylene glycol derivative 9bw suppresses growth of neuroblastoma cells by inhibiting oxidative phosphorylation)
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamaoka Bin, Nagasaki Eri, Uekusa Shota, Hidaka Ayano, Hijikata Kohei, Katoh Reona, Fujiwara Kyoko, Koshinaga Tsugumichi, Uehara Shuichiro
2. 発表標題 腎ラブroid腫瘍エクソソーム由来miR-214-3pのバイオマーカーとしての有用性 (Exosomal miR-214-3p as a potential novel biomarker for rhabdoid tumor of the kidney)
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岡敏, 長崎瑛里, 植草省太, 日高綾乃, 土方浩平, 加藤礼保納, 藤原恭子, 越永従道, 上原秀一郎
2. 発表標題 腎ラブroid腫瘍におけるExosomal miR-214-3pの新規バイオマーカーとしての有用性
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岡敏, 長崎瑛里, 植草省太, 日高綾乃, 土方浩平, 加藤礼保納, 藤原恭子, 越永従道, 上原秀一郎
2. 発表標題 Exosomal miR-214-3pの腎ラブroid腫瘍におけるバイオマーカーとしての可能性
3. 学会等名 第58回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長崎瑛里, 上原秀一郎, 星玲奈, 花田学, 細川崇, 金田英秀, 平井麻衣子, 下澤克宜, 谷ヶ崎博, 越永従道
2. 発表標題 Anaplastic sarcoma of the kidneyの1例 - 第1報: 初期診断と治療の選択について
3. 学会等名 第63回 日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamaoka Bin, Nagasaki-Maeoka Eri, Uekusa Shota, Abe Naoko, Fujiwara Kyoko, Koshinaga Tsugumichi, Uehara Shuichiro
2. 発表標題 NRP1 Knockdown Inhibits The Invasion of Rhabdoid Tumor of the Kidney Cells
3. 学会等名 53rd Congress of the International Society of Paediatric Oncology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岡 敏, 長崎瑛里, 植草省太, 藤田衣里, 阿部奈緒子, 藤原恭子, 越永従道, 上原秀一郎
2. 発表標題 腎ラブroid腫瘍におけるNRP1の治療標的としての可能性
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------