

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 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890080

研究課題名（和文）腫瘍抑制遺伝子及び神経発生制御因子としての DRR1 の機能解析

研究課題名（英文） The roles of DRR1 in tumorigenesis and nerve system.

研究代表者

牟 萍 (Mu Ping)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10584675

研究成果の概要（和文）：神経芽腫細胞株に対して DRR1 を強制発現すると、細胞の増殖は抑えられることは分かった。また、DRR1 を僅かに発現している細胞株（NB39）に対しては DRR1 をノックダウンすると、低い血清による細胞分化は抑制されることが認められた。さらに、我々は tumor sphere の分化を誘導し、RT-PCR で分化された細胞における DRR1 の発現を検討した。分化前の細胞と比べると、分化された細胞において DRR1 の発現は上昇したことを明らかにした。体外培養の海馬神経細胞において、DRR1 はデンドライトと軸索に局在することが認められた。また、DRR1 をノックダウンすると神経突起は短くなることが認められた。これらの結果、DRR1 は神経芽腫細胞の分化を調節することによって、細胞の増殖に影響する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：After the overexpression of DRR1 in neuroblastoma cells, cell growth was decreased. Downregulation of DRR1 in NB39 cells inhibited low serum induced cell differentiation. The result of RT-PCR showed that the expression of DRR1 increased after differentiation induction in tumor sphere. In primary cultured hippocampal neurons, DRR1 located in both dendrite and axon. And after downregulation of DRR1 in hippocampal neuron, the length of neurite was decreased when compared to control. These results showed the possibility that DRR1 affect neuroblastoma cell growth by regulating cell's differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：腫瘍抑制、神経発生、DRR1

1. 研究開始当初の背景

DRR1 はヒトゲノムの3番染色体に位置しており、腎細胞癌において欠失し、発現が減少している遺伝子として発見された。更に、強制発現すると細胞増殖を抑制することから、その作用機構は不明であるものの腫瘍抑制遺伝子である可能性が示唆されている。

一方我々は、小児悪性固形腫瘍である神経芽

腫の発生機構を解析する目的のもと、モデル動物である MYCN Tg マウスを用いた基礎研究を行っている。MYCN は神経芽腫の最も主要な原因遺伝子と考えられており、MYCN Tg マウスは一定の頻度で交感神経節から神経芽腫を自然発症する (Weiss et al.(1997) EMBO J. 16,2985-2995)。最近我々は、MYCN Tg マウスを用いた神経芽腫の発生前後での遺伝子発現

プロファイルの比較解析から、野生型マウスの正常神経節では発現しており、がん化に伴ってその発現が消失する遺伝子として DRR1 を同定した (Asano et al.(2010) Biochem Biophys Res Commun, 394(3): 829-835)。

MYCN Tg マウスのがん組織における DRR1 タンパク質の発現を免疫染色によって検討した。野生型マウスの神経節で、DRR1 の強い発現が認められる。MYCN Tg マウスの発がん直後の神経節で、正常細胞と裸核状で紫色の神経芽腫細胞が混在しているが、前者にのみ DRR1 が発現している。進行したがん組織で、DRR1 の発現は認められない。一方、ヒト神経芽腫細胞株においても DRR1 は概ね発現していなかった。上述の通り、現時点では DRR1 の機能はほとんど未知であり、神経芽腫に関わる報告も全くされていない。MYCN Tg マウスでは、誕生後間もない仔マウスで既にがんの兆候が認められることから、更に遡って胚発生時に注目し、野生型マウス胎児における DRR1 タンパク質の発現を免疫染色によって検討した。その結果、脳・脊髄や神経節・小腸神経叢という、中枢・末梢を問わない神経系での広い発現を認めた。更に、ラット胎児脳由来の初代培養神経細胞においては DRR1 は軸索に局在しており、その生存に正の寄与をしていることも示唆された。これらのことから DRR1 の機能として (1) 神経芽腫における腫瘍抑制遺伝子としての働き、(2) 胎児期における神経系発生・維持の制御という二つが考えられる。

2. 研究の目的

神経芽腫は難治性の小児悪性固形腫瘍である。我々は神経芽腫のモデル動物である MYCN トランスジェニック (Tg) マウスを用いて、現状ではほとんど明らかになっていない神経芽腫の発生機構を解析している。その過程において、MYCN Tg マウスでの神経芽腫の原発巣である神経節では発現しているものの、がん化に伴ってその発現が消失する遺伝子として、DRR1 を同定した。従って DRR1 は腫瘍抑制遺伝子である可能性が考えられる。一方、野生型マウスの胎児において DRR1 は神経系に広く発現しており、*in vitro* の実験からは神経細胞の生存への寄与が示唆された。本研究は、機能がほとんど未知の遺伝子である DRR1 について分子、及び個体レベルの解析を行い、腫瘍抑制遺伝子としての神経芽腫への関与と、胎児期の神経系発生・維持における役割を明らかにすることを目的とする。これら二つの間には、DRR1 を介した共通の分子機構が存在している可能性が考えられる。

3. 研究の方法

本研究では DRR1 遺伝子の機能について、「神経芽腫」と「胎児期の神経系発生・維持」という二点に注目し、分子レベル、及び個体レベルにおいて解析を行う。まず、神経芽腫に関しては、細胞株を用いて腫瘍抑制遺伝子としての活

性を検討する。神経発生・維持に関しては、主にマウス脳からの初代培養神経細胞を用い、DRR1 をノックダウン、あるいは強制発現した際の表現型を調べる。一方 DRR1 の作用機構にアプローチするために、質量分析によって結合タンパク質のスクリーニングを行う。「神経芽腫」と「胎児期の神経発生・維持」に共通して働く分子、あるいはどちらかに特異的に働く分子を同定し、それぞれにおける DRR1 の作用機構を解析する。更に、DRR1 の機能を個体レベルで解析するため、ノックアウトマウスを作成し、主に胎児期の神経発生・維持に注目して、その表現型を解析する。

1) 神経芽腫における腫瘍抑制遺伝子としての機能

神経芽腫モデルである MYCN Tg マウスの解析から、神経芽腫細胞において DRR1 の発現が消失していることが明らかになった。また、大半のヒト神経芽腫細胞株においても、DRR1 の発現が抑制されていた。この神経芽腫細胞における DRR1 の発現抑制を更に確認するため、公開されているデータベースを利用して、臨床データにおける発現傾向を検討する。次に、腫瘍抑制遺伝子としての活性を検討するため、DRR1 を発現していない神経芽腫細胞株に対して DRR1 を強制発現し、細胞増殖能や軟寒天中でのコロニー形成能へ及ぼす影響を調べる。また、DRR1 を僅かに発現している細胞株 (NB39) に対しては DRR1 をノックダウンし、その影響を検討する。神経芽腫細胞は一般的に transfection の効率が著しく低いいため、本研究においては、発現ベクターやノックダウンの為の shRNA は Lenti Virus を infection して導入する。

2) 神経系の発生・維持に対する制御機能

マウス胎児脳からの初代培養神経細胞を用いて、やはり DRR1 を強制発現、ノックダウンした際の表現型を検討することにより、正常神経細胞における DRR1 の機能を推定する。まず、神経細胞の極性について検討するために、軸索の長さや数を比較する。次に、細胞運動を検討する為にタイムラプスによる観察を行って移動距離や様式を比較する。一方、細胞骨格の構成因子との相互作用が予想されることから、actin や kinesin との結合について、免疫染色や免疫沈降で検討する。

3) 質量分析による結合タンパク質のスクリーニング

DRR1 と物理的に結合するタンパク質をマウス脳抽出液からスクリーニングする。まず、GST 融合 DRR1 タンパク質の発現ベクターを作成し、大腸菌に発現させて精製する。GST-DRR1 タンパク質を用いてマウス脳の抽出液から結合タンパク質を pull-down し、溶出したタンパク質を質量分析によって同定する。前述のように、神経細胞における軸索への局在から、細胞骨格関連のタンパク質との相互作用が予想されるが、他にも腫瘍抑制や神経系の発生・維持への関与を示

唆する候補タンパク質を選定し、機能解析を行う。まず結合そのものを確認するため、マウス胎児脳の初代培養神経細胞を用いて免疫沈降による共沈降、あるいは免疫染色での共局在を検討する。

4) ノックアウトマウスによる個体レベルでの DRR1 の機能解析

ノックアウトマウスを作成するためのターゲティングベクターを構築する。DRR1 の exon2 と exon3 を Neomycin 耐性遺伝子と LacZ レポーター遺伝子で置換するように設計し、Bacterial Artificial Chromosome から PCR によって DRR1 の相同領域をクローニングする。このターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、相同組換えを起こした ES 細胞をセレクションする。この樹立したターゲティングベクター導入 ES 細胞を用いてノックアウトマウスを作成するが、ここから先のステップは外注にて依頼する予定にしている。

4. 研究成果

1) 神経芽腫における腫瘍抑制遺伝子としての機能

腫瘍抑制遺伝子としての活性を検討するため、神経芽腫細胞株に対して DRR1 を強制発現し、細胞増殖能へ及ぼす影響を調べた。TNB-1 細胞に DRR1 を強制発現すると、細胞の増殖は抑えられることは分かった(図 1)。ま

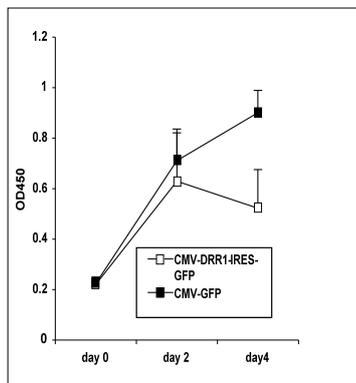


図 1

た、DRR1 を僅かに発現している細胞株 (NB39) に対しては DRR1 をノックダウンし、その影響を検討した。NB39 細胞は 5%FBS で培養すると、細胞は丸い形から neurite-like の構造に変化し、これは神経芽腫細胞の分化という現象です。DRR1 をノックダウンすると、細胞分化は抑制されることが認められた。さらに、我々は NGF, NT3, N2 を用いて、tumor sphere の分化を誘導し、RT-PCR で分化された細胞における DRR1 の発現を検討した。分化前の細胞と比べると、分化された細胞において DRR1 の発現は上昇したことを明らかにした。これらの結果、DRR1 は神経芽腫細胞の分化を調節することによって、細胞の増殖を

影響する可能性を示した。

2) 神経系の発生・維持に対する制御機能

まず、免疫蛍光染色で初代培養海馬神経において DRR1 の局在を検討した。体外培養 7 日目の海馬神経において、DRR1 はデンドライトのマーカースとする Map2 と共局在し、軸索のマーカースとする Tau1 も共局在することが認められた(図 2)。体外培養 24 日目の海馬

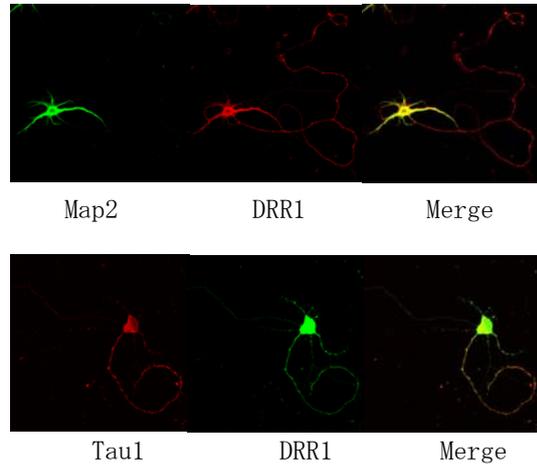


図 2

神経において、DRR1 はシナプスのマーカースとする Synapsin1 と共局在することが分かった。また、shRNA を用いて、DRR1 をノックダウンし、その影響を検討した。その結果、DRR1 をノックダウンすると神経突起は短くなることが認められた(図 3)。これらの結果、DRR1

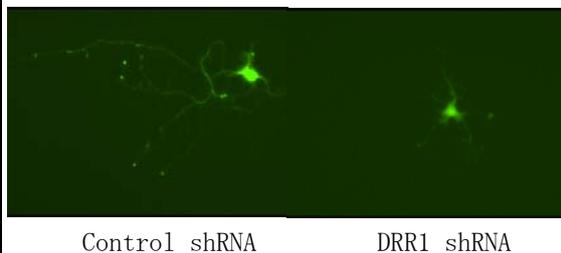


図 3

は神経突起の形成に対する影響がある可能性を示した。

3) 質量分析による結合タンパク質のスクリーニング

DRR1 と物理的に結合するタンパク質をマウス脳抽出液からスクリーニングした。まず、GST 融合 DRR1 タンパク質の発現ベクターを作成し、大腸菌に発現させて精製した。GST-DRR1 タンパク質を用いてマウス脳の抽出液から結合タンパク質を pull-down し、溶出したタンパク質を質量分析によって同定した。TMOD2(tropomodulin2)は脳内における DRR1 と物理的に結合するタンパク質として同定した。この結果を確認するために、我々は HeLa 細胞を用いて、TMOD2-flag と

DRR1-myc を共発現させて、免疫沈降を行った。その結果、TMOD2-flag と DRR1-myc は共沈殿できることが確認された。また、初代培養海馬神経細胞において TMOD2 の局在を検討した。その結果、TMOD2 は DRR1 と共局在することが認められた(図 4)。

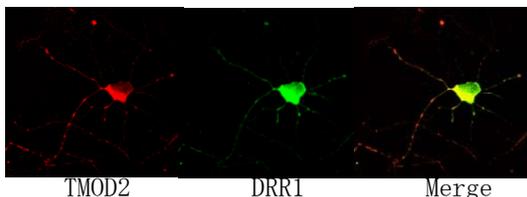


図 4

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 1 件)

Peng Huang, Satoshi Kishida, Dongliang Cao, Yuko Murakami-Tonami, Ping Mu, Masato Nakaguro, Naoshi Koide, Ichiro Takeuchi, Akira Onishi, and Kenji Kadomatsu. The Neuronal Differentiation Factor NeuroD1 Downregulates the Neuronal Repellent Factor Slit2 Expression and Promotes Cell Motility and Tumor Formation of Neuroblastoma. Cancer Res. 2011 Apr 15;71(8):2938-48、査読有

[学会発表] (計 1 件)

牟 萍、神経系における DRR1 の役割の解析、日本神経科学学会、2011 年 9 月 14 日、パシフィコ横浜。

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牟 萍 (Mu Ping)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 10584675

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし