

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 4 日現在

機関番号： 24303
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2010～2011
 課題番号： 22790994
 研究課題名（和文） phox2b 遺伝子恒常的活性化による神経芽腫の分化障害の機能解明
 研究課題名（英文） Sustained activation of phox2b gene affects on differentiation arrest of neuroblastoma
 研究代表者
 柳生 茂希（YAGYU SHIGEKI）
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号： 10572547

研究成果の概要（和文）：神経芽腫（NB）の分化障害の原因として、phox2b、ASCL1 遺伝子の高発現維持とそれによる Delta-Notch 経路の恒常的な活性化の可能性を明らかにした。また、Notch 阻害剤の神経芽腫に対する新たな分子標的療法の可能性について明らかにした。Notch 遺伝子の細胞内ドメインをサブクローニングし、ヒト神経芽腫細胞株に導入することに成功した。現在は、これらの遺伝子改変神経芽腫細胞株を用いて分化誘導実験を行っているが、本研究を発展させ、phox2b 高発現維持のメカニズム解明について検討を進めることにより、神経芽腫の分化障害、自然退縮のメカニズム、新たな分化誘導療法に対するアプローチを与えることが可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）： We identified that phox2b gene and ASCL1 gene were highly expressed and Notch pathway was up-regulated in neuroblastoma tumors and cell lines. Phox2b gene was down-regulated during neuronal differentiation by all-trans retinoic acid. NB cell lines showed neuronal differentiation by the blockade of Notch pathway with gamma secretase inhibitor. We are now generating Notch intracellular domain (NICD) expressing NB cell lines, and testing how the sustained activation of phox2b and Notch pathway affects on differentiation arrest of neuroblastoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 23 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：小児腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学・小児腫瘍学

キーワード：神経芽腫、phox2b、Notch

1. 研究開始当初の背景

① ヒト神経芽腫(NB)は胎生期の神経冠細胞を母地とする腫瘍であるが、多様な性質を持つ細胞集団からなり、その臨床経過も、急激に進行し、不幸な転機をとる予後不良群がある一方で、無治療で自然

退縮傾向を示すほかの癌腫には見られない予後良好群が存在することが知られている。NBの腫瘍化、自然退縮のメカニズムはいまだ明らかになっておらず、その詳細を知ることはNBに対して、リスクに応じた効果的な治療戦略の開

発に大いに役立ち、今後の治療成績改善につながるものと考えられる。

- ② 神経芽腫発生のメカニズムと交感神経系の分化の過程には密接なかかわりがあると考えられているが、交感神経細胞分化では、神経幹細胞が、適切な条件下で、sox10、phox2b、hASH1、HES1などの神経分化関連転写因子が適切な時期に、順に互いを発現調節しあうことにより、分化することが明らかとなっている。また、家族性NBの解析では、生殖細胞系に phox2b 遺伝子変異が存在し、NB 発生と密接に関連している可能性が示されている (Bourdeaut F et al. 2005)。さらに我々は、平成 19 年度科学研究費基盤 C 研究 (代表者; 家原知子、本研究代表者も主たる研究協力者として参加) において、現在までに、NB 細胞株では、phox2b 遺伝子の高発現が維持されていることを明らかにした。最近では、phox2b 遺伝子はそれ自身が phox2b 遺伝子の転写を auto-regulatory に調節していることが報告されたが、我々は細胞株を用いた検討より、phox2b 遺伝子変異を持つ NB 細胞株では、phox2b mRNA が高発現していることを既に確認している。これらの知見から、NB の発生には、その母地となっている神経幹細胞の分化段階で神経分化関連遺伝子である phox2b に何らかの異常が生じ、分化停止、腫瘍化している可能性が推察される。

2. 研究の目的

- ① NB 細胞の分化における phox2b 遺伝子の関与について解析する。
- ② NB 細胞の分化誘導における Notch 経路の関与について解析する。

3. 研究の方法

- ① NB 細胞株と臨床検体での phox2b 遺伝子、蛋白の発現解析。
- ② All trans retinoic acid、NOTCH 阻害剤による分化誘導時の神経芽腫細胞の形態と phox2b、ASCL1 遺伝子の発現変化の検討。
- ③ phox2b 遺伝子の発現抑制 (ノックダウン) による細胞の形態、増殖、分化への影響の検討。
- ④ Notch 遺伝子細胞内ドメイン (NICD) のサブクローニングと、ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y への強制発現。この際の神経芽腫細胞の分化における影響と、phox2b、ASCL1 遺伝子の発現に対する影響の検討。

4. 研究成果

- ① NB 細胞株と臨床検体での phox2b 遺伝子、蛋白の発現解析。

NB 細胞株を用いて、神経分化関連転写因子の発現について real-time PCR 法、免疫染色法で検討した。NB 細胞株は本来神経分化の際に一過性に発現する、phox2b、ASCL1 遺伝子の高発現が維持されていることが確認できた。

図 1: 免疫染色法による phox2b 蛋白の発現解析

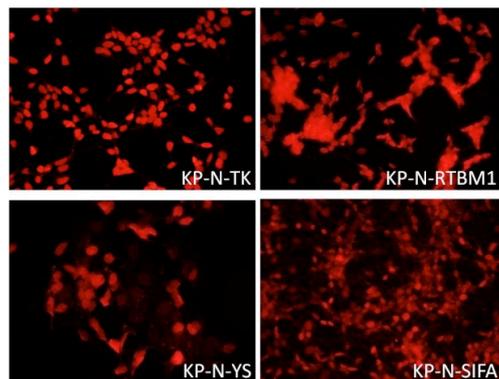


図 2: real-time PCR 法による遺伝子発現解析

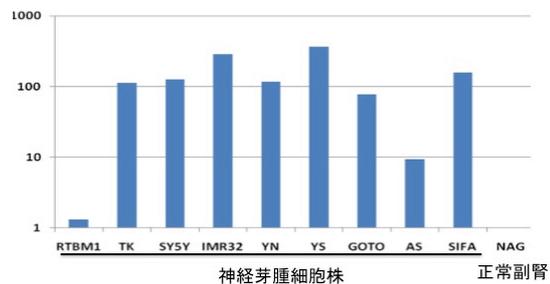
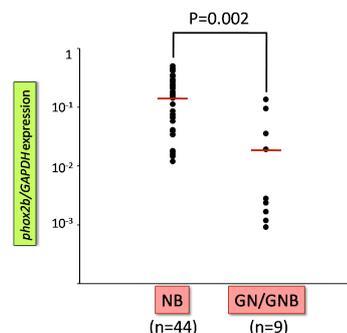


図 3: 神経芽腫腫瘍検体を用いた、phox2b 遺伝子発現解析。神経節芽腫、神経節腫と比較して、神経芽腫では phox2b 遺伝子発現が有意に高い。



- ② All trans retinoic acid, NOTCH 阻害剤による分化誘導時の神経芽腫細胞の形態と phox2b, ASCL1 遺伝子の発現変化の検討。

NB 細胞株にレチノイン酸 (ATRA) を投与し分化誘導を行ったところ、ATRA 投与開始 2 時間後より ASCL1 の、6 時間後ごろより phox2b の著しい発現抑制が見られたのち、神経突起を延長させ分化が誘導された。

NB 細胞株に Notch 阻害剤を投与したところ、ASCL1 遺伝子の発現抑制と、神経突起の延長が見られたが、phox2b の発現抑制は見られなかった。

図 4 : ATRA、Noych 阻害剤添加後の神経芽腫細胞の変化。薬剤添加後 24 時間で ASCL1、BMI1 遺伝子の遺伝子発現抑制が見られ、72 イカンで神経突起の延長が見られる。

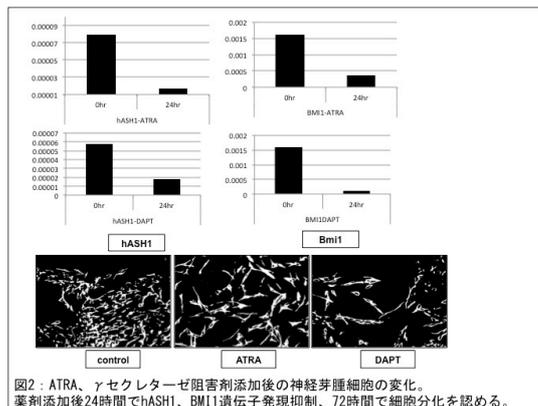


図2 : ATRA、γセクレターゼ阻害剤添加後の神経芽腫細胞の変化。薬剤添加後24時間でhASH1、Bmi1 遺伝子発現抑制、72時間で細胞分化を認める。

- ③ phox2b 遺伝子の発現抑制 (ノックダウン) による細胞の形態、増殖、分化への影響の検討。

phox2b を特異的に発現抑制する shRNA を合成し、レンチウイルスベクターに象乳した。このレンチウイルスベクターを神経芽腫細胞株に感染させ、導入効率を計算した。shphox2b 導入株は、mock 導入株と比較して約 90% の遺伝子発現抑制が見られた。本神経芽腫細胞株を用いて、現在分化誘導実験を行っている。

- ④ Notch 遺伝子細胞内ドメイン (NICD) のサブクローニングと、ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y への強制発現。この際の神経芽腫細胞の分化における影響と、phox2b、ASCL1 遺伝子の発現に対する影響の検討。

Notch 遺伝子全長は既にクローニング

されている。細胞内ドメイン (NICD) をコードする遺伝子領域を標的に PCR primer をデザインした。PCR 法により NICD をコードする遺伝子領域を増幅し、クローニングベクターにサブクローニングすることに成功した。この遺伝子をレンチウイルスベクターに導入し、神経芽腫細胞株に感染させることによって、NICD 安定発現神経芽腫細胞株を作成した。現在この細胞株を用いて、ATRA、Notch 阻害剤による分化誘導実験を行い、野生株との差を観察することによって、神経芽腫細胞の分化抑制における NICD の役割を検討中である。

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 6 件)

- ① Yagyu S, et al. Preoperative analysis of 11q loss using circulating tumor-released DNA in serum: a novel diagnostic tool for therapy stratification of neuroblastoma. *Cancer Lett.* 309 185-189. 2011.
- ② Katsumi Y, Yagyu S. et al. Sensitivity of malignant rhabdoid tumor cell lines to PD 0332991 is inversely correlated with p16 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 413 62-68. 2011.
- ③ Kimoto T, Yagyu S, et al. Detection of MYCN DNA in the cerebrospinal fluid for diagnosing isolated central nervous system relapse in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 56 865-867. 2011.
- ④ Miyachi M, Yagyu S, et al. Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 400 89-93. 2010.
- ⑤ Miyachi M, Yagyu S, et al. Restoration of p53 pathway by nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Clin Cancer Res.* 15 4077-4084. 2009.
- ⑥ Misawa A, Yagyu S, et al. RASSF1A hypermethylation in pretreatment serum DNA of neuroblastoma patients: a prognostic marker. *Br J Cancer.* 100 399-404. 2009.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 柳生茂希他、初発時、再発時腫瘍を用いてゲノム異常解析を施行した中枢神経再発神経芽腫の3例、第53回日本小児血液・がん学会学術集会、2011年11月25～27日、群馬
- ② Yagyu S et al. PROGNOSIS OF NEUROBLASTOMA PATIENTS LESS THAN EIGHTEEN MONTHS OLD USING SERUM-BASED QUANTIFICATION OF MYCN GENE AMPLIFICATION. 43rd Congress of the International Society of Pediatric Oncology. 2011年10月26-30日; Auckland, New Zealand.
- ③ 柳生茂希他、血清中遊離DNAを用いた経時的MYCN遺伝子増幅定量が治療評価と経過観察に有効であった神経芽腫の6例、第26回日本小児がん学会学術集会、2010年10月、大阪
- ④ 柳生茂希他、神経芽腫患者の血清中遊離DNAを用いた11番染色体長腕欠失の検出、第18回日本がん検診診断学会、2010年6月、東京
- ⑤ 吉田秀樹、柳生茂希他、MYCN非増幅にもかかわらず、著しい治療抵抗性を示した11qLOH陽性神経芽腫の1症例、第26回日本小児がん学会学術集会、2010年10月、大阪
- ⑥ 木本富子、柳生茂希他、髄液中PCR-MYCN増幅の検出が同種移植後中枢単独再発の確定診断に有用であった進行神経芽腫の1例、第26回日本小児がん学会学術集会、2010年10月、大阪
- ⑦ 柳生茂希他、神経芽腫患者の血清中遊離DNAを用いた11番染色体長腕欠失の検出、第25回日本小児がん学会学術集会、2009年11月、千葉

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳生 茂希 (YAGYU SHIGEKI)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：10572547

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし