

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 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790311

研究課題名（和文）モデルマウスを用いたCGH解析による、神経芽腫の発生・自然退縮制御遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of the genes involved in the tumorigenesis and spontaneous regression of neuroblastoma via array CGH analysis with model mice

研究代表者

岸田 聡 (KISHIDA SATOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20402563

研究成果の概要（和文）：本研究は、神経芽腫モデルマウスである MYCN Tg マウスを利用し、初期腫瘍と末期腫瘍を用いた CGH アレイ解析によって、その異常が神経芽腫の発生や自然退縮に関わる遺伝子を同定することを目的とした。CGH アレイから得られる膨大なデータを解析する上では、無数の染色体異常を相対的な有意さによって評価するために、独自に 3 種類のパラメータを設定してスコア計算を行った。その結果、調べた 12 個の末期腫瘍全てにおいて欠失変異を示す Cited2 という遺伝子を同定した。MYCN Tg マウスに生じた神経芽腫は、Cited2 の発現量によって明確に二群に分類できる細胞から成っており、Cited2 低発現細胞は、高発現細胞と比較して腫瘍形成能が顕著に高かった。また、Cited2 の発現は、神経芽腫発生に関与する他の転写因子の発現に影響を及ぼした。更に *in vivo* において、Cited2 低発現細胞からは高発現細胞が生じたが、その逆は起こらず、低発現細胞を上位とするヒエラルキーの存在が示唆された。これらの結果からは、Cited2 の低発現が神経芽腫のがん幹細胞を規定している可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：We tried to identify the genes involved in the tumorigenesis and spontaneous regression of neuroblastoma via array CGH analysis with MYCN Tg mice, a model for neuroblastoma. For the purpose of evaluating the huge number of chromosomal aberrations, we set three parameters and calculated the scores. As a result, we identified the gene, Cited2, which is deleted in all 12 terminal tumors. Neuroblastoma in MYCN Tg mice turned out to be composed of two distinguishable populations in terms of the expression level of Cited2. The cells with low Cited2 expression showed strikingly higher tumorigenic ability compared to high ones. We also found that Cited2 affected the expression of other neuroblastoma-related transcription factors. In addition, although the cells with low Cited2 expression gave rise to high ones *in vivo*, the opposite never occurred. This result indicates the hierarchy that the low ones are superior to high ones. Taken together, the low expression of Cited2 might be the hallmark as cancer stem cells of neuroblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：神経芽腫・モデルマウス・CGH アレイ・Cited2・がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、胚発生時の神経堤に由来し、後に交感神経細胞へと分化する神経芽細胞が未分化のまま異常に増殖する小児悪性固形腫瘍である。腫瘍は、交感神経系組織である副腎髄質や交感神経節を原発巣として発生する。神経芽腫の治療は、主に手術、抗がん剤、放射線によって行われているが、予後不良症例に対する現行の治療効果はまだ十分とは言えない状況にある。近年では、がんに対する分子標的治療の開発が盛んに行われており、乳がんや白血病においては革新的な治療法が生まれている。一方で神経芽腫においては、分子治療の標的探索は精力的に行われているものの、まだ進捗をみているとは言い難い。

2. 研究の目的

本研究では、神経芽腫のモデル動物である MYCN Tg マウスを用い、CGH アレイによる染色体異常の解析を通して新規制御因子を同定する。神経芽腫の発生と自然退縮に関わる遺伝子を同定し、その働きを明らかにすることは、分子標的治療開発へ繋がる重要な知見となる。

3. 研究の方法

MYCN Tg マウスに生じた初期腫瘍と末期腫瘍を用いて CGH アレイを行い、染色体異常を網羅的に解析する。その結果は膨大なデータとして出力されるが、その中からより有意と考えられ、機能解析を行うべき遺伝子を効率的、客観的に選定するために、バイオインフォマティクスに基づいたスコア計算を行う。その計算に当たっては、以下の3種類のパラメータを設定した。一つ目は「log2 ratio」であり、各遺伝子の増幅や欠失の程度を示す数値である。二つ目は「共通して増幅（欠失）を示すサンプル数」であり、より多くのマウスに共通して起こっている異常程、神経芽腫へ普遍的に寄与している可能性が高いと考えられる。三つ目は「染色体上で隣り合うプローブ同士が連続して増幅（欠失）している数」である。プローブ一つ分といった非常に狭い領域においてピンポイントに変異が起こることは考えにくく、蛍光を測定するという解析の性質上、そのようなシグナル値は実験エラーである可能性も生じてくる。従って、ある程度まとまって増幅（欠失）を示す方が、より確からしいという考えに基づいて、このパラメータを設定した。以

上のパラメータに基づいてスコアの計算を行い、相対的により確からしい変異部位のリンクを作成した。その結果から候補遺伝子を選択し、MYCN Tg マウスとヒト神経芽腫細胞株を用いた機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) CGH アレイ解析と候補遺伝子の探索

MYCN Tg マウスにおける初期腫瘍と末期腫瘍を用いた CGH アレイ解析と、バイオインフォマティクスに基づいたスコア計算により、より有意と考えられる変異を同定した。これらについては、データベースで公開されているヒト SNP アレイの結果を重ね合わせ、モデルマウスで同定した変異がヒトでも起こっているかどうかを確認した。以上の CGH アレイ解析を通して、Cited2 という遺伝子に着目し、神経芽腫におけるその機能解析を行った。

(2) 神経芽腫における Cited2 の欠失

CGH アレイで解析した12個体全ての末期腫瘍において、Cited2 は欠失を意味する log2 ratio 値を示した。全個体で欠失しているという結果は、この変異が神経芽腫の発生に普遍的に関わっている可能性を示唆している。更に FISH により、MYCN Tg マウスの神経芽腫細胞において、Cited2 がヘテロ欠失していることを確認した。これまでの文献によると、Cited2 ノックアウトマウスは交感神経節や副腎といった交感神経系組織の形成不全という表現型を示す。これは一見、交感神経系細胞のがん化とは逆の現象に見えるが、Cited2 が交感神経細胞の分化・成熟に必要であるという事実は、神経芽腫の成り立ちと辻褃が合っている。そもそも神経芽腫とは、未分化な神経芽細胞が異常に増殖する腫瘍であり、がん細胞にとっては、交感神経細胞への分化を防ぎ、未分化な状態を保つことが重要である。この点から考えると Cited2 の欠失は、交感神経細胞への分化を抑制するという点において、神経芽腫細胞に必要な要素なのだと想像される。

(3) 神経芽腫細胞における Cited2 の発現

次に、神経芽腫組織における Cited2 の発現をモニターするために、Cited2 のプロモーターに蛍光タンパク質である Venus の遺伝子を繋いだプラスミドを作成し、レトロウィルスを用いて、MYCN Tg マウスの腫瘍から培養した神経芽腫細胞に導入した。その結果、興

味深いことに、MYCN Tg マウスの神経芽腫は、Cited2の発現量によって明確に2群に分類できる細胞から構成されており、量比ではCited2 高発現細胞の方が低発現細胞より圧倒的に多かった (図1)。

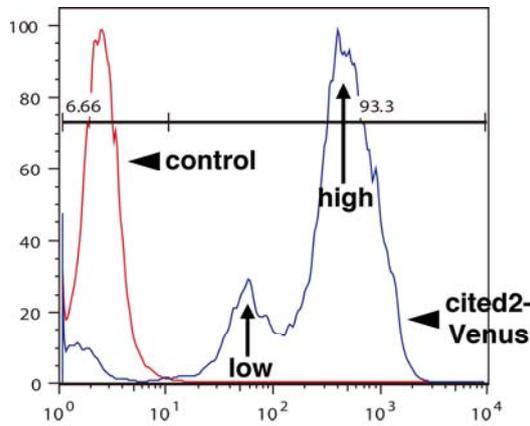


図1 Cited2の発現量が異なる二群のMYCN Tgマウス神経芽腫細胞

(4) Cited2 低発現細胞は高い腫瘍形成能を有する

上記2群の細胞間ががん細胞としての性質に違いがあるかどうかを検討するために、FACSによってCited2 低発現細胞と高発現細胞をそれぞれソーティングし、野生型マウスの皮下に移植して、同種移植腫瘍の形成能を検討した。その結果、低発現細胞は顕著に高い腫瘍形成能を示した (図2)。

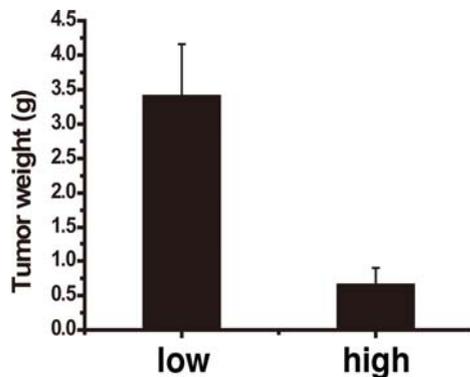


図2 Cited2低/高発現細胞による同種移植腫瘍

(5) 低発現細胞は高発現細胞より上位のヒエラルキーである

腫瘍形成能の高さから、Cited2 低発現細胞にはがん幹細胞としての可能性が考えられるが、更に、低発現細胞と高発現細胞のヒエラルキーについて、その仮説を支持する以下のような結果が得られた。低発現細胞を野生型マウスの皮下に移植すると、生じた腫瘍には高発現細胞が含まれていた一方で (図3上)、高発現細胞を移植した腫瘍には、低発現細胞は含まれていなかった (図3下)。つ

まり、in vivoにおいて低発現細胞からは高発現細胞が生じるが、その逆は起こらないということを示している。低発現細胞から高発現細胞への移行が不可逆的であるというこのヒエラルキーの存在は、Cited2 低発現細胞が神経芽腫幹細胞である可能性を強く示唆している。

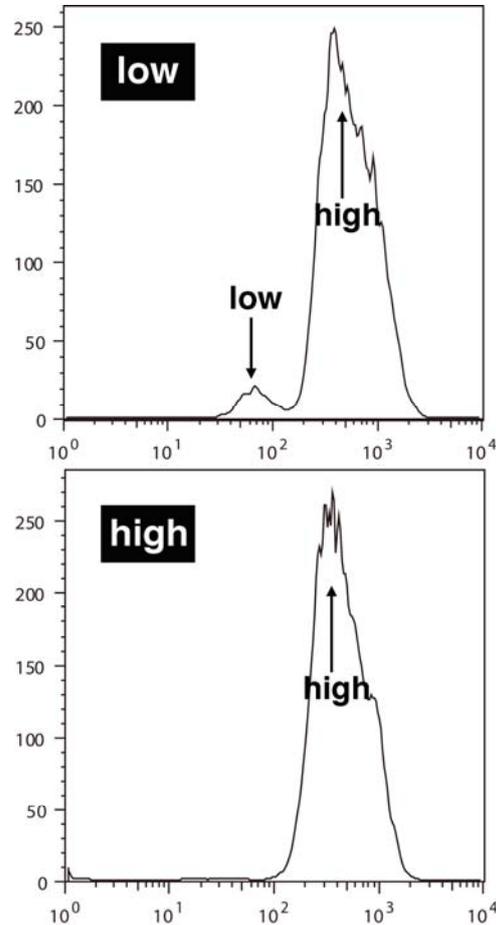


図3 Cited2低/高発現細胞による同種移植腫瘍のCited2発現分布

(6) Cited2は転写因子NeuroD1の発現制御に関わる

当教室では転写因子NeuroD1が、神経芽腫細胞の運動性や幹細胞性に関わることを報告しているが (Huang et al. Cancer Res. (2011) 71, 2938-2948)、Cited2の発現は、NeuroD1の発現と逆相関を示した。つまり、Cited2 低発現細胞においてはNeuroD1の発現が強く、Cited2 高発現細胞においてはNeuroD1の発現が弱い (図4上)。また、Cited2をほとんど発現していないヒト神経芽腫細胞株SH-SY5YにCited2を発現させると、NeuroD1が減少し (図4下左)、逆にCited2を発現しているNB39細胞においてCited2をノックダウンすると、NeuroD1の発現が誘導された (図4下右)。これらの結果は、Cited2がNeuroD1の発現を制御していることを示唆しており、Cited2 低発現かつNeuroD1 高発現

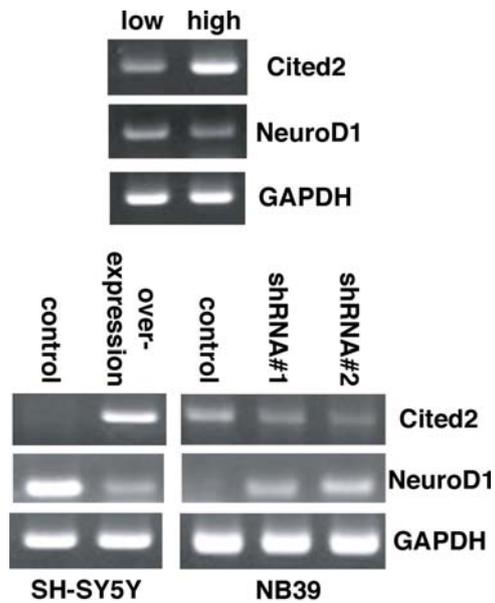


図4 マウス、及びヒトにおける Cited2とNeuroD1発現の相関

という腫瘍形成能の高い細胞状態の維持には、Cited2の働き（低発現）が極めて重要であると言える。NeuroD1以外にも、Cited2によって発現が制御される転写因子をいくつか見出しており、Cited2が神経芽腫幹細胞を規定するマスター因子である可能性が考えられる。

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3件)

1. Midkine inhibits inducible regulatory T cell differentiation by suppressing the development of tolerogenic dendritic cells. Sonobe Y, Li H, Jin S, Kishida S, Kadomatsu K, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. J Immunol. (2012) 188:2602-2611. 査読有
2. The neuronal differentiation factor NeuroD1 downregulates the neuronal repellent factor Slit2 expression and promotes cell motility and tumor formation of neuroblastoma. Huang P, Kishida S, Cao D, Murakami-Tonami Y, Mu

P, Nakaguro M, Koide N, Takeuchi I, Onishi A, Kadomatsu K. Cancer Res. (2011) 71:2938-2948. 査読有

3. DRR1 is expressed in the developing nervous system and downregulated during neuroblastoma carcinogenesis. Asano Y, Kishida S, Mu P, Sakamoto K, Murohara T, Kadomatsu K. Biochem Biophys Res Commun. (2010) 394:829-835. 査読有

[学会発表] (計2件)

- (1) Satoshi Kishida, The search for TICs- or malignancy-related genes in neuroblastoma model mice utilizing Next-Generation Sequencing. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月4日, 名古屋国際会議場
- (2) Satoshi Kishida, Comprehensive screen for genes involved in tumorigenesis and tumor-initiating cell formation in MYCN Tg mice. ANR2010, June 21-24, 2010, Stockholm, Sweden

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等なし。

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
岸田 聡 (KISHIDA SATOSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20402563
- (2) 研究分担者なし
- (3) 連携研究者なし