

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31日現在

機関番号：12602  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22790309  
 研究課題名（和文） 神経芽腫における腫瘍自然退縮の分子メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of the spontaneous regression of neuroblastoma  
 研究代表者  
 井上 純（INOUE JUN）  
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教  
 研究者番号：50568326

研究成果の概要（和文）：

神経芽腫（Neuroblastoma; NB）の自然退縮に関する詳細な分子機構は不明である。これまで私は、LAPTM5 遺伝子産物の蓄積により誘導される細胞死（LAPTM5 誘導性細胞死）が NB の自然退縮に関与することを示してきた。そして、本研究課題により、LAPTM5 遺伝子の転写およびタンパク質レベルでの量的制御機構の一端が明らかとなり、その脱制御が LAPTM5 遺伝子産物の蓄積および細胞死誘導に繋がる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

It is unknown for the molecular mechanism of spontaneous regression of neuroblastoma (NB). I have previously demonstrated that the cell death mediated by accumulation of LAPTM5 (lysosomal-associated protein multispansing membrane 5) protein was closely associated with tumor regression of NBs. With the support of this grant, I clarified the mechanism of transcriptional and post-translational regulation for the expression, and suggested that the dysregulation of its mechanism may LAPTM5-mediated cell death in NB cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1600000	480000	2080000
2011 年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：神経芽腫、自然退縮、細胞死、タンパク質分解、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

癌には、無治療でも腫瘍が自然退縮するものがある。この「腫瘍の自然退縮現象」が高頻度に起こる癌として、神経芽腫

(Neuroblastoma; NB) が知られている。NB は未分化神経堤細胞に由来し、腹部交感神経節や副腎髄質に発生する小児固形癌である。1才未満で発見される NB は、組織学的に細

胞死・分化傾向が認められ、腫瘍が高頻度に自然退縮する。一方、1才以上で発見される予後不良 NB は自然退縮することなく、約半数の患児は幼い命を落とす。従って、自然退縮の分子メカニズムを解明することは、予後不良 NB に対して、本来備わっていた腫瘍退縮プログラムに基づく、治療的な腫瘍退縮法の確立に繋がると期待される。

これまで我々は、細胞内小胞に局在する LAPT M5 (Lysosomal-associated protein multispinning membrane 5) 遺伝子が、NB 細胞では発現低下している一方、予後良好 NB の腫瘍組織内の組織学的に退縮を示す部位では、LAPT M5 陽性小胞が顕著に蓄積していることを見出してきた。さらに、NB 細胞株への強制発現により、LAPT M5 陽性小胞を人為的に蓄積させると、リソソーム不安定化に起因する細胞死 (非アポトーシス性) が誘導されることから、LAPT M5 誘導性細胞死 (LAPT M5-mediated cell death; LMD) が、NB の自然退縮に深く関与することを示唆してきた。

しかしながら、この LMD における生理的機序は全く不明であった。推測として、LAPT M5 遺伝子の発現は、転写およびタンパク質レベルで量的制御されており、その脱制御が LAPT M5 陽性小胞の蓄積を介した細胞死の誘導に寄与すると考えられた。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究課題では、以下の2つの項目について明らかにすることで、LMD の生理的機序を解明することを目的とした。

(1) LAPT M5 遺伝子の転写を活性化する細胞環境を特定し、その転写制御の分子メカニズムを明らかにする。

(2) LAPT M5 遺伝子のタンパク質レベルでの量的制御機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) LAPT M5 遺伝子の転写制御機構の解明

① LAPT M5 遺伝子の転写が活性化される細胞環境の特定

LAPT M5 誘導性細胞死と神経変性疾患での神経細胞死の特性が類似していたことに着目し、神経変性疾患の神経細胞死への関与が指摘されている細胞ストレス (酸化ストレス、ミトコンドリアストレス、神経毒など) や栄養ストレスを与えた培養 NB 細胞株にお

いて、LAPT M5 遺伝子の転写が活性化するかを定量的 RT-PCR 法で検討した。また、LAPT M5 は NB 組織中の分化 NB 細胞で発現することから、培養 NB 細胞株において、レチノイン酸または神経成長因子 (NGF) 処理により神経分化誘導させた際、LAPT M5 遺伝子の転写レベルの変化も同様に検討した。

(2) LAPT M5 のタンパク質レベルでの量的制御機構の解明

① ユビキチン化による量的制御

これまで我々は、プロテアソーム分解系を阻害すると、LAPT M5 タンパク質が顕著に蓄積することから、LAPT M5 タンパク質の量的制御において、ユビキチン化による修飾が関与することを既に見出していた。また、LAPT M5 は、HECT-type E3 リガーゼとの結合親和性に寄与する PPxY モチーフを保持していること、さらに、HECT-type E3 リガーゼである ITCH の発現は、甲状腺癌の癌遺伝子候補であること同定してきた。以上の背景のもと、本研究において、免疫沈降-ウエスタン解析、*in vitro* および *in vivo* ユビキチン化アッセイ等により、LAPT M5 は ITCH によるユビキチン化を介したタンパク質分解の基質である可能性を検証した。

② 微小管・オートファジー関連分子による LAPT M5 陽性小胞の輸送制御

Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3 ; LC3) 分子は、オートファジーによるタンパク質分解に関与する。その一方で、LC3 分子は、細胞内の微小管ダイナミックスの制御にも関与することも知られている。そして、細胞内小胞は、微小管に沿って輸送されるため、微小管ダイナミックスの脱制御は、細胞内小胞輸送の障害に繋がる。そこで、本研究では、LC3 分子の発現状態が LAPT M5 陽性小胞の蓄積・量的制御に寄与する可能性を細胞染色等により検討した。

## 4. 研究成果

(1) LAPT M5 遺伝子の転写制御機構の解明

① LAPT M5 遺伝子の転写が活性化される細胞環境の特定

神経芽腫由来細胞株 IMR32、SH-SY5Y および GOTO 細胞において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MPP<sup>+</sup>処理、または栄養飢餓による細胞ストレスを与え

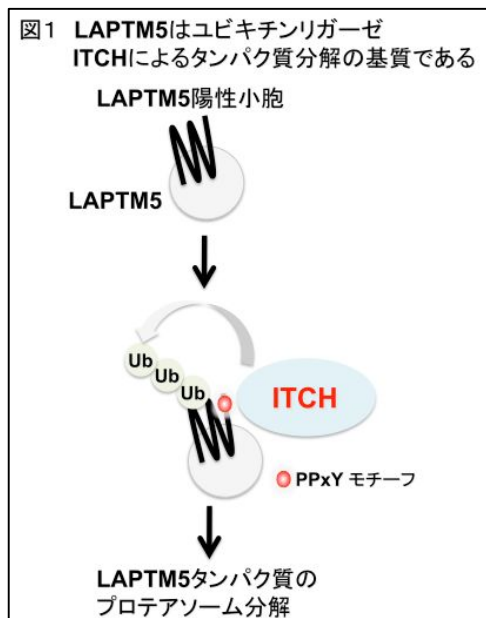
ると、LAPTM5 遺伝子の転写レベルが顕著に増加することが分かった。また、IMR32 細胞におけるレチノイン酸処理、あるいは、PC12 細胞（ラット褐色細胞腫細胞株）における NGF 処理により、神経分化誘導刺激を与えると、LAPTM5 遺伝子の転写レベルが顕著に増加することが明らかとなった。

このように、NB 細胞において、細胞ストレスおよび神経分化誘導時に LAPTM5 遺伝子の転写は活性化されることを特定した。

## (2) LAPTM5 遺伝子のタンパク質レベルの量的制御機構の解析

### ①ユビキチン化を介したタンパク質分解による量的制御

免疫沈降-ウェスタン解析にて、LAPTM5 と ITCH の相互作用を検討した結果、ITCH はその第 1 および第 3 WW ドメイン（ITCH は第 1～4 まで 4 つの WW ドメインを持つ）を介して、LAPTM5 タンパク質 C 末端に存在する PPxY モチーフに結合することが分かった。さらに、ITCH の発現は、LAPTM5 のモノユビキチン化・ポリユビキチン化修飾を触媒すること、および LAPTM5 のタンパク質を負に量的制御することを明らかにした。また、ITCH の発現抑制は、NB 細胞株における LAPTM5 陽性小胞の蓄積を介した細胞死を顕著に促進することを明らかにした。



これらの結果は、LAPTM5 は、ITCH によるユビキチン化を介したタンパク質分解の基質であり、ITCH による負の量的制御を受けていることが分かった（図1）。このこと

は、ITCH の発現は、LAPTM5 の蓄積を介した細胞死を抑制している可能性を示唆している。

### ②微小管・オートファジー関連分子を介した量的制御機構の解析

ヒト LC3 遺伝子ファミリーには、5 種の遺伝子が含まれる（LC3A variant-1 および-2, LC3B, LC3B2, LC3C）。各 LC3 に GFP を融合したタンパク質を安定に発現する細胞を樹立し、栄養飢餓等によりオートファジーを誘導した際の細胞内局在を調べることにより、5 種の LC3 遺伝子うち、オートファジーへの関与が既知の LC3B 以外に、LC3A variant-1 (LC3Av1) もまた、オートファジーに関与することが分かった。さらに、LC3Av1 は、神経芽腫を含む多くの癌種由来細胞株・食道癌臨床検体で高頻度に不活性化すること、そして、その不活性化には、異常な DNA メチル化が寄与することを明らかにした。

一方で、LC3Av1 の発現解析において、予後不良 NB と比較して、自然退縮する予後良好 NB において、LC3Av1 の発現が顕著に高いことが分かった。従って、LAPTM5 陽性小胞の蓄積を介した細胞死誘導における、LC3Av1 の発現の意義について検証した。GOTO 細胞において、LC3Av1 を安定発現させた NB 細胞クローンを樹立し、それらの細胞に LAPTM5 を強制発現させた。その結果、LC3Av1 を安定発現させた細胞では、発現していない細胞と比較して、LAPTM5 のタンパク質レベルが顕著に蓄積し、それに伴う細胞死誘導が有意に促進された。このことは、LC3Av1 の発現は、LAPTM5 陽性小胞の蓄積に寄与する可能性を示唆している。しかしながら、この事象が LC3Av1 のオートファジー機能を介したものか、あるいは微小管ダイナミックスの制御を介したものか、現時点では、その詳細な分子メカニズムは不明である。

### (3) 今後の展望

これまで、国内外での研究により、NB の自然退縮に関与すると思われる遺伝子が数多く同定されている。しかしながら、実際の NB 組織中の退縮部位で起きている細胞死の分子メカニズムは不明である。そのような中、我々は、LAPTM5 陽性小胞の蓄積を介した細胞死が腫瘍退縮に深く関与することに着目してきた。そして、本研究課題により、

LAPTM5 の量的制御機構の一端が明らかとなり、そして、その脱制御が LAPTM5 陽性小胞の蓄積および細胞死誘導に繋がることを見出した。今後、NB 腫瘍退縮における、この LAPTM5 を介した細胞死の関与を明確にするために、より詳細な転写制御の分子機構および NB 腫瘍退縮の動物モデルの確立が必要であると考えられた。

## 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) 主要論文 ; 2件

- ① Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J: A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene*. 2012 [Epub ahead of print] doi: 10.1038/onc.2011.613 (査読あり)
- ② Ishihara T, Inoue J, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J: The HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. *J Biol Chem*. 286:44086-44094. 2011 (査読あり)

(2) 主要論文以外 ; 1件

[学会発表] (計5件)

(1) 国内学会

- ① 小西博貴、井上純、市野瀬志津子、津田均、河野辰幸、市川大輔、大辻英吾、井本逸勢、稲澤譲治：食道癌におけるオートファジーATG7の不活性化。第70回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議場。愛知。2011年10月4日
- ② 井上純、白樺、河野辰幸、稲澤譲治：癌におけるオートファジー関連遺伝子LC3Avariant-1の不活性化。第70回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議場。愛知。2011年10月4日
- ③ 井上純、稲澤譲治：癌細胞におけるオートファジー経路の障害。第69回日本癌学会学術総会。シンポジウム「癌とオートフ

ァジー」大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル。大阪。2010年9月23日

- ④ 白樺、井上純、井本逸勢、稲澤譲治：ヒト癌におけるLC3A variant-1の発現低下の意義。第69回日本癌学会学術総会。大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル。大阪。2010年9月22日

(2) 国外学会

- ① Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J: Lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010 (Washington, DC, USA) 17-21/ April/ 2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/section/genomics/mc/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 純 (INOUE JUN)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・

分子細胞遺伝、助教

研究者番号 : 50568326