

令和 6 年 5 月 27 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：2022～2023

課題番号：22K20791

研究課題名（和文）GREB1を軸とした小児固形がん発症シグナルの解明

研究課題名（英文）GREB1-signaling in promoting tumorigenesis of pediatric cancer

研究代表者

原田 昭和（HARADA, Akikazu）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30963350

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は小児がんである神経芽腫をモデルに、GREB1のがん発症・悪性化における生物学的役割を示し、成人がんに比べ少ない遺伝子変異によって小児がんが発症する分子機序を解明することを目的とするものである。神経芽腫においてGREB1は、MYCN遺伝子の増幅と、特定の神経芽腫サブタイプを背景として発現することが分かった。またGREB1はヒストン脱メチル化酵素と相互作用し、神経芽腫のアイデンティティを制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児がんにおいても、成人がんと同様にゲノム解析や遺伝子発現解析といった網羅的なデータが蓄積されてきたが、それらの異常がどのように連続的に関連するのか、その分子実体は不明のままである。そのため、介入可能な標的分子の同定が難しく、小児がんにおいて使用可能な分子標的治療薬が現状では少ない。本研究は小児がん特有の発がん機構を分子レベルで明らかにすることで、成人がんと異なる治療戦略を開発する端緒となりうる点で大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：This study aims to demonstrate the biological role of GREB1 in cancer development, especially in neuroblastoma, and to elucidate the molecular mechanisms of tumorigenesis in pediatric cancers, which progress without accumulating many genetic mutations as in adult cancer. In neuroblastoma, GREB1 was found to be expressed under MYCN gene amplification and a specific neuroblastoma subtype. GREB1 also interacts with histone demethylases and switches the identity of neuroblastoma by regulating transcription.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：小児がん 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

がんゲノム解析が盛んに行われるようになり、がんの発生や進展に寄与するゲノム異常が幅広く知られるようになった。成人がんにおいては多くの遺伝子変異が蓄積し、多段階的にがんが発生する機序が明らかになった。一方で、小児固形がん(以下、小児がん)では遺伝子変異の蓄積が明らかに少ないこともわかった。また小児がんは潜伏期間が短く、増殖も速く、成人がんとは発症の機序が異なると考えられている。つまり、小児がんにおいて、少ない遺伝子変異でがんの発症や悪性化を促進するシステムが存在する可能性がある。一方、ゲノム解析と同様に、トランスクリプトーム解析やエピゲノム解析も大規模に行われるようになってきた。バイオマーカーとなる異常な遺伝子発現やエピゲノム異常が判明し、網羅的なデータの多層的な相関関係も考えられるようになった。ところが、それらの異常がどのように連続的に関連するのか、その分子実体は不明のままである。そのため、介入可能な標的分子の同定が難しく、小児がんにおいて使用可能な分子標的治療薬は現状少ない。そこで、小児がんにおいて、少ない遺伝子変異でがんが発症する分子機序を明らかにしたいと考えた。

研究代表者らはこれまで、成人がんの発症・悪性化の分子機序の解明にあたり、Wnt シグナルに関連した新たながんシグナル経路をいくつか同定してきた。その中で GREB1 は新規の Wnt シグナル標的遺伝子として同定したものであり、腫瘍促進的に機能するものと考えられた。一方で GREB1 は、小児がんのうち頻度の高い神経芽腫において高発現し、腫瘍増殖に寄与することが分かった。ところが予備的検討の結果、神経芽腫では Wnt シグナルに関連した遺伝子変異を伴っておらず、また GREB1 は Wnt シグナル非依存的に高発現していることが分かった。成人がんとは異なるがん発症機構の存在が示唆され、神経芽腫はそれを示すよいモデルになると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、小児がんである神経芽腫をモデルに、GREB1 のがん発症・悪性化における生物学的役割を示し、遺伝子変異を多く伴わずに小児がんが発症する分子機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

上記目的を遂行するために、以下の3点の方法を用いた。

(1) GREB1 の発現制御機構の解明

GREB1 (2p25.1) は MYCN (2p24.3) と近接した遺伝子座に位置することから、公開データセットを用いて両遺伝子が共増幅するかを調べる。また、臨床検体データベースを利用して MYCN 増幅症例で GREB1 が高発現するかどうかを確認する。次に神経芽腫細胞株を用いて、MYCN 増幅と GREB1 の発現の間に相関関係があるかを調べる。さらに、神経芽腫やその発生母地となる正常胎児副腎を構成する細胞のシングルセル RNA シーケンスのデータの解析を行い、正常から腫瘍発生における GREB1 の発現プロファイルを明らかにする。

(2) GREB1 の作用機構の解明

神経芽腫における GREB1 による増殖制御の分子実体を明らかにするため、TurboID を用いた近接依存性標識法による相互作用タンパク質スクリーニングを行う。神経芽腫細胞株において GREB1-TurboID を安定発現させ、GREB1 の相互作用タンパク質を生細胞内でビオチン標識する。ビオチン標識されたタンパク質のみを特異的に濃縮し、抽出されたタンパク質についてラベル化法による定量的プロテオーム解析を施行する。候補タンパク質のうち GREB1 が局在する核内で機能しうるものを選択し、GREB1 の作用機構を明らかにする。

(3) GREB1 の治療標的としての妥当性の検証

MYCN を過剰発現する神経芽腫モデルマウスに対して、生体内で GREB1 の発現を抑制可能なアンチセンス核酸 (ASO) を投与し、腫瘍形成に対する影響を評価する。

4. 研究成果

(1) GREB1 の発現制御機構の解明

高リスク神経芽腫 556 症例のコピー数プロファイルのデータセットの解析の結果、MYCN 遺伝子と GREB1 遺伝子の共増幅症例が確認された(図1)。また MYCN 増幅症例では GREB1 の発現が有意に高かった。また神経芽腫細胞株のデータセット、ならびに研究代表者らの所有する 11 細胞株を用いた解析より、MYCN 増幅症例では GREB1 の mRNA/タンパク質の発現が有意に高かった。さらに神経芽腫細胞株のサブタイプのうち、N 型 (ADRN 型) において GREB1 の発現が明らかに高いことが分かった(図1)。GREB1 の発現には MYCN の増幅、そして神経芽腫サブタイプが寄与していることが明らかとなった。次に、神経芽腫の発生母地であるヒト胎児副腎組織とヒト神経芽腫の

シングルセル RNA-seq データのメタ解析を行ったところ、GREB1 の発現は sympathoblast に特異的な遺伝子群の発現と相関しており、特に sympathoblast とプロファイルの類似する神経芽腫サブタイプでの発現が高かった。Sympathoblast は神経芽腫細胞株の N 型サブタイプと類似した遺伝子発現パターンを有しており、GREB1 の発現プロファイルについて細胞株のデータと一致した所見であると考えられた。

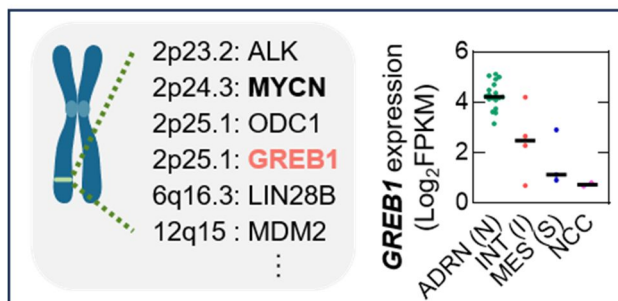


図 1 : (左) 神経芽腫において MYCN と共増幅する遺伝子、(右) 神経芽腫サブタイプと GREB1 の発現

(2) GREB1 の作用機構の解明

(1) の成果より MYCN の発現異常が GREB1 の発現に影響することが判明した。生理的な発生過程において、MYCN は神経芽腫の起源である神経堤細胞系統の運命決定に関与していることが知られており、MYCN により発現誘導される GREB1 が神経芽腫の細胞系譜の制御に関わる可能性が考えられた。そこで GREB1 による神経芽腫のアイデンティティー制御機構を明らかにするため、神経芽腫細胞株 IMR-32 細胞を用いた近接依存性標識法による相互作用タンパク質スクリーニングを行った。その結果、GREB1 の新規相互作用タンパク質としてヒストン脱メチル化酵素を同定し、免疫沈降法においても両タンパク質の結合を確認した(図 2)。さらに GREB1 や上述のヒストン脱メチル化酵素のゲノム DNA との相互作用を介在する分子として、新たに転写因子を同定した。この転写因子は神経芽腫のサブタイプを規定するマスター転写因子の一つと考えられており、GREB1 が神経芽腫のアイデンティティーの決定に寄与する可能性が示唆された。

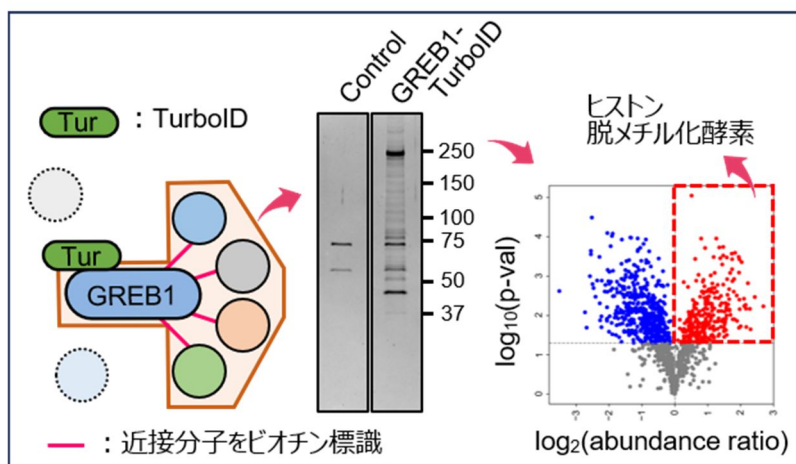


図 2 : 近接依存性標識法を用いた新たな GREB1 相互作用タンパク質の同定

(3) GREB1 の治療標的としての妥当性の検証

MYCN を過剰発現する神経芽腫モデルマウス (Th-MYCN マウス) を導入し、正常交感神経節と比較し、神経芽腫腫瘍部では Greb1 の発現が亢進していることを確認した(図 3)。次にマウス Greb1 に対するアンチセンス核酸 (ASO) を Th-MYCN マウスに投与した。ところが十分な腫瘍抑制効果が得られず、ASO による Greb1 遺伝子の発現抑制効果が不十分であることが原因と考えられた。現在 GREB1 が治療標的になりうるか明らかにするため、生体内での GREB1 の発現をより効率よく抑制可能なアンチセンス核酸の開発を進めている。一方、当初の計画からさらに発展し、Greb1 ノックアウトマウスを作製し、前述の Th-MYCN マウスと交配することで、神経芽腫発生における GREB1 の機能を明らかにしようと考えた。Greb1 ノックアウトマウスは樹立できたものの、雌個体については生殖機能が一部障害されていることが判明した。ただ個体作製は順調に進んでおり、GREB1 が治療標的として有用かどうかについて今後評価が可能であると考えている。

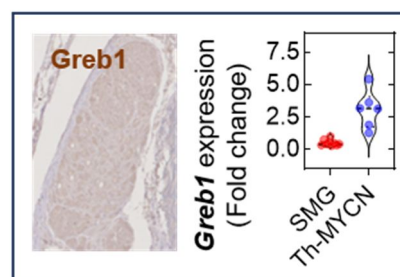


図 3 : (左) Th-MYCN マウスに発生した腫瘍部における Greb1 の発現、(右) 正常上腸間膜交感神経節 (SMG) と腫瘍部における Greb1 の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto Shinji, Harada Akikazu, Seta Minami, Akita Masayuki, Gon Hidetoshi, Fukumoto Takumi, Kikuchi Akira	4. 巻 83
2. 論文標題 Wnt Signaling Stimulates Cooperation between GREB1 and HNF4 to Promote Proliferation in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2312 ~ 2327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-22-3518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinzawa Koei, Matsumoto Shinji, Sada Ryota, Harada Akikazu, Saitoh Kaori, Kato Keiko, Ikeda Satsuki, Hirayama Akiyoshi, Yokoi Kazunori, Tanemura Atsushi, Nimura Keisuke, Ikawa Masahito, Soga Tomoyoshi, Kikuchi Akira	4. 巻 42
2. 論文標題 GREB1 isoform 4 is specifically transcribed by MITF and required for melanoma proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 3142 ~ 3156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-023-02803-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 原田昭和、松本真司、菊池章
2. 発表標題 GREB1を軸とした小児固形がん発症シグナルの解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田昭和、菊池章
2. 発表標題 Wnt5aはがん微小環境において線維芽細胞のサブタイプを制御することで腫瘍増殖を促進する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akikazu Harada, Takeshi Harada, Yoshiaki Yasumizu, Akira Kikuchi
2. 発表標題 Wnt5a regulates cellular state of specific subtype of fibroblast and accelerates tumor progression.
3. 学会等名 Wnt 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinji Matsumoto, Akikazu Harada, Akira Kikuchi
2. 発表標題 GREB1 drives HNF4 -dependent oncogenic transcription and tumor growth in Wnt signal-activated hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 Wnt 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田武志、原田昭和、香山尚子、佐藤朗、菊池章
2. 発表標題 AOM/DSS大腸がんマウスモデルにおいて、Wnt5aは線維芽細胞サブタイプを制御する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本真司、原田昭和、瀬田みなみ、権英寿、福本巧、菊池章
2. 発表標題 GREB1によるHNF4 を介したWntシグナル活性化型肝細胞がんの増殖制御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池章、松本真司、新澤康英、原田昭和
2. 発表標題 ホルモン非依存性悪性腫瘍におけるGREB1の発現制御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新澤康英、松本真司、佐田遼太、原田昭和、種村篤、二村圭祐、伊川正人、曾我朋義、菊池章
2. 発表標題 悪性黒色腫におけるMITF依存的なGREB1アイソフォーム4の発現は、ピリミジン合成を介して細胞増殖を促進する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池章、松本真司、新澤康英、佐田遼太、原田昭和
2. 発表標題 GREB1を介する新規がんシグナル経路は分子標的となる
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田昭和、菊池章
2. 発表標題 大腸がんにおける腫瘍環境特異的がん関連線維芽細胞の実体とその制御
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊池章、松本真司、原田昭和
2. 発表標題 Wntシグナル活性型肝がん和大腸がんにおける細胞増殖分化機構と遺伝子発現制御
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関