

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 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890242

研究課題名（和文）p53 ファミリーによる神経堤由来細胞の正常分化及び神経芽腫発生の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of differentiation of neural crest and neuroblastoma cells regulated by p53 family member

研究代表者

藤谷 昌司 (FUJITANI MASASHI)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：40376372

研究成果の概要（和文）：

小児の神経芽腫は、神経堤由来細胞から発生すると考えられている。しかしその正常分化機構もはっきりとは分かっておらず、細胞の癌化の分子機序を解明するにあたり、同時に解明すべき課題であると考えられる。そこで、神経堤由来細胞の分化を追跡するための新規実験法の確立がこの研究の主たる目的であった。当初より、胎生期の E9 から E12 にて neural tube への electroporation を行い、GFP をレポーターとして観察を行うことで、既存の交感神経節神経細胞の正常発生に関する報告が正しいことを確認したいと考えていたが、結果の再現性に乏しく、解析に足るほどまで確立されていないという否定的な結果であった。

研究成果の概要（英文）：Neuroblastoma is a pediatric tumor originated from the sympathetic nervous system and is thought to originate from a differentiation arrest of the neural crest. I have tried to establish the method to determine neural crest cells fate applied with in utero electroporation technique, but injection into neural tube was technically unfeasible to achieve, therefore I could not achieve to track neural crest cell differentiation status with reproducible results.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

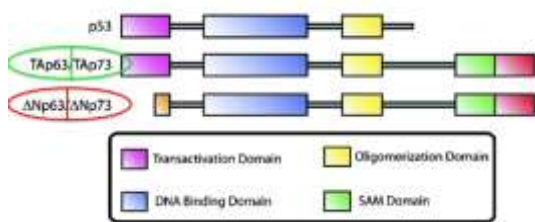
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：神経芽腫、p53、発生分化

1. 研究開始当初の背景

p53 は、多くの癌における遺伝子変異が確認されている癌抑制遺伝子として極めて重要な遺伝子であるが、これまでの遺伝子解析の結果により、p53 は、神経芽腫においては変異が全く認められず、(Nakagawara A, Prog Brain Res. 2004) p53 以外の分子の重要性も極めて重要と考えられてきた。特筆すべきことには、p53 には p63,p73 という DNA 結合領域における蛋白の相同性の高いファミリー分子が発見されている。(図1) それらは異なるプロモーターから転写される、ドミナントネガティブとして働くアミノ末端を欠く、 $\Delta Np63$, $\Delta Np73$ をもつことから、少なくともこの4者による複雑な分子メカニズムを介して正常の分化・増殖・生死の制御、及び癌化・癌細胞の増殖制御が行わ



れていることが想定されてきた。しかし、最近の正常の器官発生における知見からは p73,p63 の器官特異的な機能が明らかにされ、また更には、分化した細胞あるいは幹細胞における機能の役割分担が明らかとなってきた。(Fujitani M. et al., Current Biology(2010)) (共著)

Dugani C.B. et.al, The Journal of Neuroscience (2009), Wetzel M.K.et.al.,Neuron(2008), Tomasini.R. et.al.,Genes Dev 22(19): 2677-91. (2008))申請者は、p73 の正常及び病態時における中枢神経系での機能を明らかにしてきた。図2に示されているとおり、特に TAp73 の神経幹細胞における機能を詳細に解析し、TAp73 は FGF2 の存在下で、神経幹細胞の分化を bHLH の Hey2 を介して抑制し、自己複製を正に制御する機能が明らかにされた。

(Fujitani M. et al.,Current Biology(2010))

また、一方では、神経芽腫は、末梢神経系、特に副腎髄質・交感神経幹にほぼ特異的に発生することから、神経堤由来の細胞群、しかも末梢神経系においてもごく一部の細胞系列における細胞の癌化と考えられてきた。

(図2 緑の囲み部分に限局)しかし、臨床的な観点からは、神経芽腫は均一な臨床所見を呈するがん組織とは考えづらく、特に、自然退縮を引き起こして寛解する良性のものから、非常に悪性度の高い、既存の化学療法では根治しきれない、転移能も高く、恐らくがん幹細胞化を引き起こしてしまったであろうものまで、多様な臨床所見を呈する。しかし、既存の研究は人より採取した、培養可能な既に癌化した細胞株か、幹細胞の性質を既に獲得してしまったがん幹細胞化した細胞を用いての実験であり、実際にマウスの発生段階におけるどの細胞の異常により、癌化が起こりうるのか、あるいは、分化した細胞自体が幹細胞化する再プログラム化のイベントが起こっているのか、正常発生が明らかでない以上、これらのことを詳細に検討した研究はこれまでにほとんど無かった。

また、特筆すべき現象として、終末分化した交感神経節細胞に特異的に発現する Tyrosine Hydroxylase(以下 TH)プロモーターから転写される MycN の過剰発現マウスにおいて、生後しばらくたってから、悪性度の高い神経芽腫を発症することが既に多くの研究室で確認された。(The EMBO Journal Vol.16 No.11 pp.2985 - 2995, 1997)

しかし、その詳細なメカニズムは完全に解明されておらず、がん幹細胞化するためにはもう一段階のゲノムの変化が必要と考えられるが、現在 in vivo でそれを精密に解析した研究はほとんど見られない。

これらのことから、小児の神経芽腫の分子標的治療に向かうために、正常発生に重点を置いて、癌化の分子機構に関して、p53 ファミリー分子の関与を詳細に検討することがこの研究の最も中心となる目的となる。

2. 研究の目的

(1) 1年目、齧歯類、神経堤由来幹細胞の解析法の確立と p53 ファミリー分子によるその制御機構の解明

発生時期における中枢神経系の解析では、in utero electroporation(以下 IUE)法を用いた fate mapping による分子メカニズムの解明がこの数年で多数行われてきた。そこで、IUE の利点を生かし、末梢神経系の特異的に、交感神経節の正常発生を明らかにすることを1年目の目標とする。(図3)そして、p53 ファミリー分子の発現を確認後、遺伝子ノック

ダウンをそれぞれのファミリー分子特異的な shRNA

vector にて行い、正常における p53 ファミリー分子がどの細胞の何を制御しているのか (分化、増殖、細胞死等) を明らかにする。

(2) 2年目、正常における発生過程に関する知識を基盤として、神経芽腫が in vivo でどの細胞から起こってくるのかそのメカニズムの解明を行っていく。

具体的には、TH-MycN あるいは神経堤に特異的に発現する WNT1 プロモーターによる MycN の過剰発現ベクター(WNT1-MycN)を同様の IUE 法にて過剰発現させると同時に、p53 ファミリー分子をノックダウンすることで、癌幹細胞化が誘導されるのか、また、もしされるなら加速されるか、悪性化するかどうかなどを in vivo で解析する。

3. 研究の方法

(1) in utero electroporation (IUE)法を用いた神経堤由来幹細胞の in vivo における発生・分化機構を解明するための新規実験法の確立。

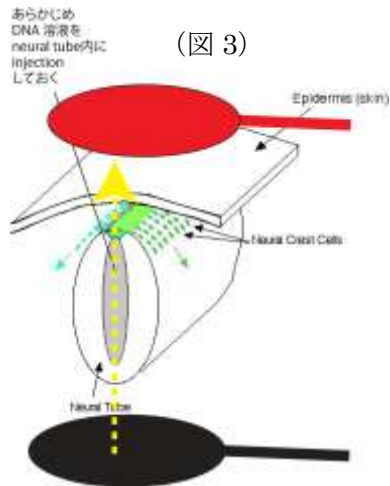
胎生期の E9 から E12 の間にて neural tube への electroporation を行い、GFP をレポーターとして観察を行うことで、既存の交感神経節神経細胞の正常発生に関する報告が正しいことを確認する。

(2) 上記 IUE を用いた正常発生における p53 ファミリー分子の神経堤由来幹細胞制御機構の解明

まず初めに、p53 ファミリー分子がどの細胞で発現が豊富かということに関して、既知のマーカーターとの免疫染色、in situ hybridization を中心に解析する。GFP レポーターとの二重染色によって、移動中の細胞においても容易に観察が可能である。p53 ファミリー分子の条件特異的な shRNAvector を用いることで、細胞特異的な RNAi を可能にし、正常発生における役割を明らかにする。

(3) 上記 IUE を用いた、in vivo における神経堤由来末梢神経細胞癌化のメカニズムの解明

更には、p53 ファミリー分子の癌化におけるメカニズムを p53 ファミリー分子の



(図 3)

shRNAvector と TH-MycN 過剰発現あるいは WNT1-MycN 過剰発現ベクターとの併用により、明らかにする。長期観察が必要な場合は、PiggyBac vector を用いて、ゲノムへの組み込みを可能にする。幹細胞マーカーターの発現を解析することで、がん幹細胞化との関連を in vivo で確認することが可能であるし、GFP レポーターによる転移巣の解析といった、発展的な検討も可能である。

4. 研究成果

残念ながら、当初予定していた、neural tube への電気穿孔法による遺伝子導入は、技術的な困難さのために、達成することが出来なかった。

更に、バックアッププランとしての全胚培養法による遺伝子導入も試みたが、再現性のある結果は得られなかった。

ただ、研究期間内に、p53 ファミリー分子の一つ p73 に関する新しい知見が得られたので、それについても報告する。(Fujitani M. et al., Current Biology 2010)

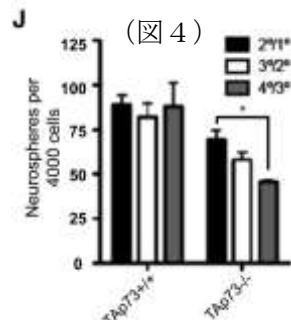
申請者は、p53 ファミリー分子の一つ p73 の研究を精力的に行ってきた。p73 には大きく分けて二つのアイソフォームが有り、それぞれ、全長型の TAp73、そしてアミノ末端欠失型の ΔNp73 である。(図 1)

そこで、我々は、TAp73 のみを欠失させることのできるノックアウトマウスを用いて神経幹細胞の自己複製能や分化能について検討を行った。海馬の歯状回より単離培養した神経幹細胞の自己複製能を評価したところ、TAp73 がないと神経幹細胞は非生理的分化を引き起こし、増殖状態を保つことが出来無ことが分かった。

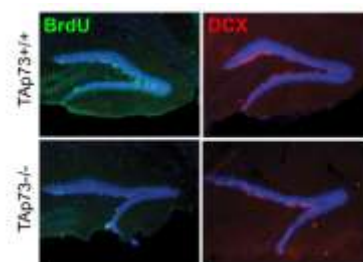
(図 4)そして、その神経幹細胞への影響により、成体の海馬において、BrdU 陽性細胞や、DCX 陽性新生神経細胞が時間経過と共に減少していくことが分かった。

(図 5)

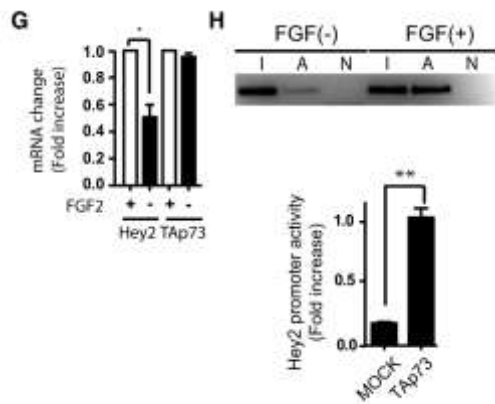
これらことから、TAp73 は神経幹細胞の維持に重要な遺伝子であり、さらに、そのシグナルは



(図 5)



FGFの下流でTAp73がHey2のプロモーターを活性化することによることを明らかにした。
(次頁) (Fujitani M. et al., Current Biology 2010)



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)

①Fujitani M., DuganiCB, Weaver IC, Gauthier,FA, Paquin,A, WojtowiczM, TakMW, Miller,FD and KaplanDR“TAp73 acts via the bHLH Hey2 to promote self-renewal of CNS neural stem cells.” Current Biology. Nov23; 20(22):2058-65.2010 (査読有)

[学会発表] (計1件)

①平成23年9月16日 第34回日本神経科学大会 パシフィコ横浜
口演：TAp73はbHLH Hey2を介して神経前駆細胞の未分化性を維持する 発表者：藤谷昌司

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤谷 昌司 (MASASHI FUJITANI)
大阪大学・連合小児発達学研究所・助教
研究者番号：40376372