

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 6 月 29 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591376

研究課題名（和文）神経芽腫の予後決定候補遺伝子 *BMCC1* の神経系における機能と神経芽腫における役割研究課題名（英文）Functional role of *BMCC1*, a prognostic factor of neuroblastoma, in nervous system and neuroblastoma

研究代表者

中村 洋子 (NAKAMURA YOYKO)

千葉県がんセンター（研究所）・研究局・主席研究員

研究者番号：60260254

研究成果の概要（和文）：我々が独自に発見した新規遺伝子 *BMCC1* の機能解析を行い、*BMCC1* は神経増殖因子（NGF）の存在下で NGF 受容体の TrkA によりリン酸化され不活性化されること、これが Cdc42 の活性化に繋がり神経細胞の分化に必要なことを明らかにした。本研究で明らかにした知見と以前報告した *BMCC1* が NGF 非存在下で神経細胞死を促進するという知見は、NGF 依存的な神経細胞の分化と細胞死の制御および神経芽腫の自然退縮メカニズムを理解する上で重要である。また、世界で初めて樹立した *BMCC1* 遺伝子欠損マウスは機能解析の強力なツールとなる。

研究成果の概要（英文）：Here, we analyzed the molecular function of *BMCC1*, a novel gene we had identified, and found that *BMCC1* is inactivated by phosphorylation with NGF-activated TrkA. This *BMCC1* suppression resulted in the activation of Cdc42, and subsequently it was essential for differentiation of neuronal cells. In combination with our previous finding that *BMCC1* promoted the NGF-depletion-induced apoptosis of neuronal cells, the findings from this study might be important for understanding the mechanisms of NGF-regulated neuronal cell fate and spontaneous regression of neuroblastoma. Furthermore, we generated a *BMCC1* knockout mouse for the first time in the world. This might become a powerful tool for analyzing *in vivo* function of *BMCC1*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
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、*BMCC1*、神経細胞の増殖と分化、神経細胞死、TrkA、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

小児神経芽腫は、交感神経節や副腎等に生じ

る最も代表的な小児癌の一種である。予後不良症例においては、1番染色体短腕の末端欠失、癌遺伝子 *MYCN* の増幅、17番染色体長腕の付加といった複数のゲノム異常がしばしば認められる。一方で、予後良好症例の中には、遠隔転移しても自然に治癒する場合があり、そのメカニズムに関しては不明であるが、癌という病気の常識を大きく覆す注目すべき現象である。我々は、小児神経芽腫の自然治癒のメカニズムを明らかにすることは神経芽腫の治療法の確立に繋がるだけでなく、その他の癌の治療法の開発においても重要な指標となると考えて研究を進めている。その過程で、我々は神経芽腫の予後良好症例で高発現する新規遺伝子 *BMCC1* を見出した (Machida *et al.*, *Oncogene*, 2006)。*BMCC1* は 350kDa の蛋白質をコードしており、その産物の COOH-末端には BNIP2 や Cdc42GAP と相同性のある BCH ドメインを保持している。BNIP2 は BCH ドメインを介して Bcl-2 等の細胞死抑制因子と結合し細胞死を促進することが知られる。同様に、我々は *BMCC1* も神経成長因子 (NGF) が欠乏することでひきおこされる神経細胞死を促進する因子として働くことを明らかにした (Machida *et al.*, *Oncogene*, 2006)。

2. 研究の目的

BMCC1 は、予後良好な神経芽腫で高発現することや癌細胞の分化・生存性・悪性化への関与が示唆されることから (Machida *et al.*, *Oncogene*, 2006)、神経芽腫の悪性化および自然治癒を規定する非常に重要な因子であると予想した。実際、*BMCC1* は NGF 欠乏依存的な神経細胞死を促進することを見出していた。本研究では、*BMCC1* が NGF レセプターの TrkA 下流シグナルをどのように調節し、神経細胞の増殖、分化および細胞死を制御するかについて *in vitro* と *in vivo* の両面から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

上記予想された *BMCC1* の機能を明らかにする為に以下の三項目を設定し、*in vitro* と *in vivo* の両面から解析を進めた。

(1) BCH ドメインを中心とした *BMCC1* の機能解明 (2) TrkA の結合を介した *BMCC1* によるシグナル伝達経路の制御機構の解明 (3) *BMCC1* ノックアウトマウスの樹立と解析

(1) BCH ドメインを中心とした *BMCC1* の機能解明

BNIP2 の BCH ドメインは Cdc42 との結合に必要であることが知られている。BCH ドメインを介して、*BMCC1* が Cdc42 と結合するかについては、培養細胞抽出液を用いた免疫沈降法および大腸菌で作製した組換え蛋白質を用いたプルダウンアッセイ法にて調べた。また *BMCC1* は、BNIP2 の GTPase 活性に必要な配列「RRLRK」を保持しており、同様に GAP 活性を持つことが予想される。これを検証する為に *BMCC1* (全長および欠失変異体) 過剰発現細胞中の GTPase 活性を測定し、既知の GAP (BNIP2 および Cdc42GAP) と比較した。

(2) TrkA の結合を介した *BMCC1* によるシグナル伝達経路の制御機構の解明

TrkA は、*BMCC1* と同様に、予後良好な神経芽腫で高発現する (Nakagawara *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1993) といった相関がみられた。*BMCC1* と *TrkA* との相互作用について、組換え蛋白質を用いたプルダウンアッセイ法および培養細胞抽出液を用いた免疫沈降法による解析から明らかにした。*TrkA* との結合ドメインの同定は、*BMCC1* の欠失変異体を用いた。*TrkA* と結合すると *BMCC1* はリン酸化されるか、*TrkA* 存在下では予想される *BMCC1* の GAP 活性の低下が生じるかについて HEK293 における共発現系を用いて調べた。NGF によって制御されるシグナル伝達経路に及ぼす *BMCC1* の役割と、その下流で起こる細胞の表現型 (増殖・分化・細胞死) の変化の解析は、PC12 細胞株を使用し、*BMCC1* の過剰発現系とアンチセンス RNA を用いた発現抑制系を用いて行った。

(3) *BMCC1* ノックアウトマウスの樹立と解析

これまでに *BMCC1* のトランスジェニックマウスの SCG (Superior Cervical Ganglia) ニューロンを用いた解析から、*BMCC1* の過剰発現は NGF 除去によって起こる神経細胞死が促進されることを明らかにした (Machida *et al.*, *Oncogene*, 2006)。本研究では、*BMCC1* 遺伝子欠損マウスを樹立し、その表現型の解析から個体レベルでの *BMCC1* の機能解明を目指した。

4. 研究成果

(1) BCH ドメインを中心とした BMCC1 の機能解明

BMCC1 と Cdc42 の相互作用を、それら蛋白質を過剰発現させた HEK293 細胞を用いた免疫沈降法および GST-Cdc42 を用いたプルダウンアッセイ法により確認した。さらに、BMCC1 過剰発現 HEK293 細胞抽出液は BNIP2 および Cdc42GAP 過剰発現細胞抽出液と同様に、Cdc42 に対する強い GAP 活性を示したことから、BMCC1 は BCH ドメイン Cdc42 の GAP として働くことを見出した。次に、BMCC1 は Cdc42GAP と結合することが確認されたことから、これが BMCC1 と Cdc42 との関係に影響を与えるかについて解析した。興味深いことに、BMCC1 の Cdc42 に対する GAP 活性は、同じく BMCC1 の BCH ドメインと相互作用する Cdc42GAP と競合することを発見した。以上、BMCC1 は Cdc42 の不活化を介して NGF による神経分化（神経突起伸長）を負に調節することが示唆された。実際に、BMCC1 は TrkA によってリン酸化されると Cdc42 に対する GAP 活性が低下することも明らかにしており、これは神経細胞の分化において、分化を抑制する BMCC1 の不活化機構であると考えられる。また、本研究で観察された Cdc42 に対する BMCC1 と Cdc42GAP との競合の意義については更に解析の必要があるが、BMCC1 は神経細胞死を促進するのに対して（Machida *et al.*, *Oncogene*, 2006）ユビキタスに発現する Cdc42GAP は細胞死を抑制することが報告されており（Wang *et al.*, *PNAS*, 2006）、この二者の結合および競合が Cdc42 あるいは他のシグナルを制御し、神経細胞の分化のみならず生死も調節している可能性が考えられる。

(2) TrkA の結合を介した BMCC1 によるシグナル伝達経路の制御機構の解明

TrkA と BMCC1 を導入した HEK293 細胞を用いた免疫沈降法による解析から、BMCC1 は NGF 添加によりリン酸化された TrkA と結合すること、結合の結果 BMCC1 がリン酸化を受けることを見出した。これは、項目 (1) に記載したように Cdc42 に対する GAP 活性の低下に繋がる。これは、NGF による神経分化の過程で Cdc42 を不活性化して細胞分化を負に制御する BMCC1 を働かなくする機構と考えられる。次に、BMCC1 の TrkA との結合部位および TrkA によるリン酸化部位について解析を行った。全長および C 末側の欠損変異体 BMCC1 を TrkA

と共に HEK293 細胞にて共発現し、免疫沈降法により調べたところ、TrkA は BCH ドメインではなく C 末端より 850-350 アミノ酸の領域と結合することを見出した。さらに GST-BMCC1 欠損変異体を用いてインビトロキナーゼアッセイを行ったところ、TrkA によるリン酸化サイトが TrkA 結合領域内に 2 カ所存在することを明らかにした。次に、上記のメカニズムを介して BMCC1 が、実際に、NGF-TrkA によって促進される神経細胞の分化を負に制御するかについて解析した。神経分化研究のモデル細胞として知られる PC12 細胞（ラット副腎褐色細胞腫由来）を用いて、BMCC1 の過剰発現およびアンチセンスオリゴによる発現抑制を行い、NGF 添加により誘導される神経分化に及ぼす影響を調べた。その結果、BMCC1 過剰発現細胞では神経突起の伸長が抑制され、BMCC1 発現抑制細胞では神経突起の伸長が促進されることを見出した。すなわち BMCC1 は NGF 依存的な神経細胞の分化を負に制御する因子であることを見出した。以上の結果から、BMCC1 は NGF の存在下では TrkA によりリン酸化され不活化されることが神経細胞の分化に必要なが、BMCC1 は NGF の非存在下では TrkA によるリン酸化を受けないため活性が保持され、自身が持つ細胞死促進能および Cdc42 等のシグナル経路の活性化を通して、神経細胞死を促進するといったスイッチの働きをしていることが示唆された。BMCC1 が細胞分化を抑制するという知見は、NGF 依存的な神経細胞の分化と細胞死の制御機構を知る上で、また神経芽腫の自然退縮メカニズムを解明する上で重要である。

(3) BMCC1 ノックアウトマウスの樹立と解析
マウス BMCC1 遺伝子を欠損させる為、マウスの BMCC1 遺伝子領域を含む Bac クローンを基にターゲットベクターを作成し、129 系統マウス由来の ES 細胞に導入した。ES 細胞は、ベクターに挿入しておいた Neo 耐性遺伝子の発現を指標にスクリーニングした後、細胞から抽出したゲノム DNA を用いた PCR 法およびサザンブロット法にて、BMCC1 遺伝子座がターゲットベクターの配列との組換えが生じて BMCC1 遺伝子が欠損した細胞を選別した。得られた BMCC1^{+/-}ES 細胞をもとに 2 系統の BMCC1^{+/-}キメラマウスを樹立することに成功した。続いて、遺伝的背景が最も明らかとなっている C57BL/6 系統マウスへの戻し交配

を行った。また、*BMCC1* 遺伝子欠損マウスの組織を用いたウエスタンブロット法による解析から、*BMCC1* の発現が *BMCC1*+/-マウスで減弱し *BMCC1*-/-マウスで消滅していることを確認した。表現型の解析は現在進行中であり興味深いデータを蓄積中である。*BMCC1* 遺伝子欠損マウスの樹立は世界最初であり、今後、神経発生および神経芽腫の形成における *BMCC1* の機能を *in vivo* 解析より明らかにする上で有効な手段となる。

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 4 件)

1. Isogai E, Ohira M, Ozaki T, Oba S, Nakamura Y, Nakagawara A. Oncogenic LMO3 collaborates with HEN2 to enhance neuroblastoma cell growth through transactivation of Mash1. PLoS One. 2011 May 5;6(5):e19297. 査読有 DOI:10.1038/onc.2010.383;
2. Hishiki T, Saito T, Terui K, Sato Y, Takenouchi A, Yahata E, Ono S, Nakagawara A, Kamiyo T, Nakamura Y, Matsunaga T, Yoshida H. Reevaluation of *trkA* expression as a biological marker of neuroblastoma by high-sensitivity expression analysis--a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute. J. Pediatr. Surg. 45:2293-2298. 2010. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2010.08.021>,
3. Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A. LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 392:252-257, 2010. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.010>,
4. Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y, Ozaki T, Isogai E, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, Nakagawara A. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. Int. J. **Oncol.** 34:931-938, 2009. 査読有 DOI: 10.3892/ijo_00000219

[学会発表] (計 11 件)

1. 巽 康年、高野 良、中村 洋子、植田 健、中川原 章・前立腺がん細胞においてノンコーディングRNAの*DD3*はアポトーシス促進因子 *BMCC1* の発現抑制を介して細胞増殖を促進する・第 70 回日本癌学会学術総会・2011 年 10 月 5 日・名古屋
2. Yohko Nakamura, Akiko Suganami, Yutaka Tamura, Tyuji Hoshino, Mayu Fukuda, Hiroki Nagase, Akira Nakagawara, I Screening and identification of the novel small chemical compounds targeting TrkB by using IBM-World Community Grid imaging. 第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会・2011 年 6 月 23 日・東京
3. 巽 康年、横山 智彰、高野 良、大平 美紀、中川原 章・新規アポトーシス促進因子 *BMCC1* 遺伝子座中にコードされる *DD3* 遺伝子の神経芽腫悪性化における意義・第 26 回日本小児がん学会・2010 年 12 月 18 日・大阪
4. 巽 康年、横山 智彰、高野 良、大平 美紀、中村 洋子、植田 健、中川原 章・前立腺がんにおいて large non-coding RNA の *DD3* は *BMCC1* の発現を抑制し細胞の生存を促進する・第 69 回日本癌学会学術総会・2010 年 9 月 23 日・大阪
5. 巽 康年、横山 智彰、ウー ミヤット リン、高野 良、高木 大輔、大平 美紀、中川原 章・*DD3*, a large non-coding RNA against the pro-apoptotic *BMCC1* gene, is a candidate target for treating neuroblastoma. Advanced in Neuroblastoma Research 2010・2010 年 6 月 22 日・スウェーデン・ストックホルム
6. 巽 康年、横山 智彰、高野 良、植田 健、丸岡 正幸、伊丹 真紀子、好田 忠行、大平 美紀、中川原 章・前立腺がんにおける *DD3* による新規がん抑制候補遺伝子 *BMCC1* の制御機構・第 68 回日本癌学会学術総会・2009 年 10 月 1 日・横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 洋子 (NAKAMURA YOHKO)
千葉県がんセンター (研究所)・研究局・
主席研究員
研究者番号：60260254

(2)研究分担者

巽 康年 (TATSUMI YASUTOSHI)
千葉県がんセンター (研究所)・研究局・
研究員
研究者番号：00450578

(3)連携研究者

中川原 章 (NAKAGAWARA AKIRA)
千葉県がんセンター (研究所)・
センター長
研究者番号：21390317