

## 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 24 日現在

機関番号：82504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890241

研究課題名（和文）

神経芽腫の発がんにおける *MYCN* アンチセンス遺伝子（*NCYM*）の機能解析

研究課題名（英文）

Functional roles of *cis*-antisense gene of *MYCN*, *NCYM*, in human neuroblastoma

研究代表者

末永 雄介 (Suenaga Yusuke)

千葉県がんセンター（研究所）・がん治療開発グループ・研究員

研究者番号：80581793

研究成果の概要（和文）：

がん遺伝子 *MYCN* は神経芽腫で高頻度に遺伝子増幅し、神経芽腫の悪性を促進する。*MYCN* のアンチセンス遺伝子である *NCYM* は *MYCN* とともに遺伝子増幅し、過剰発現することが示されていたが、その生理的機能は明らかではなかった。本研究において、*NCYM* 遺伝子がタンパク質をコードすることを見だし、この *NCYM* タンパク質が *MYCN* を安定化することで、神経芽腫細胞の生存に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

*MYCN* oncogene is frequently amplified in neuroblastoma, and *MYCN* contributes to aggressiveness of the tumors. *NCYM* is a *cis*-antisense transcript of *MYCN* gene and is co-amplified with *MYCN* gene in unfavorable neuroblastoma. However, the functional roles of *NCYM* in neuroblastoma remain elusive. In this study, we found that *NCYM* gene encodes nuclear protein, and the *NCYM* protein stabilizes *MYCN* to maintain the cellular survival of neuroblastomas.

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	1,230,000	369,000	1,599,000
平成 23 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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：NCYM・MYCN・神経芽腫・Natural Antisense RNA・遺伝子増幅・GSK3β

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は交感神経節や副腎から発生する小児固形腫瘍であり、1歳以下の発症では外科手術のみで完治が可能ほど良好な予後を示すが、全体の約3分の2を占める1歳以上の発症では予後が悪く、長期生存率は現在

でも約30%に過ぎない。このように予後の全く異なる二種類の神経芽腫があり、年齢以外にも様々な生物学的特徴により区別できることが示されてきた。とりわけ、*MYCN* 遺伝子の増幅は予後不良群において高頻度にみられ、患者の予後に大きな影響を与える

(Brodeur *et al.*, *Science* 1984)。MYCN は他の MYC ファミリー遺伝子である c-MYC や MYCL と同様、がん遺伝子として機能し、細胞増殖の促進や分化の抑制に働く。交感神経節特異的に MYCN を過剰発現するトランスジェニックマウス(以下 MYCN tg マウス)は生後 4 ヶ月以内に全て神経芽腫を発症し、死亡することが報告されるなど(Weiss *et al.*, *EMBO J.* 1997)、MYCN 遺伝子の過剰発現は神経芽腫の発がんおよびがん進展機構に中心的な役割を担うことが明らかになっている(Brodeur *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* 2003、Nakagawara *et al.*, *Cancer Lett.* 2004)。しかし、その重要性にもかかわらず、MYCN 発現調節機構の詳細はほとんど明らかではない(Strieder *et al.*, *Cancer lett.* 2003)。

NCYM は MYCN のアンチセンス RNA として報告され(Krystal *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 1990)、神経芽腫予後不良群において MYCN と共に遺伝子増幅し、過剰発現する(Jacobs *et al.*, *BMC Cancer* 2009)。また興味深いことに、NCYM は *in vitro* 翻訳系においてタンパク質をコードする可能性が示されていたが(Armstrong *et al.*, *Cell Growth. Diff.*, 1992)、細胞内における内在性 NCYM タンパク質の存在は確かめられておらず、その生理的機能は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

我々は、これまでの研究から NCYM 遺伝子の進化的保存性は極めて低く、ヒト特異的に核内タンパク質をコードすること、神経芽腫細胞において NCYM は MYCN を転写活性化することを見出した。この独自の研究成果に基づき、NCYM の神経芽腫悪性化への寄与を分子・細胞・個体レベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウスの生体内で NCYM ががん遺伝子として機能するかを明らかにするため、まず、平成

22 年度には NCYM を交感神経節特異的に発現するトランスジェニックマウス (NCYM tg マウス) を作成し、腫瘍形成能を検討した。さらに、ヒト神経芽腫では NCYM および MYCN の両方が過剰に発現しているため、平成 23 年度には NCYM マウスと MYCN tg マウスを交配させて NCYM/MYCN tg マウスを作出し、神経芽腫悪性化への NCYM の機能を調べた。平行して *in vitro* の実験では、平成 22 年度には (1)NCYM の転写制御因子としての機能解析を行い、平成 23 年度には (2)MYCN の安定化への寄与を明らかにした。NCYM による MYCN の安定化の結果は NCYM/MYCN tg マウスから発症した腫瘍を用いて、*in vivo* においてさらに詳細な解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)NCYM の MYCN 転写活性化への寄与

神経芽腫 106 検体における NCYM mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により定量したところ、NCYM mRNA 発現量は MYCN mRNA 発現量と有意に相関し、予後不良群において高発現した。内在性 NCYM タンパク質を同定するため、抗体を作製し、神経芽腫細胞株における発現量をウェスタンブロッティング法により検討したところ、核内タンパク質として検出され、NCYM タンパク質は MYCN の増幅した細胞において高発現した。また、クロマチン免疫沈降法による解析の結果、NCYM タンパク質が MYCN のプロモーター領域に結合し、ヒストンのアセチル化を促進することで、MYCN の転写活性化に寄与することを見出した。ヒト神経芽腫細胞 CHP134 にレチノイン酸を処理すると細胞死が誘導されるが、このとき MYCN および NCYM 発現量は低下した。さらに、CHP134 細胞における NCYM ノックダウンにより MYCN の発現低下およびアポトーシスが誘導された。以上の結果から、NCYM は転写制御因子として MYCN を誘導することで、神経芽腫の悪

性化に寄与する可能性が示唆された。

(2) NCYM タンパク質による MYCN タンパク質の安定化

MYCN タンパク質の安定性は GSK3 $\beta$  によるリン酸化とそれに続くユビキチンプロテアソーム系による分解によって制御されるが、我々は NCYM タンパク質が直接的に MYCN タンパク質及び GSK3 $\beta$  に結合し、GSK3 $\beta$  による MYCN タンパク質のスレオニン 58 番目のリン酸化を阻害することを明らかにした。NCYM による MYCN スレオニン 58 のリン酸化の阻害は、ヒト神経芽腫における MYCN タンパク質の安定化を促進した。また、*NCYM/MYCN*tg マウスが自然発症する神経芽腫において、*in vitro* での結果と同様に NCYM は GSK3 $\beta$  および MYCN と結合し、スレオニン 58 のリン酸化を阻害した。さらに、*NCYM/MYCN*tg マウスにおいては、*MYCN* tg マウスに比べ遠隔転移の頻度が上昇し、生体内において *NCYM* が神経芽腫の悪性化に寄与することが示された。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 11 件)

- ① Yusuke Suenaga, Yoshiki Kaneko, Mami Yamamoto, Daisuke Matsumoto, Tomoe Ichikawa, Toshiyuki Moritan, Takehiko Kamijo, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Toshinori Ozaki, Akira Nakagawara, Transcriptional repression of MYCN is mediated by TAp63 in human neuroblastomas. American Association for Cancer Research 101st ANNUAL MEETING 2010 年 4 月 21 日 Walter E. Washington Convention Center (Washington, DC)
- ② Yusuke Suenaga, Yoshiki Kaneko, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Toshinori Ozaki, Akira Nakagawara, NCYM, a protein product of a natural antisense MYCN gene co-amplified with MYCN, targets MYCN for functional modulation and affects the prognosis of neuroblastoma, Advances in Neuroblastoma Research 2010, 2010 年 6 月 22 日 The Stockholm City Conference Centre (Stockholm)
- ③ Yoshiki Kaneko, Yusuke Suenaga, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, NCYM induces Oct3/4 expression in neuroblastoma 日本分子生物学会第 10 回春季シンポジウム 2010 年 6 月 7 日 ホテル松島大観荘 (宮城郡)
- ④ Yusuke Suenaga, Yoshiki Kaneko, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Seiki Haraguchi, Akira Nakagawara, Natural MYCN antisense gene, NCYM, functions as an oncogene in neuroblastoma through induction of MYCN 第 69 日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 23 日 大阪国際会議場 (大阪市)
- ⑤ Yoshiki Kaneko, Yusuke Suenaga, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, NCYM induces Oct3/4 expression in neuroblastoma 第 69 日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 23 日 大阪国際会議場 (大阪市)
- ⑥ Yoshiki Kaneko, Yusuke Suenaga, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, NCYM, an antisense transcript of MYCN, induces expression of reprogramming

factors in human neuroblastoma第33回  
日本分子生物学会年会, 第83回日本生  
化学会大会合同大会 2010年12月9日神  
戸ポートアイランド(神戸市)

- ⑦ 末永 雄介、金子 伊樹、松本 大介、  
中村 洋子、大平 美紀、中川原 章、  
MYCNアンチセンス遺伝子NCYMは神経芽腫  
予後不良群で高発現し、MYCNの発現を誘  
導する第26回日本小児がん学会学術総  
会 2010年12月17日大阪国際会議場(大  
阪市)
- ⑧ 金子 伊樹、末永 雄介、松本 大介、  
中村 洋子、大平 美紀、中川原 章、  
MYCNの相補鎖遺伝子産物NCYMは神経芽腫  
においてリプログラミングファクターの  
発現を誘導する第26回日本小児がん学  
会学術総会 2010年12月18日、大阪国際  
会議場(大阪市)
- ⑨ 末永 雄介、NCYMはMYCNを安定化し、神  
経芽腫悪性化に寄与する第17回神経芽  
腫研究会・症例検討会 2011年9月3日京  
都府立医科大学
- ⑩ Yusuke Suenaga, Daisuke Matsumoto,  
Yoshiki Kaneko, Mohammad Shamim  
Hossain, Atsushi Takatori, Yohko  
Nakamura, Miki Ohira, Seiki Haraguchi,  
Akira Nakagawara, NCYM stabilizes MYCN  
and contributes to aggressiveness of  
neuroblastoma, 5<sup>th</sup> International  
p63/73 workshop, 2011年9月11日-14  
日, リヨン(フランス)
- ⑪ Yusuke Suenaga, Daisuke Matsumoto,  
Yoshiki Kaneko, Mohammad Shamim  
Hossain, Atsushi Takatori, Yohko  
Nakamura, Miki Ohira, Seiki Haraguchi,  
Akira Nakagawara NCYMはMYCNを安定化し、  
神経芽腫悪性化に寄与する第70回日本  
癌学会学術総会, 2011年10月3日. 名古

屋

〔図書〕(計1件)

末永 雄介、中川原 章、羊土社、がん生物  
学イラストレイテッド、p95-p99

〔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

<http://www.chiba-cc.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 末永 雄介 (Suenaga Yusuke)  
千葉県がんセンター(研究所)・がん治療

開発グループ・研究員

研究者番号: 80581793