

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591361

研究課題名（和文） 神経芽腫の予後決定因子としての Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質の役割に関する研究

研究課題名（英文） Role of Rab family small G proteins in determining the prognosis of neuroblastoma patients

研究代表者

李 明鎮 (Lee Myeong Jin)

神戸大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：20273766

研究成果の概要（和文）： 神経芽腫は、小児がん死亡の約 1/6 を占める代表的な難治性小児固形がんである。特に、半数以上が再発を経験する高リスク神経芽腫患者は、長期生存率が未だ 40%に達しておらず、その予後改善には、新たな予後因子の同定が必要である。最近、多くのがんで選択的スプライシングの異常が検出され、がんの診断や予後予測のバイオマーカーとして注目されている。申請者らは、細胞内小胞輸送が、神経芽腫の発症・進展に必須の役割を果たすと考え、細胞内小胞輸送の中心的な制御因子である Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rab) に注目している。本研究では、脳特異的な Rab として単離された Rab15 遺伝子が、選択的スプライシングによって少なくとも 4 つのアイソフォームを生成することを明らかにし、Rab15 アイソフォーム・バランスが、神経芽腫におけるがん幹細胞と非がん幹細胞を鑑別するバイオマーカーとなり得る可能性を示した。

研究成果の概要（英文）： Neuroblastoma is an aggressive solid tumor that accounts for approximately 15% of all cancer-related deaths in children. More than half of high-risk neuroblastoma patients are estimated to experience relapses and their overall survival rates remain less than 40%. Identification of a new prognostic factor is essential to improve the prognosis of neuroblastoma patients. Aberrant alternative splicing is intimately associated with an increasing number of cancers, and its use as a new diagnostic and/or prognostic biomarker has attracted considerable attention. In the present study, we identified four alternatively spliced isoforms of Rab15, originally isolated as a brain-specific Rab protein. Rab15 isoform balance correlated with differentiation of neuroblastoma tumor-initiating cells (TICs) and Rab15 alternative splicing may serve as a biomarker to discriminate TICs from non-TICs in neuroblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

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、予後決定因子、Rab15、選択的スプライシング、レチノイン酸、がん幹細胞、

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、小児がん死亡の約 1/6 を占める代表的な小児難治性固形がんであり、特に半数以上が再発する高リスク群の予後改善は現在の小児がん医療における緊急の課題である。自己複製能と多分化能を持ち、その他多くのがん細胞を産み出すがん幹細胞が多くのがんで同定され、がんの再発は、治療によっても残存し潜んでいたがん幹細胞の再活性化と考えられるようになった。

神経芽腫患者は、発症年齢、国際病期分類、MYCN 増幅の有無、病理組織分類、DNA ploidy に基づいて低リスク、中間リスク、高リスク群に分類されており、1p 欠失、11q 欠失、17q 増幅、TrkA 発現等も神経芽腫の予後決定因子として知られている。しかし、神経芽腫の再発するものとしめないものとの違いを決定する因子は、未だ明らかになっていない。ヒト遺伝子は、その 90%以上が発達段階および組織特異的な選択的スプライシングを受けており、がん細胞に特異的なアイソフォームが、多数のがんで検出されることから、選択的スプライシングの異常が、がんの診断や予後予測の新たなバイオマーカーとして注目されている。

Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質(Rab)は、特定の膜ドメインに局在する 60 以上のメンバーから構成され、細胞内小胞輸送の特異性・選択性を制御している。各 Rab のメンバーは、GTP と結合した活性型または GDP と結合した不活性型として存在し、GTP 結合型 Rab は、標的蛋白質(複合体)と特異的に結合してその作用を発揮する。Rab の活性化・不活性化は、GDP/GTP 交換因子(Rab GEF)、GTPase 活性化蛋白質(Rab GAP)、GDP 解離抑制因子(Rab GDI)によって時空間的に制御されており、その破綻は、幾つかのヒト疾患の原因となる。さらに、Rab の活性制御の破綻ががん化やがんの進展に関与する例も明らかになってきた。

申請者らは、Rab による細胞内小胞輸送の制御が神経芽腫の予後決定に重要な役割を果たしているとの仮説を立て、神経芽腫の発症・進展を制御する Rab の同定を試みた。当時、国内外の多くの研究者が、神経芽腫の発症・進展メカニズムの解明を目指して活発に研究を行っていた。多くの研究は、ゲノムおよび遺伝子発現の視点から、健常者と神経芽腫患者、あるいは神経芽腫患者の予後良好群と予後不良群との違いを明らかにしようとしていたのに対して、本研究では、遺伝子産物(蛋白質)の細胞内局在をコントロールする細胞内小胞輸送という新たな視点から、神

経芽腫の予後決定因子の同定を試みた。

## 2. 研究の目的

神経芽腫の新たな予後因子の同定を目指して、神経芽腫の発症・進展に関わる Rab の機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経芽腫細胞の樹立

神戸大学小児科関連病院から神経芽腫症例を広く集める体制を構築し、患者・家族の同意を得て骨髄穿刺液・生検腫瘍組織を収集した。集めた患者検体から、神経芽腫細胞を樹立した。

### (2) 神経芽腫がん幹細胞の単離

高リスク神経芽腫患者から樹立した神経芽腫細胞をスフェアーとして培養し、ヌードマウスに移植すると神経芽腫を形成する神経芽腫がん幹細胞を単離した。

### (3) 神経芽腫細胞における Rab の発現解析

神経芽腫細胞株は、神経系の形質を示す N-type、基質接着性を示す S-type、両者の中間の形質を示す I-type に分けられる。本研究では、神経芽腫がん幹細胞に最も近いと考えられる I-type 神経芽腫細胞株 BE(2)-C 細胞をレチノイン酸処理で N-type へ、BUdR(5-bromo-2'-deoxyuridine)処理で S-type へ分化誘導し、3 種類の BE(2)-C 細胞(未処理、レチノイン酸処理後、BUdR 処理後)における全ての Rab のメンバーの発現をリアルタイム RT-PCR によって定量した。

### (4) 新規 Rab15 アイソフォームの同定

全ての Rab のメンバーの発現解析の過程で、Rab15 の新規アイソフォームを発見した。そこで、BE(2)-C 細胞の cDNA を鋳型として Rab15 の全長 cDNA に対するプライマーを用いて PCR した。得られた cDNA を網羅的に DNA シークエンシングすることによって、Rab15 アイソフォームを同定した。

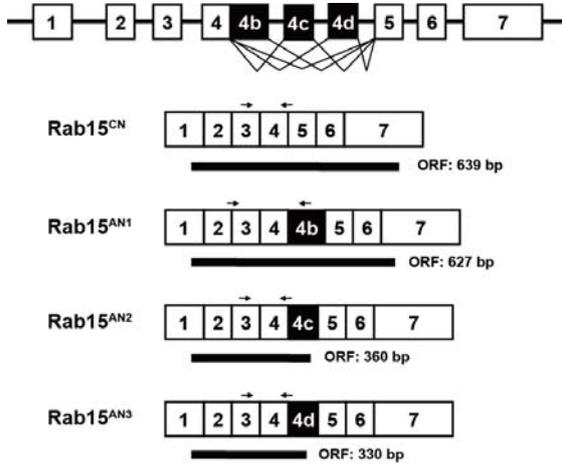
### (5) Rab15 アイソフォーム・バランス

同定した 4 つの Rab15 アイソフォームに特異的なプライマーを用いて、各アイソフォームの発現量をリアルタイム RT-PCR によって定量し、Rab15 アイソフォーム・バランスを計算した。

#### 4. 研究成果

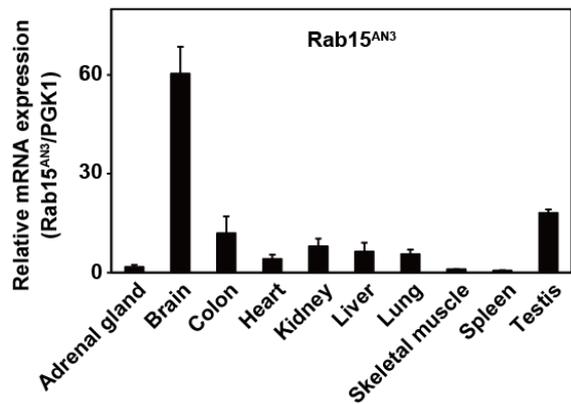
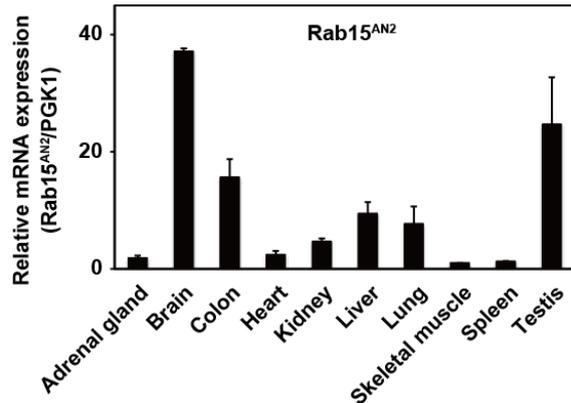
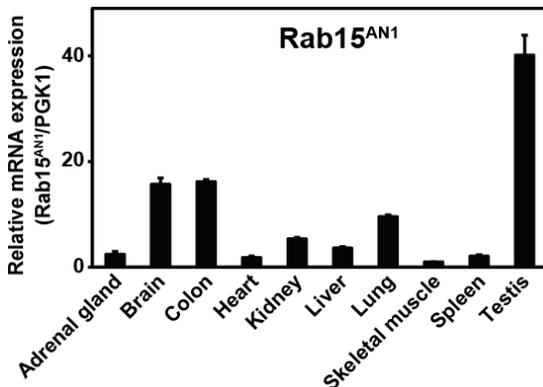
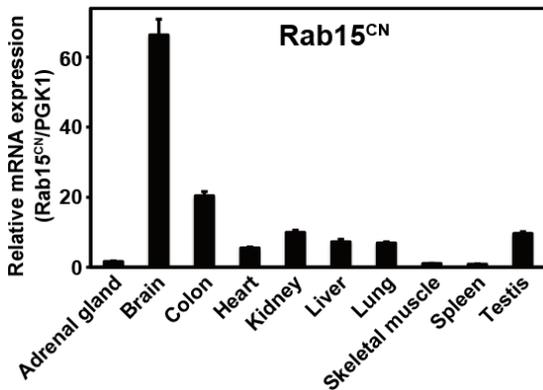
##### (1) 新規 Rab15 アイソフォームの同定

神経芽腫がん細胞において、Rab15 遺伝子の選択的スプライシングによる4つのアイソフォームを同定し、Rab15<sup>CN</sup>、Rab15<sup>AN1</sup>、Rab15<sup>AN2</sup>、Rab15<sup>AN3</sup>と名付けた。



##### (2) Rab15 アイソフォームの組織分布

4つのRab15アイソフォームmRNAは、それぞれ特異的な組織分布を示した。



##### (3) Rab15 アイソフォーム・バランス

4つのRab15アイソフォームmRNAの発現量の比 (Rab15<sup>CN</sup>/Rab15<sup>AN1+AN2+AN3</sup>) を Rab15 アイソフォーム・バランスと定義すると、Rab15 アイソフォーム・バランスは、神経芽腫がん幹細胞では非がん幹細胞に比べて低値を示した。

#### 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3件)

(1) Pham TVH, Hartomo TB, Lee MJ, Hasegawa D, Ishida T, Kawasaki K, Kosaka Y, Yamamoto T, Morikawa S, Yamamoto N, Kubokawa I, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Iijima K, Matsuo M, Nishio H and Nishimura N. Rab15 alternative splicing is altered in spheres of neuroblastoma cells. *Oncol. Rep.* 27: 2045-2049. (2012)

(2) Nishimura N, Hartomo TB, Pham TVH, Lee MJ, Yamamoto T, Morikawa S, Hasegawa D,

Takeda H, Kawasaki K, Kosaka Y, Yamamoto N, Kubokawa I, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Iijima K, Matsuo M, Nishio H. Epigallocatechin gallate inhibits sphere formation of neuroblastoma BE(2)-C cells. *Environ. Health Prev. Med.* 17: 246-251. (2012)

(3) Nishimura N, Pham TVH, Hartomo TB, Lee MJ, Hasegawa D, Takeda H, Kawasaki K, Kosaka Y, Yamamoto T, Morikawa S, Yamamoto N, Kubokawa I, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Nishio H and Matsuo M. Rab15 expression correlates with retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Oncol. Rep.* 26: 145-151. (2011)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

李 明鎮 (Lee Myeong Jin)

神戸大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：20273766

### (2) 研究分担者

西村 範行 (Nishimura Noriyuki)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00322719

### (3) 連携研究者

西尾 久英 (Nishio Hisahide)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80189258