

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592698

研究課題名(和文) MYCNトランスジェニックマウスを用いた神経芽腫新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文) The development of new molecular target treatment drug for neuroblastoma using MYCN transgenic mouse

研究代表者

宗崎 良太 (SOUZAKI, Ryota)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10403990

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)：MYCNトランスジェニックマウスのホモ・ヘテロについて、Hedgehogシグナル関連タンパク(Sonic Hh, Gli1, Patched)の蛋白発現の検討を行った。HE染色ではホモ・ヘテロともにヒト神経芽腫のundifferentiated subtype相当と病理組織学的に差がなかった。また、Sonic Hh, patchedの発現は陽性であったがGli1についてはホモ・ヘテロとも陰性であった。我々が報告しているヒト神経芽腫検体においては、Gli1も陽性であった結果と異なっており、MYCNトランスジェニックマウスにおいてヒトとHhシグナル活性化が異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We used the MYCN transgenic mouse which was a neuroblastoma model mouse for determining the possibility of the new molecular target in the neuroblastoma. The tumor samples were obtained from homo and hetero MYCN transgenic mouse. The pathological examination was performed for homo and hetero MYCN transgenic mouse samples. And Hh signal proteins (Sonic Hh, Gli1, Patched) were determined using immunostaining method. H.E. stains of both samples were shown undifferentiated subtype of neuroblastoma and there were not differences between both groups. Sonic Hh, Patched was strong positive, but the Gli1 was negative in both group. From the results, there was not difference between two groups, even if the survival rate of each group were different. In the human neuroblastoma specimen, the Gli1 was strongly positive. However, in MYCN transgenic mouse, Gli1 was negative. Therefore the Hh signal activation was different between human neuroblastoma and MYCN transgenic mouse.

研究分野：小児外科学分野

キーワード：神経芽腫 hedgehog signal

## 1. 研究開始当初の背景

Hhシグナル伝達経路は、もともとショウジョウバエの研究から明らかとなったシグナル伝達経路で、ショウジョウバエの胚発生における前後決定にかかわるsegment polarity gene と考えられている。Hh遺伝子の機能を失った変異体の表現型の胚は、小さな歯のような突起物に覆われることより、ヘッジホッグ(ハリネズミ)と名付けられた。現在、ヒトにおいて、Hhシグナルは神経、消化管、肢芽等の形成に関与し、また、その異常で小児の髄芽腫、成人の消化器癌、基底細胞癌など種々の発癌に関与することが知られている。また、このことから、髄芽腫・基底細胞癌に対する分子標的治療薬としての開発も進んでいる。神経芽腫は小児固形腫の中で一番頻度が高く、大量化学療法が用いられている現在でも、進行神経芽腫の予後は不良で5年生存率が30-40%と報告されている。今回我々は、分子標的治療薬としても注目されているHedgehog(Hh)シグナル伝達系が神経芽腫においても活性化していることから、神経芽腫発生モデルであるMYCNトランスジェニックマウスを用いて神経芽腫における新規分子標的治療薬の開発を目標に研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

近年、神経芽腫のモデルマウスとして、MYCNトランスジェニックマウスが開発され、このマウスは特異的発現するTyrosine Hydroxylaseのプロモーターの下流にヒトのMYCN cDNAが位置するベクターが導入されたもので、神経堤細胞においてMYCN蛋白が強発現することにより右の写真のように胸腹部交感神経節由来の神経芽腫が発生する。また、このマウスに発生する神経芽腫において、ヒトの神経芽腫において生じる染色体変化と多くの同じ変化が対応するマウス染色体に生じており、ヒトの神経芽腫の発生、進展のメカニズムの解明及び、治療開発モデルとして非常に有用であることが報告されている。こ

のことから、小児神経芽腫に対する新規分子標的治療の開発として、MYCNトランスジェニックマウスを用いることとした。この神経芽腫モデルマウスにおいてヒトにおける神経芽腫と同様にHhシグナル伝達系が活性化しているかどうか検討し、分子標的治療の開発の可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

MYCN トランスジェニックマウスはホモとヘテロが存在し、ホモはほぼすべての個体が死亡し、ヘテロの症例は約半数が死亡することが知られている。このことから、ホモの腫瘍死した症例とヘテロの腫瘍死した症例から、腫瘍を採取し、当科におけるヒト神経芽腫検体における結果と比較した。

Paraffin 切片に対して HE 染色にて組織像の比較、免疫染色 s - 100、NSE の染色を行った。また、Hh signal 経路の中でその活性化の指標となっている蛋白である Sonic hedgehog (Hh)、Patched(Ptch)、Gli 1 (Gli1) 発現を判定、定量化した。50%以上の細胞が陽性のものを陽性とした。また、Hh の活性化の指標の1つとして、Gli 1 蛋白の核内移行率を測定した。

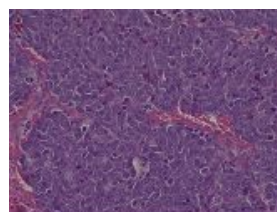
また、当科の神経芽腫症例 92 症例の免疫染色の結果と比較検討を行った。

## 4. 研究成果

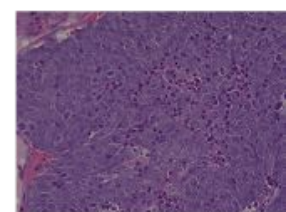
homo・hetero の MYCN トランスジェニックマウスの病理学的検討

homo・hetero の MYCN トランスジェニックマウスにおいて腫瘍死した個体の腫瘍を HE 染色を行った。

hetero、homo いずれも神経細線維は認めずヒト神経芽腫における undifferentiated subtype 相当であった。このことは、いずれも悪性度の高い神経芽腫に認められ所見であった。

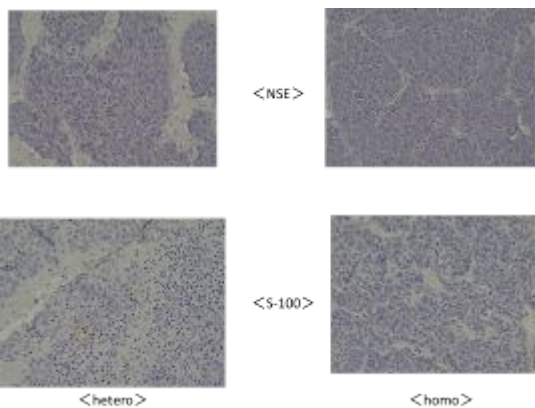


<hetero>



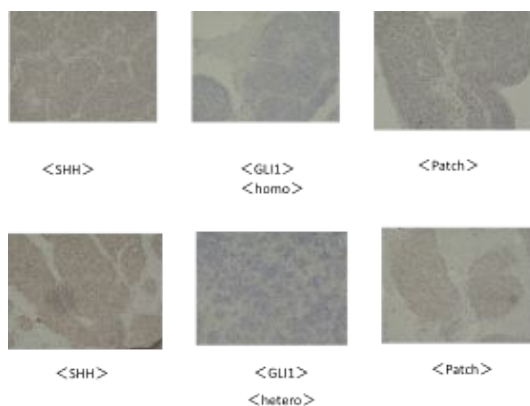
<homo>

また、NSE/s - 100 についても免疫染色を行ったが、いずれも陰性をしました。Homo、hetero いずれも染色性に差を認めなかった。NSE はいずれも弱く全体的に染色され s -



100 は陰性であった。

homo・hetero の MYCN トランスジェニックマウスの Hh シグナル蛋白発現



上図に示すように、Hh シグナル関連蛋白の発現については、Sonic Hh(Shh)と Patch は陽性であったが、GLI1 は陰性を示した。

ヒト神経芽腫の検体 95 例の結果と子っており、神経芽腫・神経節芽腫の全 92 例中 Shh は 67 例(73%)、GLI1 は 62 例(67%)、Patch は 73 例(79%)が陽性であった。なかでも、神経節芽腫症例においては、分化傾向を示す neuroblast において Hh 関連蛋白の発現を強く認めた。一方、間質のシュワン細胞は陰性であった。よって、Shh と patch が陽性を示したことからすると、HE 染色で病理組織学上は未分化であると考えられた結果と異なる

所見であった。

また、ヒト神経芽腫において未分化な腫瘍である MYCN 増幅症例と MYCN 非増幅症例の間で Hh 関連蛋白の陽性率の結果を以下に示す。

		positive		negative		
		++	+	-		
Shh	MYCN amp.	2	0	18	20	$p \leq 0.001$
	no MYCN amp.	62	3	7	72	
		64	3	25		

		positive		negative		
		++	+	-		
GLI1	MYCN amp.	2	0	18	20	$p \leq 0.001$
	no MYCN amp.	51	9	12	72	
		53	9	30		

		positive		negative		
		++	+	-		
Ptc1	MYCN amp.	4	0	16	20	$p \leq 0.001$
	no MYCN amp.	66	3	3	72	
		70	3	19		

このようにヒト神経芽腫においては Shh, GLI1, Patch はいずれも分化度によって染色性がわかるに比較して、今回の MYCN トランスジェニックマウスの腫瘍の結果は、Shh, patch と GLI1 でことなる結果を示した。

【結論】今回、神経芽腫発生マウスである MYCN トランスジェニックマウスにおいてその Hh シグナルの活性化について検討を行った。Homo のトランスジェニックマウスは hetero のトランスジェニックマウスに比較して予後不良であるが、2 群化に Hh タンパクの発現に差を認めなかった。ヒト神経芽腫においては、未分化な腫瘍は Hh タンパクの発現が認められず、分化度が高い腫瘍において発現が高い傾向を認めていたが、MYCN トランスジェニックマウスにおいては、病理組織学的には、分化度の低い undifferentiated subtype の組織型であったにも関わらず、Hh は Shh, Patch で発現を認めた。一方、GLI の発現は認めず、ヒトにおいては、Shh, GLI1, Patch はいずれも発現を認めるか発現を認めないかに分かれていたものが、3 者に発現に差を認めた。このことは、ヒト神経芽腫と MYCN トランスジェニックマウスにおいて

Hh シグナル活性化の程度が異なることが明らかとなった。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1. Kinoshita Y, Tanaka S, **Souzaki R**, Miyoshi K, Kohashi K, Oda Y, Nakatsura T, Taguchi T. Glypican 3 Expression in Pediatric Malignant Solid Tumors. Eur J Pediatr Surg. 2015 Feb;25(1):138-44.
2. Uemura M, Yamashita M, Tomikawa M, Obata S, **Souzaki R**, Ieiri S, Ohuchida K, Matsuoka N, Katayama T, Hashizume M. Objective assessment of the suture ligation method for the laparoscopic intestinal anastomosis model using a new computerized system. Surg Endosc. 2015 Feb;29(2):444-52.
3. Koreeda Y, Obata S, Nishio Y, Miura S, Kobayashi Y, Kawamura K, **Souzaki R**, Ieiri S, Hashizume M, Fujie MG. Development and testing of an endoscopic pseudo-viewpoint alternating system. Int J Comput Assist Radiol Surg. 2015 May;10(5):619-28.
4. Sakai Y, **Souzaki R**, Yamamoto H, Matsushita Y, Nagata H, Ishizaki Y, Torisu H, Oda Y, Taguchi T, Shaw CA, Hara T. Testicular sex cord-stromal tumor in a boy with 2q37 deletion syndrome. BMC Med Genomics. 2014 Apr 22;7:19.
5. Uemura M, Tomikawa M, Kumashiro R, Miao T, **Souzaki R**, Ieiri S, Ohuchida K, Lefor AT, Hashizume M. Analysis of hand motion differentiates expert and novice surgeons. J Surg Res. 2014 May 1;188(1):8-13.
6. Rumbajan JM, Maeda T, **Souzaki R**, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S,

- Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K. Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. BMC Cancer. 2013 Dec 27;13:608. doi: 10.1186/1471-2407-13-608.
7. **Souzaki R**, Ieiri S, Kinoshita Y, Nishie A, Koga Y, Kuda M, Oda Y, Hara T, Hashizume M, Taguchi T. Laparoscopic resection of an isolated retroperitoneal enteric duplication in an infant. J Pediatr Surg Case Reports 2013; 1: 167-170
  8. **Souzaki R**, Ieiri S, Uemura M, Tomikawa M, Ohuchida K, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Kohashi K, Oda Y, Hara T, Hashizume M, Taguchi T. An augmented reality navigation system for pediatric oncologic surgery based on preoperative CT and MRI images. J Pediatr Surg. 2013 Dec;48(12):2479-83.
  9. Ieiri S, Ishii H, **Souzaki R**, Uemura M, Tomikawa M, Matsuoka N, Takanishi A, Hashizume M, Taguchi T. Development of an objective endoscopic surgical skill assessment system for pediatric surgeons: suture ligation model of the crura of the diaphragm in infant fundoplication. Pediatr Surg Int. 2013; 29(5):501-4.

〔学会発表〕(計13件)

1. **Souzaki R**, Ieiri S, Uemura M, Tomikawa M, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Kohashi K, Oda Y, Hara T, Hashizume M, Taguchi T 「AN AUGMENTED REALITY NAVIGATION SYSTEM FOR ENDOSCOPIC SURGERY FOR PEDIATRIC TUMORS BASED ON PREOPERATIVE CT OR MRI IMAGES」 the 46<sup>th</sup> PAPS, Hunter Valley, NSW, 7th -

11th April 2013

2. **宗崎良太**、家入里志、大内田研宙、木下義晶、植村宗則、古賀友紀、住江愛子、孝橋賢二、小田義直、原寿郎、橋爪 誠、田口智章「小児内視鏡外科における画像支援手術（リアルタイムナビゲーション・3D）のもたらす未来」第113回日本外科学会定期学術集会、平成25年4月11日～13日

3. **Souzaki R**, Ieiri S, Uemura M, Tomikawa M, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Kohashi K, Oda Y, Hara T, Hashizume M, Taguchi T「Augmented reality navigation system for laparoscopic surgery for pediatric malignant tumor on preoperative CT image」International Pediatric Endosurgery Group 2013 (IPEG2013), 2013, 17-22, June, Beijing, China

4. **宗崎良太**、家入里志、木下義晶、植村宗則、古賀友紀、住江愛子、孝橋賢一、小田義直、原寿郎、橋爪 誠、田口智章「小児腫瘍性病変に対する内視鏡外科手術におけるリアルタイムナビゲーション」第50回日本小児外科学会学術集会 平成25年5月30～6月1日、東京

5. **Souzaki R**, Ieiri S, Uemura M, Tomikawa M, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Kohashi K, Oda Y, Hara T, Hashizume M, Taguchi T「An augmented reality navigation system for pediatric surgery for tumors.」The 45th Congress of the International Society of Paediatric oncology (SIOP 2013), 2013, 25-28, September, HongKong, China

6. **宗崎良太**、木下義晶、川久保尚徳、林田 真、杉本真樹、橋爪誠、田口智章「3Dプリンターによる臓器立体モデルを用いた術前シミュレーションを行った肝芽腫の1例」JPLT研究会2014、平成26年1月26日、東京

7. **Souzaki R**, Ieiri S, Kawakubo N,

Kinoshita Y, Hashizume M, Taguchi T「Endoscopic surgery for neuroblastoma treated at a single institution」8th SIOP asia congress, 2014, 17-19, April, Seol, Korea

8. **Souzaki R**, Koga Y, Yagi M, Yanai F, Ueda K, Zaizen, Inomata Y, Shinkoda Y, Matsufuji H, Suenobu S, Handa N, Oda Y, Hara T, Taguchi T.「The differences in the clinical and biological characteristic of neuroblastomas detected during and after a period of mass screening of six-month-old infants: A report from the Study Group for Pediatric Solid Tumors in the Kyushu Area, Japan」the 47th Annual meeting Pacific Association of Pediatric Surgeons(PAPS), 2014, 25-29, May, Banff, Canada.

9. **Souzaki R**, Ieiri S, Kawakubo N, Kinoshita Y, Hashizume M, Taguchi T「Endoscopic surgery for neuroblastoma in children treated at a single institution」ANR, 2014, 13-16, May, Cologne, Germany

10. **宗崎良太**、家入里志、木下義晶、植村宗則、橋爪 誠、田口智章「当科における術中リアルタイムナビゲーションの導入」第51回日本小児外科学会学術集会 平成26年5月8～5月10日、大阪

11. **宗崎良太**、木下義晶、安岡和昭、楠田 剛、松本 隼人、原寿郎、橋爪 誠、田口智章「極低出生体重児に発症した新生児脾破裂の1例」第50回日本周産期・新生児医学会 平成26年7月13日～15日、千葉

12. **宗崎良太**、木下義晶、林田真、橋爪誠、田口智章「新生児副腎部嚢胞性腫瘍の4例」第23回日本小児泌尿器科学会、平成26年7月9日～11日、横浜

13. **宗崎良太**、家入里志、木下義晶、小幡聡、神保教広、福原雅弘、古賀友紀、三好きな、小田義直、原寿郎、橋爪誠、田口智章「術前CT画像に基づく3Dプリンター作成立体モ

デルを用いた腹腔鏡下副腎摘出術シミュレーションを行った神経芽腫の1例」第34回日本小児内視鏡外科・手術手技研究会 平成26年10月30日～31日、兵庫

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宗崎 良太 (SOUZAKI, Ryota)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 10403990

### (2) 研究分担者

木下 義晶 (KINOSHITA, Yoshiaki)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号: 80345529

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 20197247

孝橋 賢一 (KOHASHI, Kenichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 10529879

三好 きな (MIYOSHI, Kina)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号: 20621709

田尻 達郎 (TAJIRI, Tatsuro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・

教授

研究者番号: 80304806