

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08610

研究課題名（和文）NCYMによる分裂期制御機構とその神経芽腫がんへの寄与の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of mitotic regulation by NCYM and its contribution to neuroblastoma tumorigenesis

研究代表者

末永 雄介（Suenaga, Yusuke）

千葉県がんセンター（研究所）・がんゲノムセンター 進化腫瘍学研究室・室長

研究者番号：80581793

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）：MYCNのアンチセンス遺伝子であるNCYMは神経芽腫において遠隔転移を促進するなど悪性化に寄与する。このNCYMによるがん進展への寄与は分裂期における細胞死抑制が関与するが、その詳細な分子機構は解明されていなかった。本研究において我々は構造科学的解析により、NCYMの分裂期制御に重要なMyc-nick産生能には52番目のアスパラギン残基が重要であることを解明した。またトランスクリプトーム解析からNCYMが分裂期関連遺伝子の翻訳効率をグローバルに促進する可能性を示し、NCYM阻害剤添加によるホログラフィック顕微鏡による観察からNCYMが未知の細胞死様式を制御することが発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NCYMの分裂期制御機構の一端が明らかにされたことで、NCYMがなぜ神経芽腫のがん進展を促進できるのかについての理解が深まった。またNCYM阻害剤が同定されたことで、この阻害剤が神経芽腫における新規薬剤候補となる可能性が浮上した。今後、本研究で同定された未知の細胞死様式が解明されることで、これまでのがん治療とは全く作用機序が異なる治療法が開発できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：NCYM, an antisense gene of MYCN, contributes to tumor progression by promoting distant metastasis in neuroblastoma. The contribution of NCYM to tumor progression involves inhibition of cell death during mitosis, but the detailed molecular mechanism has not been elucidated. In this study, we found that the 52nd asparagine residue is important for the production of Myc-nick, which is important for mitotic regulation by NCYM. Transcriptome analysis showed that NCYM globally promote the translational efficiency of mitosis-related genes, and holographic microscopy with the treatment of NCYM inhibitors revealed that NCYM regulates an unknown type of mitotic cell death.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：神経芽腫 NCYM MYCN 分裂期 細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) NCYM は神経芽腫を悪性化する

神経芽腫は小児固形腫瘍であり、がん遺伝子 *MYCN* が増幅し過剰発現する。*MYCN* 増幅を伴う神経芽腫は高頻度で再発・遠隔転移を起し、その長期生存率は 50% 程度である。*MYCN* を交感神経節に特異的に過剰発現するマウス (*MYCN* Tg マウス) は神経芽腫を自然発症するマウスモデルであるが (Wiess et al., EMBO J 1997)、遠隔転移は稀でありヒトの病態を反映しない。研究代表者らは NCYM がヒトでのみタンパク質をコードすることを示し、この NCYM タンパク質は GSK3 β の抑制を介して *MYCN* を安定化することを発見した (Suenaga et al., PLoS Genet. 2014)。また *MYCN*/NCYM Tg マウスを作製し、転移能や薬剤耐性を示す神経芽腫を発症することを示した。*MYCN*/NCYM Tg マウス由来の腫瘍ではアポトーシスが著しく抑制されていたことから、アポトーシスの抑制が神経芽腫悪性化の一因であることが示唆された。

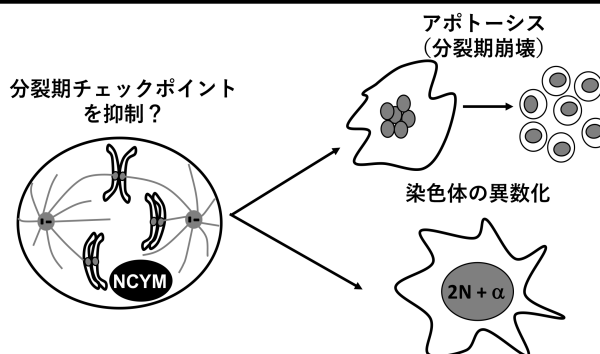
(2) 分裂期における NCYM の MYC/MYCN 制御: Myc-nick の産生と GSK3 β の抑制

NCYM ノックダウンによるアポトーシス促進が細胞周期のどこで起こるかを神経芽腫細胞株で調べたところ、G2/M 期において最も顕著なアポトーシスが誘導された (Shoji et al., BBRC 2015)。また NCYM は MYC や *MYCN* のカルパインによる切断を促進し、微小管の安定化に寄与する Myc-nick 産生を増加させることを発見した。これらの結果は NCYM が微小管の安定性を制御して紡錘糸の安定性に寄与する可能性を示していた。さらに最近、GSK3 β の活性が分裂期チェックポイント因子のキネトコアへの結合に必須であることが示された (Rahid et al., Sci Rep. 2018)。しかし、NCYM による Myc-nick 産生や GSK3 β の抑制が分裂期チェックポイントを制御するかは明らかになっていない。

(3) NCYM 抑制による染色体異数化

そこで分裂期制御が最も研究されている HeLa 細胞を用いて、分裂期における NCYM タンパク質の局在を調べた。その結果、分裂期において NCYM は紡錘糸、中心体、中央帯に局在し、微小管との結合が示唆された。また NCYM ノックダウンにより中心体数の増加と染色体の異数化が誘導された。この現象は mitotic slippage と呼ばれ、分裂期チェックポイントが活性化された後に未熟な有糸分裂の終了が誘導され、染色体異数性を持つ細胞が生き残る現象である。この mitotic slippage は分裂期崩壊 (mitotic catastrophe) と相互排他的に起こることが知られている。これらの結果から神経芽腫における NCYM のアポトーシス抑制は分裂期チェックポイントの抑制による可能性を着想した (図)。

NCYMはどのように分裂期における細胞死や染色体異数化を抑制するのか？



2. 研究の目的

そこで本研究の目的を「NCYM がどのように分裂期における細胞死と染色体異数化を抑制するのかを明らかにすること」に設定した。

3. 研究の方法

(1) 構造科学的な手法による NCYM 機能ドメインの同定

NCYM はヒトにのみ存在するタンパク質であり既知のタンパク質と全く相同性がないことが機能予測を困難にしていた。さらに天然変性タンパク質であり、結晶化も困難であった。そこで我々は溶液中の NCYM 構造を解析できる真空紫外円二色性解析 (VUVCD) を採用し、NCYM による Myc-nick 産性能に影響を与える配列の同定を試みた。

(2) CRISPR-dCAS9 法による MYCN/NCYM 転写阻害による細胞死誘導と RNAseq 解析

研究代表者はこれまで神経芽腫における *MYCN*/NCYM ゲノム領域の転写制御を研究し、*MYCN* および *OCT4* が *MYCN*/NCYM の転写を促進して正のフィードバック制御を形成することを示してきた (Suenaga et al., BBRC 2009; PLoS Genetics 2014; Kaneko et al., Cancer Sci 2015)。この多重フィードバック制御機構の意義を調べる目的で、*MYCN*/NCYM 領域における *MYCN*、*OCT4* の

結合配列を標的にした gRNA を設計し、これら転写因子の結合を阻害する CRISPR-dCAS9 ベクターを神経芽腫細胞に導入した。その結果、これら結合配列の阻害により、p53 ファミリー遺伝子の発現が上昇し、Caspase-2 依存的なアポトーシスが誘導がされた。中心体の多極化とそれに伴う分裂期崩壊は DNA 損傷を介さずに p53-Caspase-2 経路を活性化することが知られている。実際に MYCN/OCT4 の結合阻害により分裂期に上昇するリン酸化 Cyclin B 発現量が亢進していた。これらの結果から MYCN/NCYM/OCT4 のフィードバック機構の阻害が分裂期崩壊を誘導する可能性が示唆されたため、この実験系を用いて RNAseq 解析により細胞内経路を探索した。

(3) NCYM 阻害剤を用いた分裂期に關与する細胞内経路の探索と細胞死のリアルタイム観察

我々は最近 NCYM に直接結合し分裂期において細胞死を誘導する薬剤としてクルクミン誘導体を同定した (未発表)。この阻害剤の添加による発現量変化を RNAseq により解析するとともに、ホログラフィック顕微鏡により細胞死をリアルタイム観察した。

4. 研究成果

(1) NCYM の Myc-nick 産性能を制御するアミノ酸 N52 の同定

シンクロトロンによる VUVCD により NCYM の二次構造を世界で初めて明らかにすることができた。NCYM の二次構造は中央に集積しドメインを形成しており、この中央ドメイン構造には非同義置換変異を伴う一塩基多型 (SNP) が複数存在していた。これら SNP は東アジアや日本に特異的に存在し、アフリカやヨーロッパではほとんど見られない。その SNP の一つ N52S 変異を持つ NCYM を神経芽腫細胞に過剰発現させると、NCYM による Myc-nick 産生が増加した。分裂期において NCYM が Myc-nick を産生し細胞死を抑制する機能を発揮するためにこの N52 は重要な働きを持つことが示唆された。この成果は論文としてまとめ、国際誌に報告した (Matsuo et al., Front Oncol 2021)。

(2) 分裂期関連遺伝子のグローバルな転写・翻訳制御の発見

OCT4 結合を阻害する CRISPR-dCAS9 を MYCN/NCYM 増幅神経芽腫 (CHP134 および IMR32) に導入し、細胞から RNA を抽出して RNA-seq により発現変動する細胞内経路を Gene ontology 解析により同定したところ、RNA processing, splicing, 分裂期関連遺伝子が有意に蓄積していた。また翻訳効率と相関する指標である ORF ドミナンスを計算したところ (Suenaga et al., EMBO Rep. 2022)、ORF ドミナンスの高い転写産物が coding, noncoding RNA 共に低下しており、細胞内で MYCN/NCYM が ORF ドミナンスの高い転写産物の発現を維持することが示された。さらに、これら ORF ドミナンスの高い転写産物群は神経芽腫の不良な予後と有意に関連した。これらの結果は MYCN/NCYM が分裂期関連遺伝子の翻訳効率をグローバルに制御することで、神経芽腫の悪性化に寄与する可能性を示唆した。これらの成果は論文としてまとめ、国際誌に報告した (Nakatani et al., Front Oncol 2024)。

(3) アポトーシス誘導に必須な経路としての JNK 経路と未知の細胞死様式の発見

クルクミン誘導体を添加した神経芽腫細胞における RNAseq 解析の結果、JNK 下流の転写因子が活性化していることが示唆された。実際に JNK 阻害剤によりクルクミン誘導体による Caspase-3 活性化が抑制された。しかし JNK 阻害剤によっては完全には細胞死が抑制されなかったため、ホログラフィック顕微鏡を用いて非染色のリアルタイム観察を行った。その結果、クルクミン誘導体の添加は分裂期後期 A における細胞周期停止を誘導し染色体の両極への移動が阻害された状態が継続し最終的に細胞が破裂する現象が観察された。このような細胞死は NCYM に結合しないクルクミン誘導体では観察されなかった。破裂型の細胞死としてはネクローシスが知られているが、特定の分子によるネクローシス様プログラム細胞死としてネクロトーシスやパイロトーシスが知られている。本研究で発見された細胞死も破裂型であるためネクローシス様であり NCYM が関与するためプログラム細胞死と考えられるが、分裂期後期 A で破裂が起こる点がこれまで知られている細胞死とは全く異なる。したがって NCYM はこの未知の細胞死を抑制することで細胞生存に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuo T, Nakatani K, Setoguchi T, Matsuo K, Tamada T, Suenaga Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Secondary Structure of Human De Novo Evolved Gene Product NCYM Analyzed by Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 688852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2021.688852	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 該当する

1. 著者名 Nakatani Kazuma, Kogashi Hiroyuki, Miyamoto Takanori, Setoguchi Taiki, Sakuma Tetsushi, Kugou Kazuto, Hasegawa Yoshinori, Yamamoto Takashi, Hippo Yoshitaka, Suenaga Yusuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Inhibition of OCT4 binding at the MYCN locus induces neuroblastoma cell death accompanied by downregulation of transcripts with high-open reading frame dominance	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1237378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2024.1237378	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10件（うち招待講演 5件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 K Nakatani, T Matsuo, K Mastuo, T Tamada, Y Suenaga
2. 発表標題 Identification of amino acid residues that modulate NCYM function using protein perdeuteration.
3. 学会等名 第81回日本がん学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K Nakatani, T Sakuma, T Yamamoto, Y Hippo, Y Suenaga
2. 発表標題 CRISPR-dCas9-based inhibition of OCT4 binding at the MYCN locus induces neuroblastoma cell death.
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K Nakatani, H Kogashi, T Sakuma, T Yamamoto, Y Hippo, Y Suenaga
2. 発表標題 CRISPR-dCas9-based inhibition of OCT4 binding at the MYCN locus induces neuroblastoma cell death accompanied by the downregulation of RNA translational efficiency.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Nakatani, T. Sakuma, T. Yamamoto, Y. Hippo, Y. Suenaga
2. 発表標題 CRISPR-dCas9-based transcription factor blockage at the MYCN locus induces caspase 2-mediated neuroblastoma cell death
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Nakatani, T. Matsuo, K. Matsuo, T. Tamada, T. Sakuma, T. Yamamoto, Y. Hippo, Y. Suenaga
2. 発表標題 Proof of concept for therapeutic targeting of the MYCN/NCYM positive feedback regulation in the neuroblastoma
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)、2021年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Nakatani
2. 発表標題 Functional and structural characterization of de novo evolved protein NCYM
3. 学会等名 Invited talk in Centre de Biologie Structurale de Montpellier (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Suenaga
2. 発表標題 Functional and structural characterization of de novo evolved proteins
3. 学会等名 Seminaire Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusuke Suenaga
2. 発表標題 Discovery of NCYM and recent role in carcinogenesis
3. 学会等名 The 8th International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences and the 14th Annual Conference of the Indonesian Society for Cancer Chemoprevention (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Suenaga
2. 発表標題 Targeting de novo gene NCYM for cancer therapy
3. 学会等名 The Society for Molecular Biology and Evolution Satellite Meeting on De Novo Gene Birth (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 未永雄介
2. 発表標題 がん進化におけるORFドミナンスの変動と遺伝子誕生
3. 学会等名 第208回NIH金曜会セミナー (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Suenaga Y., Einvik C., Takatori A., Zhu Y.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Frontiers Media SA.	5. 総ページ数 159
3. 書名 Molecular Mechanisms and Treatment of MYCN-driven Tumors	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究室HP https://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/departments/et.html</p> <p>Researchmap https://researchmap.jp/y_suenaga</p> <p>種の進化と遺伝子進化を統合する新たな概念を提唱！ https://www.amed.go.jp/news/release_20220420.html</p>

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	安藤 清宏 (Ando Kiyohiro) (10455389)	地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター (臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・副部長 (82402)	
研究分担者	筆宝 義隆 (Hippo Yoshitaka) (30359632)	千葉県がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・研究所長 (82504)	

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