

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791889

研究課題名(和文) 神経芽細胞腫予後良好3因子の分化機序の解明と治療法開発

研究課題名(英文) Functional analysis of three genes expressed in favorable neuroblastoma.

研究代表者

山岡 絵美(福田絵美)(YAMAOKA, EMI)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・研究員

研究者番号：20403503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽細胞腫における予後良好因子候補遺伝子DHRS3, NROB1, CYP26A1の過剰発現ベクターおよびsiRNA発現ベクターを作成し、神経芽細胞腫細胞株に導入し、安定発現株を樹立したのち機能解析を行った。Colony Formation Assayではコロニー形成効率が優位に低下し、細胞増殖速度の優位な抑制もみられた。さらに免疫染色やRNA-seqでの結果から、Adipogenic pathwayなどの経路とも関連が示唆され、DHRS3, NROB1, CYP26A1の予後良好因子候補遺伝子は、神経芽腫細胞腫株の増殖抑制能を低下させ分化に関与する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Neuroblastoma (NB) is the most common cancer in infants arising from neural crest, is classified unfavorable and favorable outcome. Recently, we assessed gene expression analysis between favorable group and unfavorable group of neuroblastoma by oligo-microarray then extracted the top three candidate genes including DHRS3, NROB1, and CYP26A1 in the favorable groups and performed functional analysis. Established knockdown and overexpression neuroblastoma stable clones in TGW, SK-N-SH, NH12 caused cell growth inhibition, suppression of colony formation ability. We also observed that the overexpression of DHRS3 promotes lipid droplet accumulation and that involved in cell differentiation. Further RNA-seq and IPA pathway analysis revealed that these genes related to the network of lipid metabolism, molecular transport, neurological diseases etc. So we suppose that DHRS3, NROB1, and CYP26A1 may be the growth suppressor in tumor neuroblastoma cell lines.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：Neuroblastoma

1. 研究開始当初の背景

当研究室では、胎児期の芽細胞から発生する神経芽腫のうち、予後良好な腫瘍と不良な神経芽細胞腫の網羅的遺伝子解析を行い、予後良好な腫瘍で有意に高発現の遺伝子を抽出した。上位遺伝子 *DHRS3*, *NROB1*, *CYP26A1* などは神経系の分化に関連した遺伝子であり、その他分化や細胞の分裂停止に関与するものもあった。これらの結果から、発生段階で分化せずに増殖した腫瘍は分化や退縮し、分化途上でテロメラーゼ活性が低く悪性度の高い腫瘍は分化過程から逸脱し細胞分裂が停止せず予後不良となり、脱分化によりテロメラーゼ活性が高いとして、悪性度のマーカーとして報告してきた。さらに、本邦の大規模な神経芽腫スクリーニング事業で予後良好な腫瘍を数多く見出した結果として予後不良な腫瘍が減少したことを報告した (*Lancet*, 2008)。スクリーニング発見例の中で予後不良腫瘍の早期例が判別できないことから、分化遅延によって予後良好腫瘍が発生し、一部が脱分化して予後不良腫瘍となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では神経芽細胞腫の予後良好腫瘍において優位に発現している遺伝子群の機能性を解析する。Fabriable Factors (FF) を神経芽細胞腫の細胞株と初代培養細胞に導入、あるいは遺伝子発現をノックダウンする FF-NBCL, siFF-NBCL clones を作成し、細胞の増殖・分化形態および発現解析・パスウェイ解析などを網羅的に行い、予後良好因子群が神経芽腫の分化機序にどのような貢献を果たしているかを *in vivo* と *in vitro* 双方の分析から解明し、神経芽細胞腫自然消退へむけ新たな神経芽細胞腫の分子診断、分子標的治療薬の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) N末端に 3xFLAG タグを挿入し、DsRed を発現するパイシストロン性発現ベクター DsRedpIRES2 DsRed-Express2 Vector (Clontech) にサブクローニングし (FF-NBCL), 予後良好因子候補遺伝子の過剰発現ベクターを構築した。また、RNAi の実験には BLOCK-iT RNAi 発現ベクターを用いた。

また、遺伝子発現をノックダウンした siFF-NBCL clones を、pcDNA6.2-GW/EmGEP-miR system で作成した。

これらの発現ベクターを神経芽細胞腫細胞株 (TGW, SK-N-SH, NH12, NH6, GOTO) に Lipofectamine LTX にて導入し、G418 または Blastidicin を処理して 3 週間のセレクションを行った。

FACSCalibur (BD) にて DsRed+ および EGFP+ の神経芽腫細胞を分取し、安定発現株を樹立し機能解析を行った。

(2) これらの細胞株の網羅的遺伝子発現を調

べるため、Total RNA を抽出してライブラリを作成し、HiSeq2500 で RNA シーケンシングを行った (得られたデータは CLC Genomics workbench と GeneSpring で解析した)

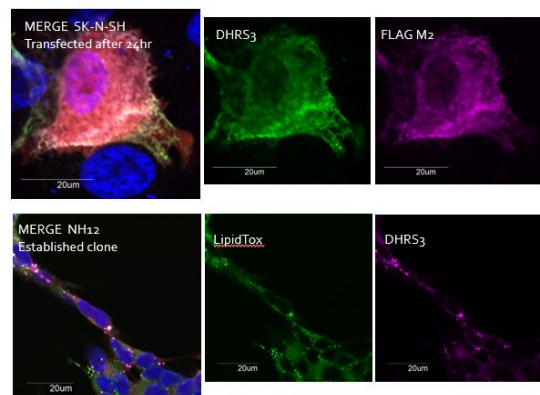
神経芽細胞腫細胞株と、予後良好因子過剰発現株の遺伝子発現量を Log2 変換で定量化した。

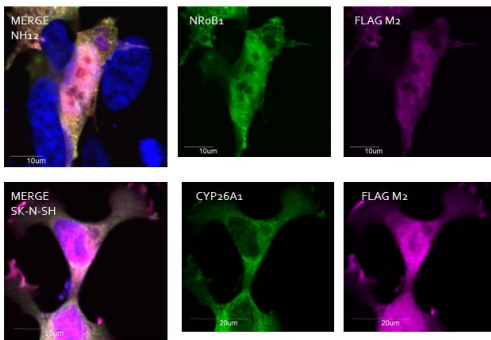
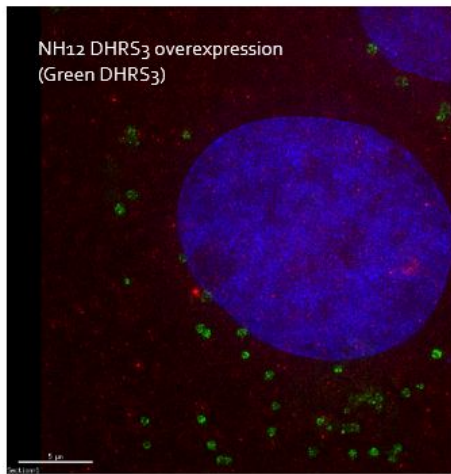
遺伝子発現で 2 倍以上 up regulation と down regulation が変化した遺伝子をソートし、遺伝子導入後に各細胞間で共通して変化している遺伝子のパスウェイ解析を行った。

4. 研究成果

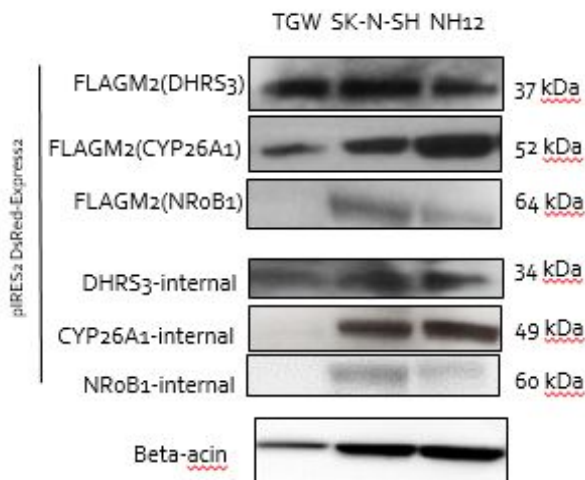
(1) 予後良好因子候補を過剰発現させたクローンはセレクションとその後の培養の過程で殆どが死滅し、特に *CYP26A1*, *NROB1* はどの細胞でもシングルクローンでの樹立は困難だった。シングルセルで生着しなかったものは、sort 後コロニーを作製しピックアップしてクローン化した。予後良好因子候補遺伝子の過剰発現クローンでは、細胞老化に似た形態変化がみられた。これに対し、siRNA 発現クローンでは殆ど形態変化はみられなかった。

(2) 安定発現株のタンパク質発現を蛍光免疫染色で評価した。外因性タンパク質の発現は、Flag M2 抗体とそれぞれの抗体で検出した。*DHRS3* はプラズマ膜や小胞体、核で発現がみられた。*p53* が *DHRS3* の脂肪滴 (Lipid Droplet) への蓄積を行うとされるが、脂肪





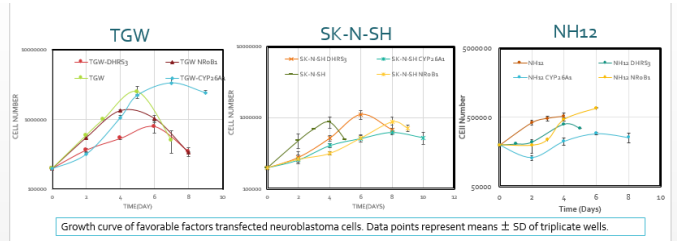
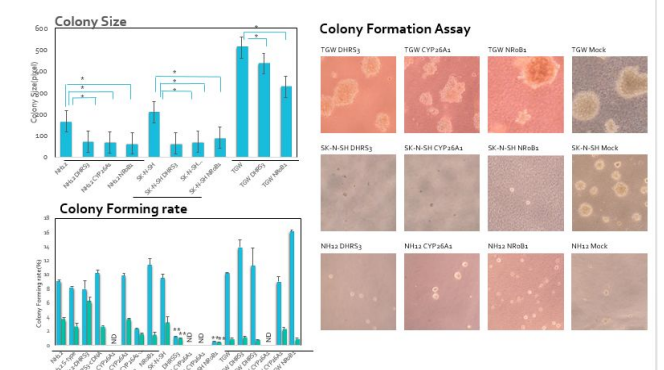
染色によって p53WT の神経芽腫株, NH12 と SK-N-SH では小胞体(ER)への集積が確認された. これに対し, Transfection 後まもなくの細胞と, p53mutant の TGW では脂肪滴への移行がみられなかった. そのほか, CYP26A1 は核や小胞体で, NROB1 は核でも発現が見られた. (3)次に内因性の予後良好因子候補遺伝子の発現を Western blot で調べた. 予後良好因子候補タンパク質の内因性タンパク質発現レベルは低く, よって siRNA を導入しても発現量の変化は検出できなかった. 過剰発現



クローンの外因性タンパク質の発現と分子量を Western blotting で確認し, 以後のアッセイに用いた. TGW は継代ごとに遺伝子の脱落が大きく, 樹立後のタンパク質発現は低レベルだった.

(4)これらの予後良好因子過剰発現株に soft agar colony formation assay を行った. DHR53, CYP26A1, NROB1 の過剰発現クローンではコロニーサイズを優位に小さくさせる傾向にあった. コロニー形成効率は, SK-N-SH の DHR53 と NROB1 では優位に低下した. 一部ではコントロールと比較して小さなコロニーの形成が増える傾向もみられた.

(5)コロニーフォーメーションアッセイの結果, TGW は殆どサイズと形成効率の変化がみられず, SK-N-SH, NH12 ではコロニーサイズが小さくなる傾向があった. Growth Assay では, 予後良好因子候補遺伝子を過剰発現させると, 細胞増殖速度が抑制される傾向にあった.

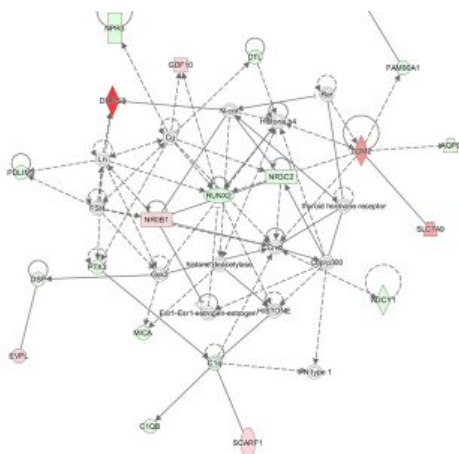


(6)パスウェイ解析の結果, DHR53 と CYP26A1 はカノニカルパスウェイにおいて Hepatic Fibrosis, 脂質代謝やセルサイクルなどに関連する遺伝子発現の変化がみられた. NROB1では神経系疾患やCancerなどに関連し

ていると示唆された。予後良好因子候補遺伝子は、神経芽腫細胞株の腫瘍の増殖抑制能、足場依存性を低下させる可能性を示唆している。結果をまとめた論文は、現在執筆中である。

Top Analysis-Ready Molecules of DHRS3 overexpressed clones

Molecules	Fold change		Molecules	Fold change	
DHRS3	97.190	↑	IL13RA2	-104.205	↓
SGCZ	26.204	↑	CNTN4	-64.994	↓
FOLH1B	19.399	↑	MSN	-62.758	↓
LRP1B	18.048	↑	PEG3	-52.021	↓
INSM1	10.716	↑	IS100A16	-49.169	↓
CPNE7	9.802	↑	STC1	-47.391	↓
ALDH1A1	9.670	↑	P2RY6	-39.773	↓
RAPSN	9.246	↑	MASP1	-30.885	↓
GLIS1	9.222	↑	LINC00461	-26.177	↓
MFNG	8.459	↑	CLDN1	-24.584	↓



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)

[学会発表](計 1 件)

日本分子生物学会 2015年12月3日神戸ポートアイランド

発表者名：山岡 絵美

発表表題：予後良好な神経芽細胞腫で高発現して

いた DHRS3, NR0B1, CYP26A1 の機能解析

6. 研究組織

(1)研究代表者

山岡絵美 (EMI YAMAOKA)

広島大学自然科学研究支援開発センター・研究員

研究者番号：20403503