

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249061

研究課題名(和文) ヒト神経芽腫MYCN/NCYMマウスモデル構築による大規模分子標的創薬

研究課題名(英文) Generation of the MYCN/NCYM mouse model and the drug discovery for human neuroblastoma

研究代表者

中川原 章 (Nakagawara, Akira)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50117181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：わが国における小児がんの治癒率は約80%に達した。しかし、その中で進行神経芽腫の治癒率は低く、国際的にも治療薬に貧乏しているのが現状である。そこで、我々は高リスク神経芽腫に対する治療薬の開発を展開した。その結果、独自に見出した標的分子であるTrkB, ALK/ShcCに対する低分子阻害剤を複数同定し、特にTrkBを抑制する低分子阻害剤候補に関しては、in vivoにおける効果も確認した。また、NLRR1に対する治療用単クローン抗体の精製にも成功した。さらに、ヒト神経芽腫に似た腫瘍を発生するNCYM/MYCNダブルトランスジェニックマウスを作成し、新しい抗がん剤スクリーニング系を確立した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed new drugs against high-risk neuroblastoma. By targeting TrkB and ALK/ShcC proteins, we successfully identified more than several small chemical compounds that efficiently kill neuroblastoma cells. In addition, the candidate therapeutic monoclonal antibodies targeting NLRR1 were also generated. Furthermore, the NCYM/MYCN double transgenic mice we generated revealed to be suitable for screening new candidate drugs against high-risk human neuroblastoma.

研究分野：小児外科学分野

キーワード：創薬 神経芽腫 in silico screening TrkB ALK ShcC NCYM MYCN

## 1. 研究開始当初の背景

最近の治療法の進歩により、小児悪性腫瘍の治癒率は著しく向上したが、進行神経芽腫や脳腫瘍などの治癒率はあまり改善がなく、国際的にも大きな問題となっている。しかしながら、小児がんに対する新薬開発は、症例数が絶対的に少ないこと、研究者が少ないこと、研究費の獲得が困難なことなど、困難を極め、国際的にも進展が見られなかった。そこで我々は、これまでに行ってきた神経芽腫の遺伝子異常、遺伝子発現、ゲノム異常等の網羅的な解析から、悪性化に関与する複数の新規神経芽腫関連遺伝子を同定し、それらを標的とした新規低分子化合物阻害剤のスクリーニング及び治療用抗体の開発を行うこととした。

## 2. 研究の目的

近年、小児悪性腫瘍の治癒率は80%近くに達したが、ゲノム不安定性に伴う染色体・ゲノム構造異常が明らかな小児がんの予後は未だに悪く、新しい治療法が開発が喫緊の課題になっている。とくに、小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度の高い神経芽腫は、進行例が65%を占め、なかでも MYCN (N-myc) がん遺伝子が増幅した腫瘍の予後は未だ30%と極めて悪く、緊急の治療法開発が待たれる。そこで、我々は、我々が発見した MYCN cis-trans antisense gene である”NCYM”のトランスジェニックマウスを作成し、W. Weiss らが開発した従来の MYCN トランスジェニックマウスと掛合わせて、よりヒト神経芽腫に近い転移能を有するマウスモデルを作成し、ヒト高リスク神経芽腫に対する治療薬スクリーニング及び創薬の基盤形成を目指す。また、300万個の低分子化合物ライブラリーの中から、TrkB, ALK, ShcC, NCYM 等を標的とする低分子阻害剤をスクリーニングし新薬候補の探索を行うとともに、我々が見出した神経芽腫の悪性化に関与する NLRR1 膜蛋白質を標的とする抗体治療薬の開発を行い、新規分子標的治療薬による難治性神経芽腫の克服を目指した。

## 3. 研究の方法

### 1) 低分子化合物の分子イメージングスクリーニングと in vitro 解析

300万個の低分子化合物ライブラリーのスクリーニングは、*in silico* Autodock screening (IBM 社の国際社会貢献プロジェクト)法を用いた。標的分子としては、神経芽腫の悪性化に関与する TrkB, ALK, ShcC, NCYM を対象とした。Autodock energy ranking の上位数十個の中から、入手できる市販化合物を用いて、IC50 値の確定、細胞増殖阻害のタイムコース、多種類の神経芽腫細胞株における増殖抑制、浸潤能・コロニー形成能、細胞死シグナルの同定 (TUNEL 染色、p53, p38, JNK 等の検索)等の解析を行

った。

### 2) 神経芽腫標的分子の分子構造的機能解析と細胞内シグナル伝達

TrkB, ALK, NLRR1 に関しては細胞膜受容体としての細胞増殖調節に関わる分子機能の解析、ShcC と LMO3 に関しては、NB39nu 細胞を用いて、細胞内シグナル伝達と細胞周期制御の機構を分子生物学的手法を用いて解析した。TrkB については、標的領域を BDNF 結合領域に設定したので、BDNF による候補化合物による増殖阻害の解除に関し分析した。

### 3) NLRR1 抗体治療薬の開発

精製した NLRR1 細胞外領域蛋白をフロイントアジュバントと共にマウスに注入後リンパ節を採取し、P3U1 ミエロマ細胞との融合細胞を作成して、その培養上清から NLRR1 に結合する抗体を、フローサイトメーターを用いてスクリーニングした。陽性融合細胞の培養上清から、単クローン抗体を精製した。また、細胞増殖抑制実験には、主に NLRR1 を発現する SH-SY5Y 細胞を用いた。

### 4) 新規 MYCN/NCYM 二重トランスジェニックマウスの作製

NCYM トランスジェニックマウスの作製には、pGEM7z (f+)-FLAG-NCYM] plasmid を用い、129/SvJxC57BL/6J マウス由来受精卵の核内に注入した。ダブルトランスジェニックマウス作製は、hemizygous MYCN トランスジェニックマウスと hemizygous NCYM トランスジェニックマウスをかけた。

### 5) MYCN/NCYM モデルマウスを用いた薬剤スクリーニング

生後約30日のトランスジェニックマウスの腹部を触り、腫瘍を触知できた段階で NVP-BEZ235 (Cayman Chemical, USA)の 30 mg/kg を 30 日間毎日経口投与した。

## 4. 研究成果

### 1) 新規 TrkB を標的とした低分子阻害剤の開発

*In silico* target fishing approach により 300万個の合成低分子化合物ライブラリーを用いて、TrkB の BDNF 結合部位に結合しその機能を抑制する化合物のスクリーニングを行い、Docking energy 上位の化合物 60 個の中から、TrkB を発現する神経芽腫細胞株を低濃度で殺す化合物を探索した。その結果、IC-50 値が 0.1~3.5 $\mu$ M を示す 7 個を見出した。さらに、最も低い IC-50 値を示す 2 つの化合物 (A と G) に関し、神経芽腫のマウスゼノグラフトモデルを用いて *in vivo* における腫瘍増殖抑制効果を調べたところ、有意に腫瘍増殖を抑制し、明らかな副作用は認められなかった。また、これらの構造をもとにさらに新しい化合物を作製し、IC-50 値が 0.008 $\mu$ M を示すものを見出した。一方、神経芽腫細胞を用いてこの 2 つの化合物の細胞死誘導機構を解析したところ、PARP の分解、

caspase9 の cleavage による活性化、及び p53 の活性化が認められた。

しかし、今後第 1 相臨床試験へ持って行くためには、*in vivo* 毒性試験、血中動態、作用の特異性、肝臓などでの代謝の有無、腫瘍内薬物集積の効率など、クリアすべき課題は山積している。現在、同定した候補分子の構造から、さらに低い IC-50 値を示す新規化合物の作成を進めている。

#### 2) ALK, ShcC を標的とした低分子阻害剤の開発

我々は、神経芽腫においては ALK と ShcC が特異的に活性化されており、ShcC の 2 つのドメインに ALK が結合していることを推定していた。そこで、その結合を阻害する低分子化合物を 300 万個のライブラリーから *in silico* Autodock screening により同定し、NB39nu 細胞株を用いた細胞死誘導スクリーニングから、PTB ドメインに対し 3 個、SH2 ドメインに対し 7 個同定した。IC-50 は、前者で 21~46  $\mu$ M、後者で 4.5~24  $\mu$ M であった。NCYM に関しては、現在 3 次元構造から機能ドメインの策定及び標的ポケットの構造解析を行っている。

今後、*in vivo* における抗腫瘍効果の分析が必要である。大部分の高リスク神経芽腫においては、ALK の変異が無くても ALK/ShcC が活性化されているため、同定したこれらの分子は神経芽腫に対する新規抗がん剤として開発される可能性を十分有していると思われる。

#### 3) 新規膜蛋白質 NLRR1 に対する抗体治療薬の開発

我々が同定したヒト NLRR ファミリーは、NLRR1 が神経芽腫の悪性を促進して高リスク腫瘍に高発現し、NLRR3 は分化誘導を促進して予後良好な腫瘍に高発現することを見出した。したがって、前者の治療薬開発として NLRR1 に対する単クローン抗体を作製してスクリーニングしたところ、神経芽腫細胞の増殖を抑制するクローンを見出した。また、EDFR 阻害剤である AG1478 と併用したところ、細胞増殖抑制作用は有意に増強された。また、候補抗体と NLRR1 の結合部位もエピトープマッピングにより明らかになった(未発表)。

#### 4) NCYM による MYCN 機能抑制機構

神経芽腫細胞株を用いて、NCYM 蛋白が MYCN 蛋白の分解を促進し、抗アポトーシス蛋白である Myc-nick 産生を促進することを見出した。また、この蛋白分解は Calpain を介するものであることを明らかにした。さらに、NCYM と Myc-nick は細胞周期の G2/M 期に増加し、NYCM をノックダウンすると Myc-nick 発現量の低下とアポトーシスの誘導が見られた。したがって、NCYM 蛋白の阻害剤開発が新たな創薬に繋がるのが期待される。現在、*in silico* による TrkB 阻害剤スクリーニングと同様の方法で、NCYM 阻害剤の開発を進めている。

#### 5) NCYM/MYCN トランスジェニックマウスモデルの作製

UCLA グループが開発した MYCN トランスジェニックマウスは高頻度に神経芽腫を発生するが、ヒト神経芽腫と異なり、遠隔転移の頻度は極めて低い。一方我々は、NCYM トランスジェニックマウスを作製したが、マクロなフェノタイプの異常は見られず、神経芽腫の発生も無かった。そこで、MYCN と NCYM のダブルトランスジェニックマウスを作製したところ、高頻度に神経芽腫を発生し、しかもヒト神経芽腫に類似した遠隔転移を高頻度に発生した(4.5% vs. 29~67%)。ちなみに、NCYM はヒトとチンパンジーにのみ存在し、マウスには発現していない。次に、PI3K/mTOR dual inhibitor である NVP-BEZ235 を投与したところ、MYCN トランスジェニックマウスに発生した神経芽腫には著効しその増殖を著しく抑制したものの ( $p < 0.01$ )、MYCN/NCYM のダブルトランスジェニックマウスに発生した神経芽腫にはほとんど無効であった ( $p = 0.648$ )。したがって、高リスク神経芽腫に対する新規抗がん剤のスクリーニングに最適のモデルマウスになることが期待される。

以上のように、本研究により、現在でも難治性である高リスク神経芽腫に対する新薬候補となるシーズを独自に複数開発同定し、さらに、そのスクリーニングのための最適モデルマウスを作成することができた。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 14 件)

1. Hossain S, Takatori A, Nakamura Y, Suenaga Y, Kamijo T, Nakagawara A. NLRR1 enhances EGF-mediated MYCN induction in neuroblastoma and accelerates tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* (2012) 72(17):4587-96.
2. Hasan MK, Nafady A, Takatori A, Kishida S, Ohira M, Suenaga Y, Hossain S, Akter J, Ogura A, Nakamura Y, Kadomatsu K, Nakagawara A. ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci Rep.*(2013) 3:3450.
3. Ando K, Ozaki T, Hirota T, Nakagawara A. NFBD1/MDC1 is phosphorylated by PLK1 and controls G2/M transition through the regulation of a TOPBII $\alpha$ -mediated decatenation checkpoint. *PLoS One* (2013) 8(12):e82744.
4. Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor

- depletion-induced neuroblastoma regression. *J Clin Invest.* (2013) 123(7):2935-47.
5. Yamaki T, Suenaga Y, Iuchi T, Alagu J, Takatori A, Itami M, Araki A, Ohira M, Inoue M, Kageyama H, Yokoi S, Saeki N, Nakagawara A. Temozolomide suppresses MYC via activation of TAp63 to inhibit progression of human glioblastoma. *Sci Rep.* (2013) 3:1160.
  6. Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, Ohira M, Kamiyo T, Kondo S, Fujii Y, Nakagawara A. Novel adaptor protein Shf interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma. *Cancer Sci.*(2013)104(5):563-72.
  7. Wu D, Ozaki T, Yoshihara Y, Kubo N, Nakagawara A. Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) stimulates tumor suppressor p53 protein in response to DNA damage through complex formation and acetylation. *J Biol Chem.* (2013) 288(2):1353-64.
  8. Akter J, Takatori A, Islam MS, Nakazawa A, Ozaki T, Nagase H, Nakagawara A. Intracellular fragment of NLRR3 (NLRR3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* (2014) 453(1): 86-93.
  9. Nakamura Y, Suganami A, Fukuda M, Hasan MK, Yokochi T, Takatori A, Satoh S, Hoshino T, Tamura Y, Nakagawara A. Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Med.* (2014) 3(1):25-35.
  10. Suenaga Y, Islam SM, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shibata T, Nakamura Y, Ohira M, Haraguchi S, Takatori A, Nakagawara A. NCYM, a Cis-antisense gene of MYCN, encodes a de novo evolved protein that inhibits GSK3 $\beta$  resulting in the stabilization of MYCN in human neuroblastomas. *PLoS Genet.* (2014) 10(1):e1003996.
  11. Yu F, Gao W, Yokochi T, Suenaga Y, Ando K, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A. RUNX3 interacts with MYCN and facilitates protein degradation in neuroblastoma. *Oncogene* (2014) 33(20):2601-9.
  12. Shoji W, Suenaga Y, Kaneko Y, Islam SM, Alagu J, Yokoi S, Nio M, Nakagawara A. NCYM promotes calpain-mediated Myc-nick production in human MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2015) 461(3):501-6.
  13. Kaneko Y, Suenaga Y, Islam SM, Matsumoto D, Nakamura Y, Ohira M, Yokoi S, Nakagawara A. Functional interplay between MYCN, NCYM, and OCT4 promotes aggressiveness of human neuroblastomas. *Cancer Sci.* (2015) doi: 10.1111/cas.12677.
  14. Tatsumi Y, Takano R, Islam MS, Yokochi T, Itami M, Nakamura Y, Nakagawara A. BMCC1, which is an interacting partner of BCL2, attenuates AKT activity, accompanied by apoptosis. *Cell Death Dis.* (2015) 6:e1607.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

中川原 章 (NAKAGAWARA Akira)  
九州大学 医学研究院 共同研究員  
研究者番号 : 50117181

### (2)研究分担者

大平 美紀 (OOHIRA Miki)  
千葉県がんセンター (研究所)・がんゲノム  
研究室・室長  
研究者番号 : 20311384

### (3)連携研究者

高取 敦志 (TAKATORI Athushi)  
千葉県がんセンター (研究所)・がん遺伝創  
薬研究室・研究員  
研究者番号 : 40455390  
中村 洋子 (NAKAMURA Youko)  
千葉県がんセンター (研究所)・がん予防セ  
ンター・主席研究員  
研究者番号 : 60260254  
末永 雄介 (SUENAGA Yusuke)  
千葉県がんセンター (研究所)・臨床ゲノム  
研究室・研究員  
研究者番号 : 80581793