

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590372

研究課題名(和文) 神経芽腫における自然退縮の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the spontaneous regression of neuroblastoma

研究代表者

井上 純 (Inoue, Jun)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師

研究者番号：50568326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫における腫瘍自然退縮に関する詳細な分子メカニズムは不明である。これまで、細胞内小胞に局在するLAPTM5遺伝子産物の蓄積により誘導される細胞死が神経芽腫の自然退縮に深く関与する可能性を見出してきた。しかしながら、その生理的機序はほとんど分かっていなかった。本研究により、LAPTM5の量的制御機構およびLAPTM5誘導性細胞死の生理的機序の一端を明らかにした。このことは、腫瘍自然退縮の分子メカニズムをより詳細に理解し、新たな治療法の確立に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of spontaneous regression of neuroblastoma (NB) is largely unknown. I have previously demonstrated that the cell death mediated by accumulation of LAPTM5 protein might be closely associated with this event. However, it is unclear for its physiological significance. With the support of this grant, I clarified the mechanism to regulate LAPTM5 expression and induction of cell death. These findings may be valuable knowledge for understanding of molecular mechanism for tumor regression, as well as development of new therapeutic strategy.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：神経芽腫 自然退縮 細胞死

1. 研究開始当初の背景

癌には、無治療でも腫瘍が自然に消退するものがある。この「腫瘍の自然退縮現象」が高頻度に起こる癌として、神経芽腫 (Neuroblastoma; NB) が知られているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。NB は、腹部交感神経節や副腎髄質に発生する最も頻度の高い小児固形癌である。1才未満で発見される NB は、組織学的に細胞死・分化傾向が認められ、無治療でも数ヶ月の経過観察により、腫瘍が高頻度に自然退縮する。一方、1才以上で発見される NB は、腫瘍が自然退縮することなく、予後不良である。従って、予後良好 NB で起きる自然退縮の分子メカニズムを解明することは、予後不良 NB に対して (NB 以外の癌種に対しても) 本来備わっていた腫瘍退縮プログラムに基づく、副作用の少ない、人為的な腫瘍退縮を促す方法の確立に繋がると考えた。

以前の研究により、我々は、細胞内小胞に局在する LPTM5 (Lysosomal-associated protein multispreading membrane 5) 遺伝子産物の蓄積により誘導される細胞死 (LPTM5 誘導性細胞死) が NB の自然退縮に深く関与する可能性を見出してきた。しかしながら、LPTM5 の量的制御機構および LPTM5 誘導性細胞死の生理的機序については、ほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究課題では、以下の4項目に関して検討することにより、LPTM5 の量的制御機構および LPTM5 誘導性細胞死の生理的機序を明らかにし、NB の自然退縮の分子メカニズムを解明することを目的とした。

- (1) LPTM5 の生理的な役割
- (2) LPTM5 遺伝子産物の量的制御機構
- (3) LPTM5 誘導性細胞死に寄与する遺伝子群の同定
- (4) NB 以外の癌種における LPTM5 の病態的な意義

3. 研究の方法

(1) LPTM5 の生理的な役割

NB 細胞株 (KP-N-SIFA など) および食道癌細胞株 (KYSE2400 など) を用いて、アデノウイルス発現系により、LPTM5 を強制発現させた。また、siRNA のトランスフェクションにより LPTM5 の発現を抑制させた。NGF レセプターまたは EGF レセプターに対

する抗体を用いて、ウエスタンブロット解析または FACS 解析により、発現量の変動を検討した。また、LPTM5 に対する抗体および上記抗体等を用いた細胞蛍光染色により、それぞれの分子における細胞内分布を検討した。

(2) LPTM5 遺伝子産物の量的制御機構

NB 細胞株 (SH-SY5Y、GOTO、IMR32) において、血清除去 (1-5 days)、低酸素 (アネロパック; <0.1%O₂)、低栄養 (1mM glucose)、酸化ストレス (H₂O₂; 100-1,000μM, 12-24 hr)、抗がん剤 (エトポシド; 0.1-2 μM, 12-24 hr、アドリアマイシン; 0.1-3 μg/ml, 12-24 hr) または NGF 処理 (100ng/ml, 1-5 days) で処理し、RNA を抽出し、合成した cDNA を鋳型として、定量的 RT-PCR により、LPTM5 遺伝子の mRNA レベルを測定した。

さらに、LPTM5 転写開始点周辺領域について、レポーターコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼアッセイによる転写制御領域の決定を行った。SH-SY5Y 細胞において、P53 抗体および LPTM5 イントロン1領域のプライマーを用いて、ChIP-PCR アッセイを行った。LPTM5 の転写活性化において、P53 に対する siRNA のトランスフェクションによる影響を定量的 RT-PCR により評価した。

LPTM5 のタンパク質レベルでの蓄積を調べるために、NB 細胞株 (KP-N-SIFA) において、血清除去した培地で 5 日間培養し、Bafilomycin A1 (100nM) で 12 時間処理した。LPTM5 の発現をウエスタンブロットにて、評価した。

(3) LPTM5 誘導性細胞死に寄与する遺伝子群の同定

LPTM5 誘導性細胞死に寄与する遺伝子群を同定するために、SH-SY5Y および GOTO 細胞にアデノウイルス発現系により LPTM5 または LacZ (コントロール) を発現させ、4 日後 RNA を抽出し、アジレント社の発現アレイを用いて遺伝子発現解析を行い、データ解析には、GeneSpring あるいは IPA を用いた。また、LPTM5 誘導性細胞死における、P53 に対する siRNA のトランスフェクションによる影響を細胞死アッセイにより評価した。

(4) NB 以外の癌種における LPTM5 の病態的な意義

様々な癌種における LPTM5 遺伝子の発

現解析

様々な癌種由来細胞株 338 種を対象にして、定量的 RT-PCR により、LAPTM5 mRNA レベルを評価した。各正常組織の発現量に対して、50%以下に発現低下した細胞株の頻度を調べた。また、本学食道外科との共同研究により、32 症例の食道癌臨床検体由来の癌部および非癌部の RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により、LAPTM5 mRNA レベルを評価した。各症例において、非癌部と比較して、癌部において、40%以下に発現低下した症例の頻度を評価した。

LAPTM5 のオートファジーへの関与

オートファジー関連分子 LC3B に対する抗体を用いた細胞染色により、LAPTM5 との細胞内分および共局在の検討を行った。また、食道癌 (89 症例)、卵巣癌 (266 症例)、子宮体癌 (194 症例) 由来組織切片を用いた免疫染色により、p62 分子の発現解析および各種臨床情報との相関性を統計学的に評価した。また、食道癌組織について、免疫染色により、LAPTM5 分子の発現解析を行った。

4. 研究成果

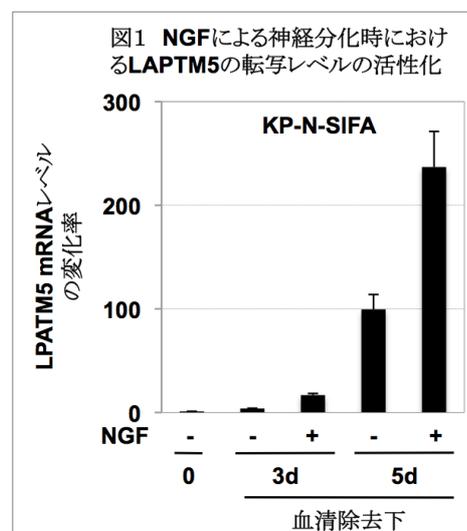
(1) LAPTM5 の生理的な役割

LAPTM5 は、リソソームやエンドソームを含む細胞内小胞に局在しており、特に、免疫系細胞の膜レセプターにおける、エンドサイトーシスを介したリソソーム分解に寄与することが知られている。そこで、本研究では、NB 細胞株および食道癌細胞株を用いて、NGF レセプターおよび EGF レセプターについて、エンドサイトーシスを介したリソソーム分解あるいは、細胞膜へのリサイクリングの効率において、LAPTM5 の発現による影響について検討した。その結果、食道癌細胞株 (KYSE2400) において、細胞膜上での EGF レセプターの発現量は、LAPTM5 の発現により減少し、逆に LAPTM5 の発現抑制により増加することが分かった。しかしながら、その分子メカニズムの解明にまでは至っていない。また、NB 細胞株 (KP-N-SIFA) の細胞膜上での NGF レセプターの発現量において、LAPTM5 の発現による影響は認められなかった。以上の所見は、LAPTM5 の生理的役割を解明するための糸口となる可能性があると考えている。

(2) LAPTM5 遺伝子産物の量的制御機構

LAPTM5 遺伝子の転写レベルでの制御機構に関しては、全く明らかにされていなかった。

そこで、我々は、細胞死を惹起するような種々の細胞ストレス下において、LAPTM5 遺伝子の転写レベルの変動を調べた。NB 細胞株 (SH-SY5Y、GOTO、IMR32) において、血清除去、低酸素、低栄養 (低グルコース)、酸化ストレス (H_2O_2)、DNA 傷害を誘発する抗がん剤 (エトポシド、アドリアマイシン) で処理した際、LAPTM5 遺伝子の転写レベルが顕著に増加することを見出した。また、我々は、以前の研究において、NB 組織を用いた免疫組織学的解析により、分化した NB 細胞で LAPTM5 が高発現することを見出した。そこで、NGF のレセプターである TrkA を発現する NB 細胞 (KP-N-SIFA) において、NGF 処理による神経分化誘導を行った際の LAPTM5 の転写レベルの変動を調べた。その結果、NGF 処理 5 日後において、未処理と比較して、転写レベルが約 240 倍に増加することが分かった (図 1)。このように、本研究において、種々の細胞ストレスおよび神経分化誘導により、LAPTM5 遺伝子は転写レベルで活性化することが示唆された。



さらに、レポーターアッセイ、ChIP アッセイ、および RNAi 実験等の検討により、DNA 傷害時における LAPTM5 の転写活性化において、転写因子 p53 が直接的に正に制御していることを見出した。このことは、LAPTM5 遺伝子は、p53 の標的遺伝子であることを示唆している。

次に、LAPTM5 遺伝子のタンパク質レベルでの制御機構について検討を行った。我々は、以前の研究において、LAPTM5 タンパク質は、プロテアソームおよびリソソームで分解されることにより、負に量的制御される可能性を報告してきた。本研究において、血清除去により、LAPTM5 遺伝子の転写レベルが活性化した状況下において、リソソーム阻害剤で

ある Bfilomycin A1 で処理した際、LAPTM5 のタンパク質レベルが蓄積することを見出した。このことから、細胞ストレス下において、LAPTM5 遺伝子産物は、転写活性化により増加するが、ある一定の頻度でリソソーム分解により負に量的制御を受けている可能性を示唆している。

(3) LAPTM5 誘導性細胞死に寄与する遺伝子群の同定

本研究において、LAPTM5 誘導性細胞死に伴って発現レベルが変動する遺伝子群を網羅的に同定するために、遺伝子発現アレイ解析を行った。SH-SY5Y および GOTO 細胞において、LAPTM5 の強制発現により、LAPTM5 誘導性細胞死を惹起させた際、発現上昇する遺伝子群に着目して、Gene ontology 解析を行った結果、炎症性サイトカイン (TNF α 、IL1 β など) 関連遺伝子群、ER ストレス関連遺伝子群、DNA 傷害関連遺伝子群、および p53 標的遺伝子群が有意に発現上昇することが分かった。このことは、これらの遺伝子ネットワークが LAPTM5 誘導性細胞死に直接的あるいは間接的に寄与している可能性を示唆している。

実際に、LAPTM5 誘導性細胞死が起こる際、p53 がタンパク質レベルで活性化すること、また、siRNA により p53 の機能を抑制した際、LAPTM5 誘導性細胞死の頻度が減少することを見出した。このことは、LAPTM5 誘導性細胞死は、部分的に p53 による制御に依存している可能性を示唆している。

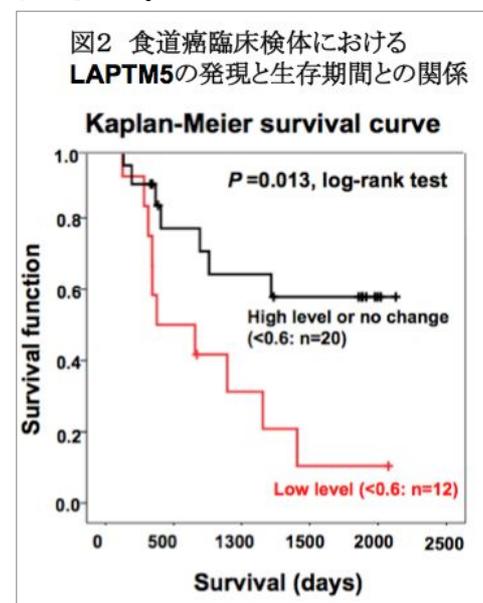
このように、本研究により、上記の転写制御機構を含め、LAPTM5 誘導性細胞死と p53 との新たな関連性を見出すことが出来た。

(4) NB 以外の癌種における LAPTM5 の病態的な意義

様々な癌種における LAPTM5 遺伝子の発現解析

以前の研究により、NB 細胞株および臨床検体において、LAPTM5 の発現は低い状態であることを報告してきた。そこで、NB における LAPTM5 誘導性細胞死の生理機序を明らかにする上で、他の癌種における LAPTM5 遺伝子の役割を検討することも必要であると考え、NB 以外の癌種由来細胞株における LAPTM5 の転写レベルを qRT-PCR により調べた。その結果、338 株中 315 株 (93.2%) において、各正常組織と比較して、顕著に発現低下していることが分かった。さらに、食道癌臨床検体を用いた発現解析により、32

症例中 12 症例において、各検体の非癌部と比較して、癌部において発現低下していることが分かった。また、Kaplan-Meier survival curve により、発現低下を示す症例は、発現のある症例と比べ、生存期間が短いことが分かった (図 2)。このことは、LAPTM5 の発現は、癌種を超えて、高頻度に発現低下していることを示しており、NB 以外の癌種においても、その発現は、がん抑制性に働く可能性が示唆された。実際に、食道癌由来細胞株 KYSE170、KYSE850 細胞において、LAPTM5 を強制発現すると、NB と同様に顕著な増殖抑制および細胞死が誘導されることが明らかとなった。



LAPTM5 のオートファジーへの関与

LAPTM5 は、リソソームやエンドソームを含む細胞内小胞に局在する。そこで、リソソームを分解の場とする細胞内成分の分解機構であるオートファジーとの関連性を検討した。NB 細胞株、肺癌細胞株を用いて、オートファジー小胞の膜上に局在する LC3B 分子と強制発現させた LAPTM5 との共局在を調べた。その結果、LC3B 分子は、一部の LAPTM5 陽性小胞と共局在することが分かった。このことは、LAPTM5 は、オートファジー経路に部分的に寄与する可能性があることを示唆している。

また、以前の研究により、NB 細胞において、LAPTM5 誘導性細胞死が起こる際、オートファジー障害に起因して、オートファジー分解基質である p62 分子が蓄積することを見してきた。そこで、NB 以外の癌種においても、p62 分子の蓄積が起きているか、LAPTM5 分子の発現と相関性の有無を検討した。卵巢

癌、子宮体、食道癌を対象に、免疫組織染色による p62 分子の発現解析を行った。その結果、p62 分子の高発現は患者の予後不良と相関することが明らかとなった。しかしながら、LAPTM5 遺伝子 (LAPTM5 誘導性細胞死) の発現と p62 分子の高発現との相関性は認められなかった。

(5) まとめ

本研究課題により、LAPTM5 の量的制御機構、特に転写レベルでの制御機構の一部が明らかとなった。また、LAPTM5 誘導性細胞死と p53 との新たな関連性を見出すことが出来た。これらの成果は、腫瘍自然退縮の分子メカニズムをより詳細に理解し、新たな治療法の確立に繋がることが期待された。

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 2 件)

Iwadata R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J. High expression of p62 protein is associated with poor prognosis and aggressive phenotypes in endometrial cancer. *American Journal of Pathology*. (査読有り) 2015 in press.

Iwadata R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J. High Expression of SQSTM1/p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Acta Histochem Cytochem*. (査読有り) 47 2014: 295-301. doi: 10.1267/ahc.14048.

[学会発表](計 11 件)

(1) 口頭発表

ヌイラン・ミッシェル、井上純、河野辰幸、稲澤譲治：食道癌における LAPTM5 の不活性化。第 73 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県。2014 年 9 月 26 日

井上純、山本信祐、藤原直人、河野辰幸、小村健、小崎健一、稲澤譲治：マイクロ RNA を基盤とした NRF2 活性化癌に対する診断・治療法の確立。第 73 回日本癌学会学術総会。パシフィコ

横浜。神奈川県。2014 年 9 月 25 日
岩舘怜子、井上純、津田均、平沢晃、青木大輔、稲澤譲治：p62/SQSTM1 タンパク質の高発現は子宮体癌の悪性形質および不良な予後と相関する。第 73 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県。2014 年 9 月 25 日

井上純、稲澤譲治：癌治療におけるオートファジー活性の評価。第 72 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県。2013 年 10 月 3 日

ヌイラン・ミッシェル、井上純、河野辰幸、稲澤譲治：食道癌における LAPTM5 遺伝子の発現低下。第 72 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県。2013 年 10 月 4 日

山本信祐、井上純、河野辰幸、小崎健一、小村健、稲澤譲治：NRF2 活性化癌に対する MicroRNA を基盤とした診断・治療。第 72 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県。2013 年 10 月 4 日

井上純、稲澤譲治：ヒト癌におけるオートファジー関連遺伝子の異常。第 71 回日本癌学会学術総会。さっぽろ芸文館。北海道。2012 年 9 月 19 日

山本信祐、井上純、小村健、小崎健一、稲澤譲治：NRF2 pathway を負に制御する microRNA の同定。第 71 回日本癌学会学術総会。さっぽろ芸文館。北海道。2012 年 9 月 20 日

(2) ポスター発表

井上純、稲澤譲治：マイクロ RNA を基盤とした NRF2 活性化癌に対する診断・治療法の確立。第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会。仙台市情報産業プラザ。宮城。2014 年 6 月 26 日
藤原直人、井上純、河野辰幸、小崎健一、稲澤譲治：新規癌抑制性 microRNA としての Mir-634 の同定。第 73 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県。2014 年 9 月 25 日

藤原直人、井上純、河野辰幸、小崎健一、稲澤譲治：複数癌腫における、MicroRNA-634 による細胞死誘導機構。第 72 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県。2013 年 10 月 5 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/section/genomics/m>

c/index.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 純 (INOUE JUN)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・

分子細胞遺伝、講師

研究者番号：50568326