

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590377

研究課題名(和文)モデルマウスに基づく神経芽腫の発生・自然退縮制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of the genes involved in the tumorigenesis and spontaneous regression in neuroblastoma model mice

研究代表者

岸田 聡 (Kishida, Satoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20402563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小児悪性固形腫瘍である神経芽腫のモデル、MYCNトランスジェニックマウスに基づいてこれまでに集積した遺伝子発現等の網羅的解析結果を用いて、神経芽腫の発生に関わる因子を同定することを目的とした。まず、初期の神経芽腫細胞において高発現する遺伝子として同定したNeuroD1について、既に神経芽腫の原因遺伝子の一つとして知られているALKの転写を直接誘導することで、細胞増殖を促進していることを示した。また、同じく初期の神経芽腫細胞で高発現する遺伝子H1FXを同定し、これがマウスの発生過程において未分化な神経芽細胞で特異的に強く発現し、分化に伴って消失することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we tried to identify the genes involved in the tumorigenesis of neuroblastoma, one of the malignant pediatric solid tumors. Based on our comprehensive data acquired from MYCN transgenic (Tg) mice, we identified two genes, NeuroD1 and H1FX. Both were highly expressed in the early lesions of MYCN Tg mice. We showed that NeuroD1 directly induced the transcription of ALK, an important predisposition gene in neuroblastoma. NeuroD1-ALK axis promotes the proliferation of neuroblastoma cells. On the other hand, H1FX seems to be involved in the early development of sympathetic neurons. H1FX was highly and specifically expressed in totally undifferentiated neuroblast in vivo, and disappeared after differentiation. Interestingly, the expression of H1FX in patients was closely correlated with that of Midkine, a growth factor involved in neuroblastoma tumorigenesis. H1FX could be a target of midkine signaling.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経芽腫 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は難治性の小児悪性固形腫瘍であり、予後不良症例に対する現在の治療効果は十分とは言えない。神経芽腫における分子標的治療は、GD2 抗体以外に実現しておらず、今後の治療成績向上に向けた鍵はここにあると考えられる。現在まで、神経芽腫における分子治療標的の探索に当たっては、臨床のサンプルが用いられてきた。すなわち、予後不良群と良好群とで腫瘍組織における遺伝子発現プロファイルを比較して、前者に特異的に発現しているものを標的候補とする戦略である。この場合、ヒトのサンプルを用いるメリットはもちろん大きい。例えば、再発や治療抵抗性の原因として「がん幹細胞」の存在を考えた場合には、その割合はがん細胞全体のうち、ごく僅かだと考えられることから、末期腫瘍組織である臨床サンプルから得られる情報は少し焦点がぼやけたものになっている可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経芽腫モデルである MYCN Tg マウスに基づいて行ってきた遺伝子発現や染色体異常の網羅的解析結果から、神経芽腫の発生や自然退縮に関わる新規遺伝子を同定し、その作用機構を明らかにすることである。また、それらの網羅的解析に供するサンプルを調製する段階においては、高い腫瘍形成能を持ち、がん幹細胞様である tumorsphere の培養を行っており、核心となる遺伝子を効率良く同定できることが期待される。

3. 研究の方法

候補遺伝子のスクリーニングには、これまでに MYCN Tg マウスに基づいた行ったいくつかの網羅的解析結果を用いた。網羅的解析には、遺伝子発現 (DNA マイクロアレイ、及び次世代シーケンサー)、染色体異常 (アレイ CGH) が含まれる。網羅的解析に供したサンプルは、MYCN Tg マウスに発生した腫瘍を基準とし、同種移植を繰り返して悪性度が増加した腫瘍組織、そして、それらの腫瘍組織から培養した tumorsphere である。更に、データベースとして利用可能なオランダの臨床データも候補遺伝子の絞り込みに利用した。本報告では同定した遺伝子について、*in vivo* (MYCN Tg マウス) おける発現パターン検討や、神経芽腫細胞株におけるノックダウン・強制発現等の *in vitro* 実験を行い、作用メカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1) NeuroD1

まず、元の腫瘍組織と比較して tumorsphere において発現が強くなっている遺伝子として NeuroD1 を同定した。この NeuroD1 という遺伝子は、以前に我々は MYCN Tg マウスの *in vivo* での腫瘍化に伴って発現

が上昇する遺伝子として同定し、細胞移動に関与することを 2011 年に報告している。今回、新たに tumorsphere を培養することで発現が上昇 (強発現細胞の選択的培養、あるいは培養による発現上昇) した遺伝子として浮上した。神経芽腫細胞株において、NeuroD1 をノックダウンすると、細胞の増殖が著しく阻害された (図1)。また、tumorsphere においてノックダウンした場合にも、やはり tumorsphere の形成が阻害された (図2)。これらの結果から、NeuroD1 が細胞移動だけではなく、細胞増殖にも必要であることを示している。

次に、NeuroD1 が細胞増殖を制御するメカニズムを検討したところ、ALK 遺伝子の発現を誘導している可能性を見出した。神経芽腫細胞株 (図3) あるいは tumorsphere (図2) において、NeuroD1 をノックダウンすると同時に ALK の発現も減少していた。ALK は受容体チロシンキナーゼであり、家族性神経芽腫において活性型変異が報告されている原因遺伝子である。更に、孤発性の症例でも高発

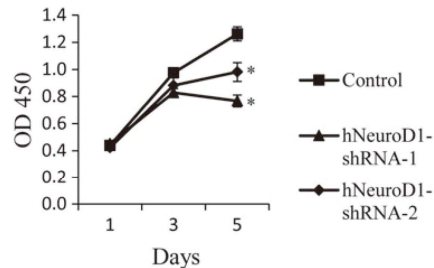


図1 神経芽腫細胞株SH-SY5Yにおいて NeuroD1をノックダウンした際の細胞増殖

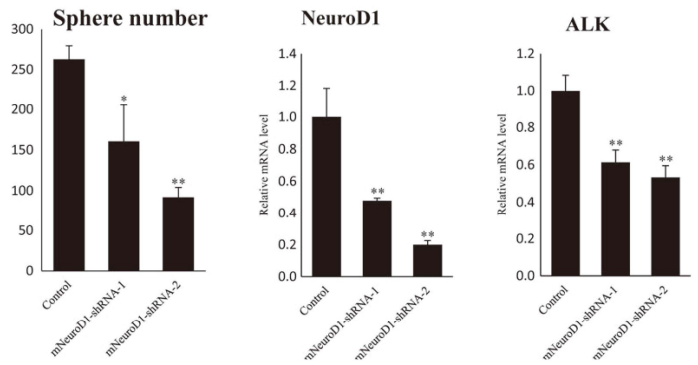


図2 tumorsphereにおいてNeuroD1をノックダウン (中) した際の、sphere形成数 (左) とALKの発現量

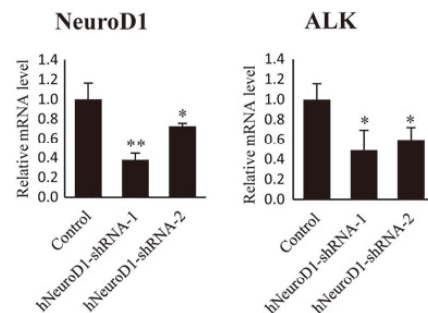


図3 神経芽腫細胞株SH-SY5Yにおいて NeuroD1をノックダウン (左) した際のALKの発現量 (右)

現、遺伝子増幅、そして高活性型変異が明らかになっており、神経芽腫の発生に非常に密接に関わっているがん遺伝子である。今回、興味深いことに ALK 遺伝子の発現が NeuroD1 と相関することを見出した。逆に、NeuroD1 を強制発現すると ALK の発現が誘導されたことから、NeuroD1 が ALK の発現を正に制御している可能性が強く示唆された (図 4)。

次に、NeuroD1 の下流因子としての ALK の寄与を検討したところ、神経芽腫細胞株において NeuroD1 をノックダウンした際の増殖抑制は、ALK を強制発現することによってキャンセルされた (図 5)。すなわち、NeuroD1 による細胞の増殖誘導制御においては、ALK が重要な下流因子であることが示された。

z そして、ALK が NeuroD1 の直接の標的遺伝子である可能性を検証した。まず、ChIP アッセイを行ったところ、NeuroD1 は ALK のプロモーター領域に結合することが明らかになった (図 6)。更に、ALK のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイを行った結果、3 つ認められた E-box のうち、一番上流の E-box を変異させた際に、NeuroD1 によるレポーター発現が失われた (図 7)。これらの結果から、NeuroD1 は ALK プロモーター上の E-box に結合して、発現を直接誘導している可能性が示された。

(2) H1FX

NeuroD1 と同じく、未分化な神経芽細胞と tumorsphere において発現が強い遺伝子として、H1FX を同定した。H1FX はヒストン 1 ファミリーに属している。ヒストン 2-4 はヌクレオソームを構成するコアヒストンであり、ハウスキーピング遺伝子として認識されている。一方でヒストン 1 はリンカーヒストンと呼ばれ、ヌクレオソーム同士をつなぐ露出

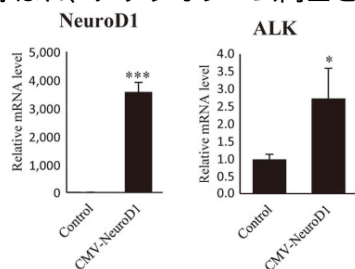


図4 神経芽腫細胞株SK-N-ASにおいて

NeuroD1 を強制発現 (左) した際の ALK の発現量 (右) した部分の DNA に結合し、遺伝子の発現を制

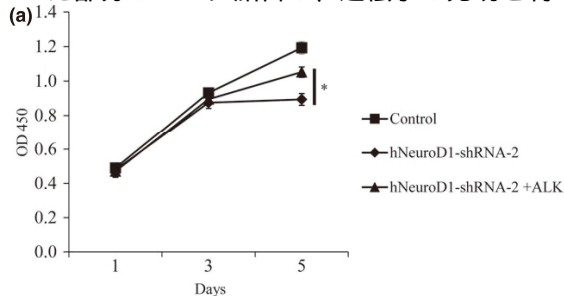


図5 神経芽腫細胞株SH-SY5Yにおいて

NeuroD1 をノックダウン、かつ ALK を強制発現した際の細胞増殖

御すると考えられている。実際、ヒストン 1 の発現パターンは、細胞のがん化や分化、立つ分化に伴ってダイナミックに変化することが報告されている。そこで、この H1FX が神経芽腫の発生に関与している可能性を検討した。

まず、臨床データベースで神経芽腫患者における H1FX に発現を検索したところ、興味深いパターンがいくつか明らかとなった。H1FX の発現は、成長因子 Midkine との間に強い正の発現相関を示した。我々はこれまでに、Midkine が神経芽腫の発生に寄与していることを MYCN Tg マウスを用いて報告している。Midkine の下流で働く因子はほとんど明らかになっていないため、H1FX は有力な Midkine 下流 (標的) 遺伝子と考えられる。Midkine が予後不良因子であることは既に報告しているが、H1FX の高発現もやはり予後不良と有意に相関していた。

次に、Midkine と H1FX との関係を検証するために、神経芽腫細胞株を用いて実験を行った。Midkine をノックダウンすると、H1FX の発現も減少した (図 8 上)。また、Midkine の受容体候補である Notch2 をノックダウンした場合も、やはり H1FX の発現が減少した (図 8 下)。これらの結果は、Midkine-Notch2 のシグナルが H1FX の発現を誘導する可能性を示唆している。さらに、H1FX をノックダウンすると、神経芽腫細胞株の増殖が著しく阻害された (図 9)。

最後に、in vivo における H1FX の発現を検

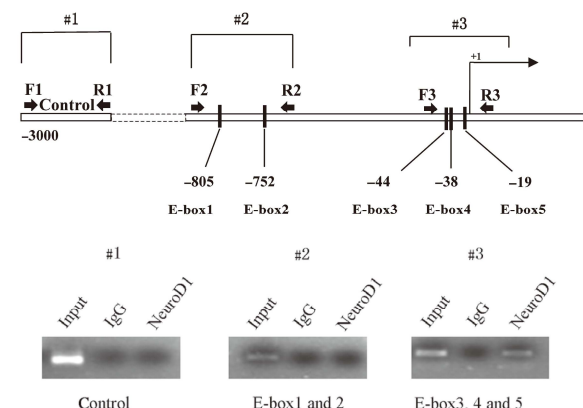


図6 ALKプロモーターに対するNeuroD1のChIPアッセイ

上: ALKプロモーターに含まれるE-box配列
下: 3組のPCRによるChIPアッセイ

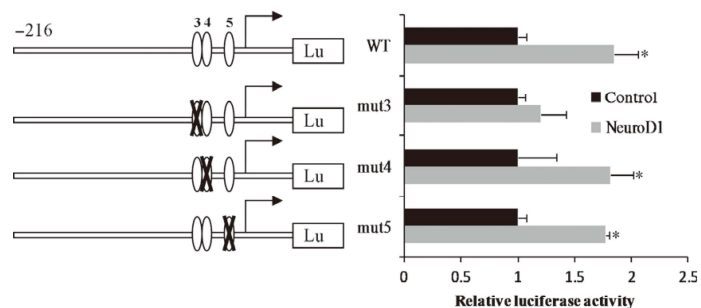


図7 ALKプロモーターを用いたレポーターアッセイ

左: 各レポーターの構造 (E-boxの変異)
右: レポーターアッセイ結果

討した。その結果、H1FX はマウスの胎児から新生児にかけて、未分化な神経芽細胞において強く特異的に発現していることが明らかとなった。これは野生型と MYCN Tg マウスに共通しており、未分化な神経芽細胞において強く発現する一方、分化の傾向と共に速やかに発現が消失していた (図 10)。MYCN Tg マウスにおいては、野生型マウスでは分化が完了している時期 (2 週齢) でもまだ未分化な神経芽細胞が異所的に残存しているが、それらの細胞においても H1FX は強く発現していた (図 10)。これら in vivo における発現パターンから、H1FX の発現と神経芽細胞の未分化状態、そして H1FX の発現消失と神経芽細胞の分化との間には密接な関係していることが示唆される。神経芽腫細胞にとっては自身を未分化な状態に保つことは非常に重要であり、未分化度と悪性度は相関していることから、神経芽腫における H1FX の重要性が浮かび上がる。未分化な神経芽腫細胞における H1FX の機能、H1FX の発現消失が神経芽細胞分化の引き金である可能性、そして Midkine の標的遺伝子としての H1FX の可能性を明らかにすることにより、神経芽腫の新たな制御因子としての H1FX の重要性がより明らかになると考えられる。

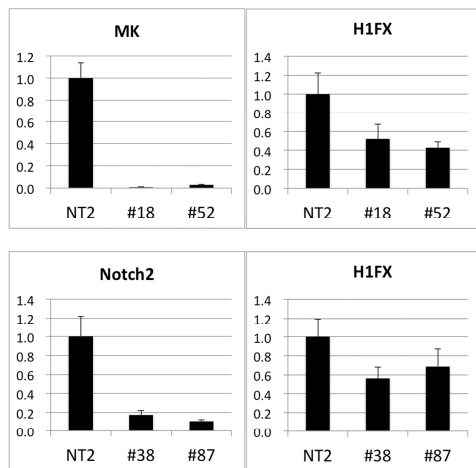


図8 神経芽腫細胞株SH-SY5Yにおいて、Midkine (上) とNotch2 (下) をノックダウンした際のH1FXの発現

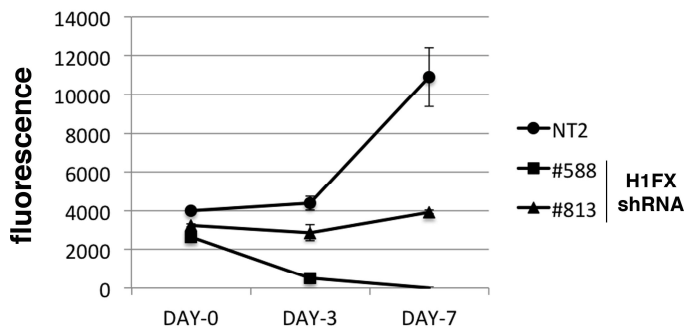


図9 神経芽腫細胞株SH-SY5Yにおいて、H1FXをノックダウンした際の細胞増殖

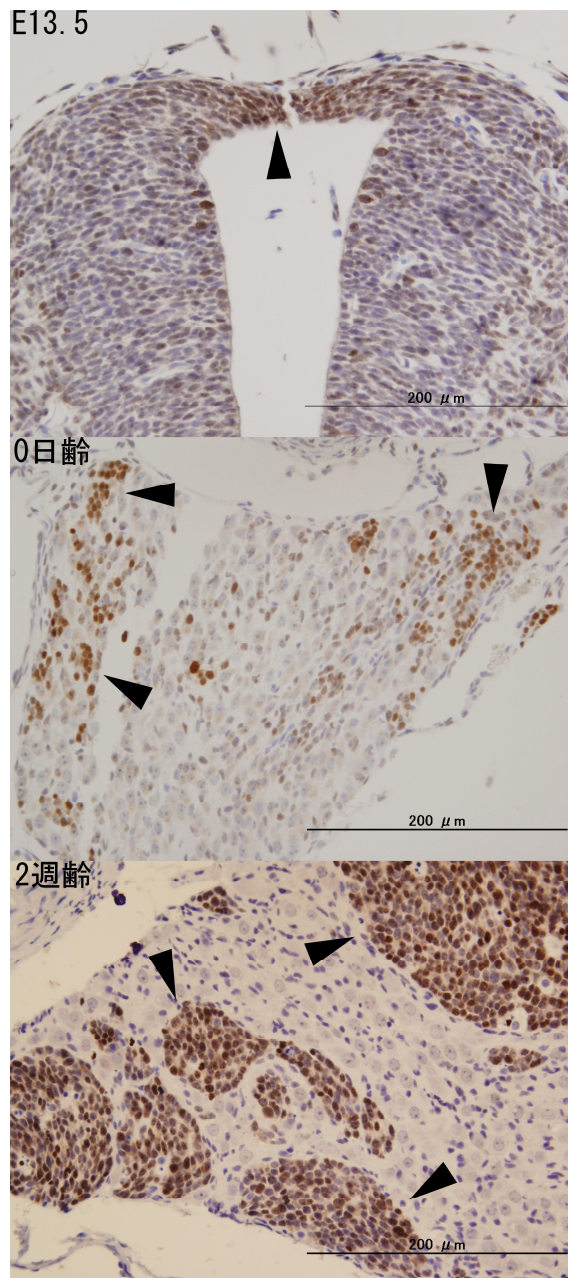


図10 MYCN TgマウスにおけるH1FXの免疫染色
上 : E13.5、中 : 0日齢、下 : 2週齢

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9件)

1. Lu F, Kishida S, Mu P, Huang P, Cao D, Tsubota S, Kadomatsu K. NeuroD1 promotes neuroblastoma cell growth by inducing the expression of ALK. Cancer Sci. 2015 106:390-6. 査読有
2. Nakaguro M, Kiyonari S, Kishida S, Cao D, Murakami-Tonami Y, Ichikawa H, Takeuchi I, Nakamura S, Kadomatsu K. Nucleolar protein PES1 is a marker of neuroblastoma outcome and is associated with neuroblastoma differentiation. Cancer Sci. 2015 106:237-43. 査読有

3. Murakami-Tonami Y, Kishida S, Takeuchi I, Katou Y, Maris JM, Ichikawa H, Kondo Y, Sekido Y, Shirahige K, Murakami H, Kadomatsu K. Inactivation of SMC2 shows a synergistic lethal response in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Cell Cycle*. 2014 13:1115-31. 査読有
4. Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, Kadomatsu K. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One*. 2014 9:e86813. 査読有
5. Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P. Therapeutic potential of midkine in cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*. 2014 171:936-44. 査読有
6. Kishida S, Kadomatsu K. Involvement of midkine in neuroblastoma tumorigenesis. *Br J Pharmacol*. 2014 171:896-904. 査読有
7. 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. 査読有
8. Kadomatsu K, Kishida S, Tsubota S. The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. *J Biochem*. 2013 153:511-21. 査読有
9. Kishida S, Mu P, Miyakawa S, Fujiwara M, Abe T, Sakamoto K, Onishi A, Nakamura Y, Kadomatsu K. Midkine promotes neuroblastoma through Notch2 signaling. *Cancer Res*. 2013 73:1318-27. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. Satoshi Kishida. The RNA Aptamer against Midkine Suppresses Neuroblastoma Xenograft Growth by Attenuating Midkine-Notch2 Pathway. *Advances in Neuroblastoma Research 2014*, 2014年5月13-16日, Cologne, Germany
2. Satoshi Kishida. RNA aptamer and monoclonal antibody-mediated targeting of midkine against neuroblastoma, The Third Midkine Symposium, 2014年4月21-23日, 京都ホテルオークラ(京都府京都市)
3. 岸田 聡. 難治性小児がん神経芽腫の治療に向けた抗MK抗体の開発, 平成25年度中部地区医療・バイオ系シーズ発表会,

2013年12月11日, ウィンクあいち(愛知県名古屋市)

4. Satoshi Kishida, Ping Mu, Shin Miyakawa, Masatoshi Fujiwara, Tomoyuki Abe, Kazuma Sakamoto, Yoshikazu Nakamura, Kenji Kadomatsu. Midkine promotes neuroblastoma through Notch2 signaling in model mice, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3-5日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. Satoshi Kishida. The growth factor Midkine plays a critical role in the tumorigenesis of neuroblastoma via Notch2 signaling, *Advances in Neuroblastoma Research 2012*, 2012年6月18-21日, Toronto (Canada)

〔図書〕(計1件)

1. Tadashi Suzuki, Satoshi Kishida, Kenji Kadomatsu et al. *Sugar Chains*, 2015 287(127-138).

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ヒトミッドカインに対するモノクローナル抗体
 発明者: 門松健治、岸田聡、小野健一郎、八木香澄
 権利者: 名古屋大学
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2013/070642
 出願年月日: 2013年7月30日
 国内外の別: 外国

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
 なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸田 聡 (KISHIDA SATOSHI)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号: 20402563

(2)研究分担者

門松 健治 (KADOMATSU KENJI)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 80204519

(3)連携研究者

なし。