

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25年6月3日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22791016

 研究課題名（和文） 神経芽腫におけるNLRR1のシグナル伝達制御機構の解明と
分子標的治療法の開発

 研究課題名（英文） Mechanism of NLRR1-regulated signaling pathway and
establishment of a novel targeted therapy

研究代表者

高取 敦志 (TAKATORI ATSUSHI)

千葉県がんセンター（研究所）・小児がん研究センター・研究員

研究者番号：40455390

研究成果の概要（和文）：難治性の小児固形腫瘍である神経芽腫における新規治療法の開発を目指すべく、がんの発生・進展に関与すると考えられる膜タンパク質であるNLRR1の作用機序の解析を行った。NLRR1は脂質ラフトと呼ばれる膜構造を介して増殖シグナルと細胞分化シグナルを制御することが明らかとなった。また、NLRR1を認識する抗体を作製し、細胞増殖を抑制する機能を持つ抗体が発見されたことから、NLRR1ががん治療における標的分子となり得ることを示した。

研究成果の概要（英文）：New and efficient therapeutic strategies are required to improve overall survival for the high-risk neuroblastoma (NB). In the present project, intensive functional analyses have been performed to understand the mechanism of NLRR1-regulated growth signaling pathway. The study demonstrated that NLRR1 enhances proliferative signals rather than differentiating signals through membrane structure of lipid rafts. Functional screening has identified anti-NLRR1 monoclonal antibody harboring growth inhibitory effect, suggesting that a potential therapeutic strategy for NB therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：小児腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

これまでに神経芽腫の発生・進展・分化に関わる様々な受容体型膜タンパク質が報告されてきており、その中にはTrkファミリーなど予後予測に用いられるものもある。その他にEGF受容体ファミリーやIGF受容体など他の癌の発生に関連する受容体型チロシンキナーゼ（RTK）は神経芽腫においても重要である¹⁾。しかし、これらの多くは発達においても重要な因子であ

り、分子標的として狙う分子はがん細胞に特異的であることが望ましい。

また、予後良好を示す因子であるTrkA発現量をみても、高発現で必ずしも予後良好ではない症例が散見されることから、神経芽腫におけるRTKの機能は発現量のみならず、点突然変異や下流因子との相互作用など様々なレベルにおいて制御されると考えられる。しかし、細胞膜上でこれらの膜タン

パク質がどのように制御されるかについての理解は不足している。近年、活性化されたRTKが別のRTKの活性化を引き起こすことや細胞膜でコレステロールなどの脂質に富むマイクロドメインである脂質ラフトがシグナル伝達において重要な役割を果たす²⁾ ことなどが明らかになってきている。神経芽腫を含む癌細胞においても同様のメカニズムが存在することが考えられ、その理解は今後神経芽腫に対する分子標的治療を開発する上で重要である。一方、当がんセンターにおいて神経芽腫に関連する遺伝子としてNLRRファミリータンパクが同定された^{3,4)}。このタンパクは膜一回貫通型タンパクであり、NLRR1の発現は予後不良の神経芽腫において高く、予後良好の神経芽腫において低い特徴があることから標的分子の候補となると考えられる。また他の癌由来細胞においてもその発現が認められることから、様々な癌の発生に関与していることも疑われる。しかしその機能については、細胞接着や受容体としての機能が予想されるのみで、詳しくは不明のままである。本研究代表者は、これまでに分子標的治療法を開発するべく、NLRR1の機能に関する解析を進めてきており、NLRR1がEGFやIGFによる受容体およびERKのリン酸化を増強し、細胞増殖を増加させること、およびNLRR1の機能には脂質ラフトの構造が必要であるなどの知見を得ている。

【参考文献】

- 1) Ho, R. et al., *Cancer Res.*, 65: 9868-75, 2005
- 2) Roepstorff, K. et al. *J. Biol. Chem.*, 277:18954-60, 2002
- 3) Hamano, S. et al. *Int. J. Oncology*, 24:1457-66, 2004
- 4) Hossain, M. S. et al. *Oncogene*, 27: 6075-82, 2008

2. 研究の目的

(1) NLRR1が脂質ラフトおよび他の神経芽腫関連因子に及ぼす影響

ラフトには受容体、Srcファミリー、Gタンパク質などのシグナル伝達分子が集まり、細胞外シグナルを伝達する場となることが知られているが、複数の受容体シグナルに間接的に作用するラフト分子に関する報告はまだない。NLRR1はその膜ドメインの構造を変化させ、リガンドと受容体の会合に影響を与えると考えられる。そこで、NLRR1発現細胞における様々な受容体・膜タンパク質の膜分布、NLRR1機能の責任領域を明らかにする。特にNLRR1と同様に細胞膜に分布し神経芽腫に関連する因子にTrkファミリーや最近同定されたAnaplastic lymphoma kinase (ALK) など⁵⁾の機能に及ぼす影響について明らかにする。

(2) NLRR1の発生および発がんにおける機能解析

NLRRファミリーは個体発生において特に神経系に多く発現され、NLRR4のKOマウスにおいて海馬依存的な長期記憶の低下がみられることが報告された⁶⁾。このことから、他のNLRRファミリー分子も神経系の発達において何らかの役割を担っていることが予想される。そこで、作出したNLRR1 KOマウスを用いて、NLRR1欠損が個

体発生に与える影響を検索する。

(3) NLRR1機能を阻害するモノクローナル抗体のスクリーニング

乳癌やその他の癌ではEGFシグナルの関与が疑われる場合でもEGFR阻害剤の効果が薄い場合がある。この中にはNLRR1の発現があり、それによりシグナルが増強されている症例もあることが予想される。そこでNLRR1機能を抑制するモノクローナル抗体を用いた治療法の開発を試みる。NLRR1の細胞外領域に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ・クローンの中から、NLRR1による細胞増殖効果を抑制するクローンをスクリーニングし、その効果を検証する。

【参考文献】

- 5) Chen, Y. et al. *Nature*, 455:971-5, 2008
- 6) Bando, T. et al. *Mol. Cel. Biol.*, 25:4166-75, 2005

3. 研究の方法

(1) NLRR1が脂質ラフトおよび他の神経芽腫関連因子に及ぼす影響

NLRR1の機能を詳細に明らかにするために、NLRR1安定発現株を用いてTrkAやALKなど他の受容体型キナーゼの機能に及ぼす影響を検討し、またNLRR1による脂質ラフトの構造変化をラフト関連タンパク質の分布を指標に明らかにする。

(2) NLRR1の発生および発がんにおける機能解析

一方、作出したNLRR1のKOマウスの表現型解析を行い、NLRR1欠損が発生期に与える影響を明らかにする。特に、各種初代培養細胞においてシグナル伝達関連因子のリン酸化を指標にNLRR1欠損の影響を検索していく。

(3) NLRR1機能を阻害するモノクローナル抗体のスクリーニング

作製済みNLRR1モノクローナル抗体産生クローンの中から、NLRR1による細胞増殖効果を抑制するクローンをスクリーニングする。スクリーニングは抗原ペプチドを用いたELISAおよびNLRR1発現細胞を用いたフローサイトメトリーを行ったうえで、NLRR1

4. 研究成果

(1) NLRR1による他の受容体機能に及ぼす影響を検索した結果、NGFやbFGF、PDGFに対する増強効果は認められない一方で、神経芽腫由来細胞株において主に細胞増殖シグナルとして働くBDNFやEGF、IGFを増強する効果が観察されたことから、NLRR1は増殖シグナルを選択的に制御することが分かってきた。

(2) GFP標識したNLRR1を細胞で発現させ、脂質ラフトマーカーである膜ガングリオシドGM1に結合するコレラトキシンサブユニットBを用いて解析を行った。その結果、NLRR1が脂質ラフトに局在することが視

覚的に確認された。さらに、脂質ラフト構造を破壊するメチル-β-シクロデキストリンを用いてNLRR1の機能への影響を検討した結果、NLRR1発現細胞におけるEGFシグナル伝達がメチル-β-シクロデキストリンの処理により抑制された。

(図1) このことから、NLRR1が増殖シグナルを増強する機能には脂質ラフトの構造が必要であることが明らかとなった。

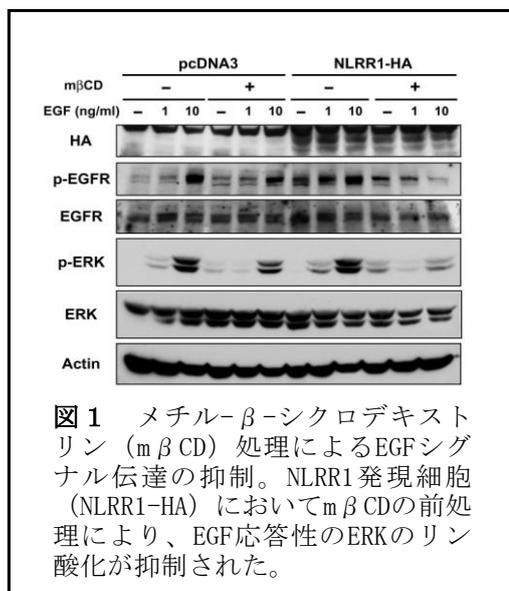


図1 メチル-β-シクロデキストリン (mβCD) 処理によるEGFシグナル伝達の抑制。NLRR1発現細胞 (NLRR1-HA) においてmβCDの前処理により、EGF応答性のERKのリン酸化が抑制された。

(3) NLRR1ノックアウトマウスの表現型解析を行った結果、NLRR1ノックアウトマウスは低体重であり、そのマウス胎仔線維芽細胞の増殖能は著しく減少していた (図2)。また胎仔神経細胞初代培養を行い、NLRR1欠損が神経細胞のシグナル伝達に与える影響を検索したところ、EGF応答性のERKのリン酸化が著しく減少していた (図3)。

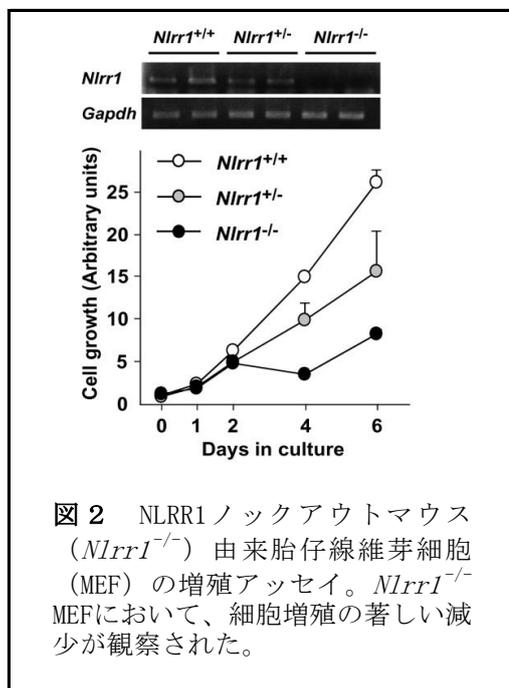


図2 NLRR1ノックアウトマウス (*Nlrr1*^{-/-}) 由来胎仔線維芽細胞 (MEF) の増殖アッセイ。*Nlrr1*^{-/-} MEFにおいて、細胞増殖の著しい減少が観察された。

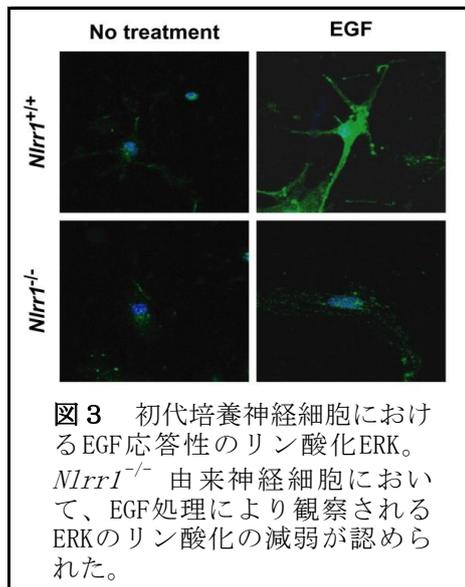


図3 初代培養神経細胞におけるEGF応答性のリン酸化ERK。*Nlrr1*^{-/-} 由来神経細胞において、EGF処理により観察されるERKのリン酸化の減弱が認められた。

(4) 細胞増殖効果を抑制するNLRR1抗体のスクリーニングを試みた結果、その候補クローンが得られた (図4)。

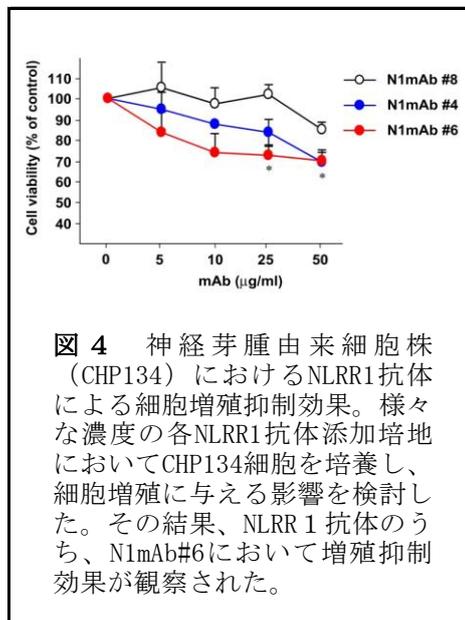


図4 神経芽腫由来細胞株 (CHP134) におけるNLRR1抗体による細胞増殖抑制効果。様々な濃度の各NLRR1抗体添加培地においてCHP134細胞を培養し、細胞増殖に与える影響を検討した。その結果、NLRR1抗体のうち、N1mAb#6において増殖抑制効果が観察された。

さらに、その抗体の認識エピトープを同定するために、NLRR1の部分欠損型発現ベクターを用いて検討した結果、NLRR1の細胞外領域における抗体認識ドメインが明らかとなった。細胞増殖抑制効果については、神経芽腫以外の細胞株を用いてさらなる検討を行った結果、乳癌由来細胞株、肺癌由来細胞株及び骨肉腫由来細胞株においても、増殖抑制効果が認められた。今後は、in vivoにおける抗体の評価を引き続き行う必要があると考える。

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2件)

(1) Hossain S., Takatori A., 他4名.
NLRR1 enhances EGF-mediated MYCN induction in neuroblastoma and accelerates tumor growth in vivo.

Cancer Research, 72(17):4587-96, 2012.

(査読有)

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0943

(2) Akter J., Takatori A., 他6名.
Expression of NLRR3 orphan receptor gene is negatively regulated by MYCN and Miz-1, and its down-regulation is associated with unfavorable outcome in neuroblastoma.
Clinical Cancer Research, 17(21): 6681-92, 2011.

(査読有)

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-0313

[学会発表] (計9件)

(1) Takatori, A. 他, NLRR1, a direct target of MYCN, regulates cell growth both in vitro and in vivo and can be a therapeutic target against high-risk neuroblastoma.

Advanced Neuroblastoma Research (ANR) 2012
2012年6月19日, カナダ・トロント

(2) 高取 敦志 他, NLRR1によるEGFおよびIGFシグナルの制御メカニズムと新規分子標的治療の可能性.

第71回日本癌学会学術総会
2012年9月21日, 札幌

(3) Takatori, A. 他, NLRR1, a direct target of MYCN, regulates cell growth both in vitro and in vivo and can be a therapeutic target against high-risk neuroblastoma.

SIOP2012

2012年10月7日, イギリス・ロンドン

(4) 高取 敦志 他, NLRR1, a potential molecular target of neuroblastoma, has functional significance in cell growth and mouse development.

第70回日本癌学会学術総会
2011年10月5日, 名古屋

(5) Takatori, A. 他, NLRR1, a direct target gene of MYCN, modulates aggressive growth of neuroblastoma by selectively enhancing EGF and IGF signals through the components of lipid rafts.

ANR2010

2010年6月22日, スウェーデン・ストックホルム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高取 敦志 (TAKATORI ATSUSHI)

千葉県がんセンター (研究所) ・

小児がん研究センター・研究員

研究者番号: 40455390