

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791893

研究課題名(和文) MassARRAYを用いたマウス腫瘍特異的遺伝子のヒト神経芽腫における網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of mouse tumor-related genes for human neuroblastoma using MassARRAY

研究代表者

大橋 研介(Ohashi, Kensuke)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：10526065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子同定を目的として、皮膚腫瘍モデルマウスを用いたスクリーニングから絞り込んだ腫瘍関連遺伝子についてヒト神経芽腫における変異を解析し、さらに、それらの変異と臨床データとの関連を調べた。DNAメチル化解析および遺伝子発現解析の結果、TFAP2Eが腫瘍組織で高発現・低メチル化を示し、その遺伝子発現はCpG island-1のメチル化により制御されている可能性が示唆された。また、生存解析からTFAP2E CpG island-1の低メチル化は予後不良因子であることが示された。本研究結果より、TFAP2Eがヒト神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子である可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：To find new neuroblastoma related genes, we investigated DNA methylation level and expression level of the tumor-related genes, which have been screened from global analysis of genome DNA and transcripts obtained from mouse skin cancers, in the neuroblastoma specimens. And then we examined the association between the aberrance of those genes and clinical data. In this study, we found that TFAP2E showed lower methylation level and higher expression level in the neuroblastoma samples compared to normal adrenal tissues. In addition, our data indicated that its expression was controlled by DNA methylation of CpG island-1. In the survival analysis, it was clearly shown that the lower methylation level of CpG island-1 was associated with the worse prognosis. Our present data strongly suggested that TFAP2E could be a new neuroblastoma related gene.

研究分野：医歯薬学

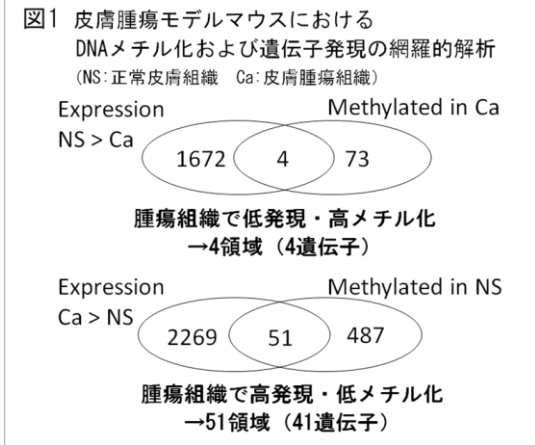
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：DNAメチル化 神経芽腫 腫瘍関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA メチル化は正常な胚発生・分化に関わる DNA 修飾機構のひとつであり、X 染色体の不活化やゲノムインプリンティングに関与している。しかし、近年 DNA メチル化の異常が様々な腫瘍の発生に関与されていることが報告されている。

(2) 我々は皮膚腫瘍モデルマウスを作製し、その正常皮膚と皮膚腫瘍を用いて DNA メチル化解析および遺伝子発現解析を網羅的に行った。その結果、正常組織と比較し腫瘍組織で高メチル化・低発現を示した遺伝子を 4 個、逆に低メチル化・高発現を示した遺伝子を 51 個認めた。これらの遺伝子は DNA メチル化変化と遺伝子発現変化とを伴うことから、腫瘍の発生・進展に関与する可能性が高く、腫瘍関連遺伝子である可能性が示唆された(図 1、Fujiwara K, et al. Mol Carcinog. 2013)。今回、これらの遺伝子についてヒト神経芽腫における変異を解析し、さらに、それらの変異と臨床データとの関連を調べた。(注釈：遺伝子の数は申請時より修正あり。上記文献参照。)



2. 研究の目的

ヒト神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子を同定し、その治療標的としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

材料は、正常副腎組織 3 検体、ヒト神経芽腫細胞株 4 株 (NB1、NB9、NB69、SK-N-SH)、神経芽腫臨床検体 19 検体 (表 1) を用いた。

【表 1】

神経芽腫臨床検体	Age at diagnosis (month)	sex	Disease stage (INSS)	INPC	Shimada classification	MYCN amplification	Prognosis (month)
case 1	6	M	2A	NL, D	F	1	157A
case 2	6	F	2A	NL, D	F	1	154A
case 3	6	M	3	NL, D	F	1	154A
case 4	6	F	3	NL, PD	F	1	152A
case 5	57	M	3	NL, PD	UF	1	156A
case 6	17	F	4	NL, PD	F	1	35AD
case 7	17	F	4	NL, D	UF	1	57AD
case 8	13	M	4	NL, PD	UF	1	56A
case 9	69	M	4	NL, PD	UF	1	66AD
case 10	41	F	4	NL, PD	UF	1	54AD
case 11	60	M	4	NL, PD	UF	1	51T
case 12	32	M	4	NL, PD	UF	1	47A
case 13	18	M	4	NL, PD	UF	1	56AD
case 14	20	M	4	NL, PD	UF	81	68A
case 15	20	M	4	NL, PD	UF	119	66A
case 16	30	M	4	NL, UD	UF	1	146A
case 17	47	F	4	NL, UD	UF	20	4 T
case 18	36	M	4	NL, UD	UF	150	113A
case 19	44	F	4	NL, UD	UF	207	14D

INSS: International Neuroblastoma Staging System, INPC: International Neuroblastoma Pathology Classification, NB: Neuroblastoma, D: Differentiated, PD: poorly differentiated, UD: undifferentiated, F: favorable histology, UF: unfavorable histology, F: Dead, A: alive, AD: alive with disease.

(1) まず正常副腎組織とヒト神経芽腫細胞株を用いて、Real-time RT-PCR を用いた遺伝子発現解析と Sequenom MassARRAY EpiTYPER を用いた DNA メチル化解析を行った。

(2) (1)の結果、正常副腎組織とヒト神経芽腫細胞株とで遺伝子発現および DNA メチル化レベルに有意差を認めた遺伝子につき、正常副腎組織と神経芽腫臨床検体を用いて同様の解析を行った。

(3) (2)の結果、正常副腎組織と神経芽腫臨床検体とで遺伝子発現および DNA メチル化レベルに有意差を認めた遺伝子については、脱メチル化剤 5-aza-2 deoxycytidine をヒト神経芽腫細胞株に作用させ、プロモーター CpG island の DNA メチル化レベルが同遺伝子の発現量と相関しているかを解析し、遺伝子発現制御機構を明らかにした。

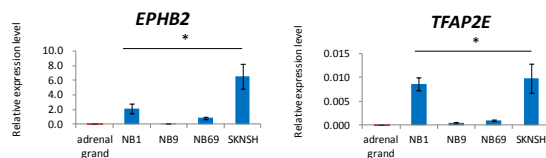
(4) 神経芽腫臨床検体の DNA メチル化レベルと臨床プロファイル (生存月数) から ROC 曲線を作成しカットオフ値を求めた。そのカットオフ値を用いて Kaplan-Meier 生存曲線を作成し、生存分析を行った。

4. 研究成果

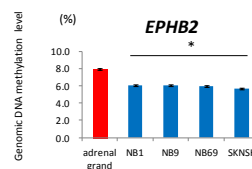
(1) ヒト神経芽腫細胞株を用いた解析では、正常副腎組織とヒト神経芽腫細胞株とで TFAP2E と EPHB2 が遺伝子発現および DNA メチル化レベルに有意差を認めた。TFAP2E は細胞株で高発現、高メチル化を、EPHB2 は細胞株で高発現、低メチル化を示した。

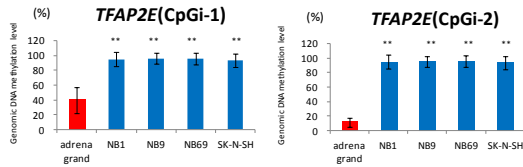
正常副腎組織: adrenal grand
 ヒト神経芽腫細胞株: NB1, NB9, NB69, SK-N-SH
 正常副腎組織と各細胞株の平均値の比較:
 †: 検定 *P<0.05 **P<0.01

【遺伝子発現】

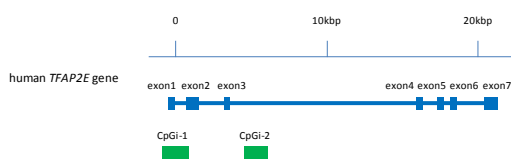


【DNA メチル化】





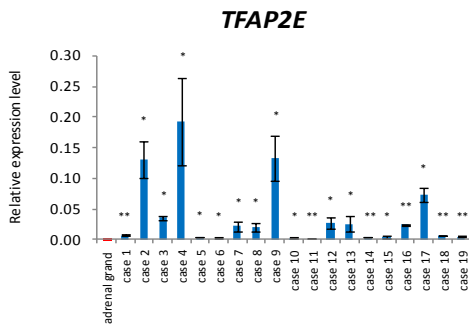
尚、TFAP2E は遺伝子領域に 2 つの CpG island を有するため、便宜的に上流から CpGi-1, 2 と定めた。



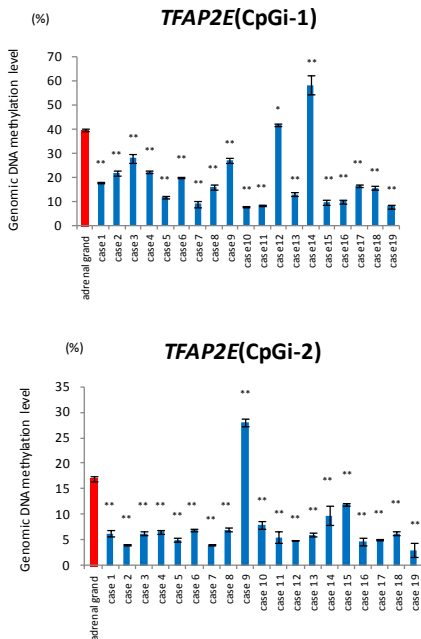
(2) (1) の結果絞られた 2 個の遺伝子を対象に正常副腎組織と神経芽腫臨床検体を用いて同様の解析を行ったところ、TFAP2E が正常副腎組織と比較して全ての神経芽腫臨床検体で有意に高発現であり、かつ低メチル化の傾向を認めた。

正常副腎組織:adrenal gland
神経芽腫臨床検体:case1~19
正常副腎組織と各臨床検体の平均値の比較
t-検定(n=3) *P<0.05 **P<0.01

【遺伝子発現】



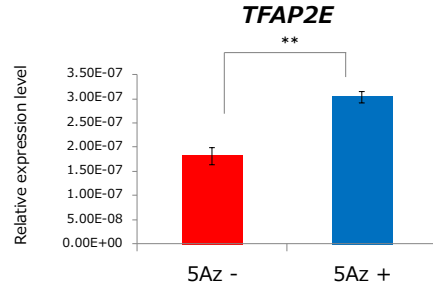
【DNA メチル化】



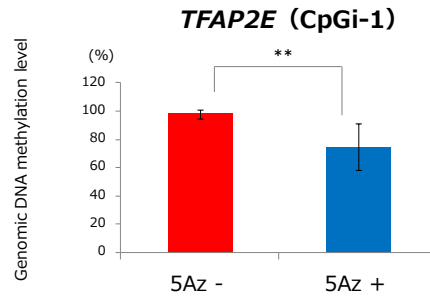
(3) ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-SH に 5-aza-2 deoxycytidine を作用させ、(1) の結果絞られた TFAP2E の DNA メチル化による遺伝子発現制御機構を解析したところ、CpGi-1 において 5-aza-2 deoxycytidine 非投与群と比較し 5-aza-2 deoxycytidine 投与群 (10 μM, 120 時間) で低メチル化・高発現となり、(2) の結果に矛盾しない結果となった。

5Az: 5-aza-2 deoxycytidine
5Az -: 5Az非投与
5Az +: 5Az 10μM 120時間投与
5Az-と5Az+の平均値の比較
t-検定(n=3) *P<0.05 **P<0.01

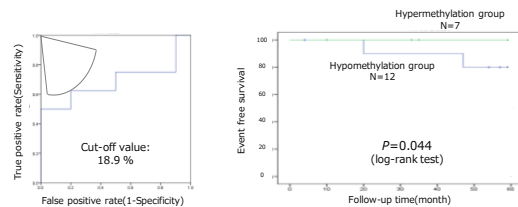
【遺伝子発現】



【DNA メチル化】



(4) 神経芽腫臨床検体における TFAP2E CpGi-1 の DNA メチル化レベルと臨床プロファイル (生存月数) から ROC 曲線を作成しカットオフ値を求めたところ 18.9%であった。この値を用いて Kaplan-Meier 生存曲線を作成したところ、低メチル化群が高メチル化群より予後不良であった (log-rank test、P=0.044)。



以上より、TFAP2E がヒト神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子である可能性が強く示唆され、その遺伝子発現は CpGi-1 の DNA メチル化の制御を受けている可能性が示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

①星 玲奈、大橋研介、越永従道 (11人中7番)、MassARRAY EpiTYPER を用いたマウス皮膚腫瘍特異的遺伝子のヒト神経芽腫における解析、第55回小児血液・がん学会学術集会、2013年11月29日、ヒルトン福岡シーホーク

②星 玲奈、大橋研介、越永従道 (11人中7番)、ヒト神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子の探索、第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都

③星 玲奈、大橋研介、越永従道 (11人中7番)、DNAメチル化解析によるヒト神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子の探索、第51回小児外科学会学術集会、2014年5月9日、大阪国際会議場(発表確定)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○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

大橋 研介 (OHASHI, Kensuke)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：10526065