

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670163

研究課題名(和文)がん自然退縮の制御機構解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of cancer spontaneous regression

研究代表者

門松 健治 (Kadomatsu, Kenji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80204519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：自然退縮は、がんの不可思議な現象の一つであり、治療応用に直結する重要テーマである。我々は神経芽腫のモデルMYCN Tgマウスに、ヒト神経芽腫1期の自然退縮に酷似した表現型が出現することを見出した。本研究で、生後2週の早期がん全例のsphere cultureに成功した。さらに、胎生期の交感神経節からもMYCN Tgマウスでsphereを作ることに成功した。今後、この材料を基にゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームのレベルでの詳細な解析が進めば、神経芽腫のがん発生過程解明、自然退縮機構解明に繋がる大きな成果を期待できる。

研究成果の概要(英文)：Spontaneous regression is an intriguing phenomenon which is linked to the development of therapy of cancers. We found spontaneous regression in the neuroblastoma model MYCN Tg mice. In this study, we could culture spheres from all specimen at early cancer stage, i.e., 2 weeks after birth. Furthermore, we succeeded sphere culture of embryonic sympathetic ganglia of MYCN Tg mice. Using these samples, we should be able to perform analyses at genome, epigenome and transcriptome levels, which may in turn lead to elucidation of mechanisms underlying cancer development and spontaneous regression.

研究分野：「癌」、「腫瘍学」

キーワード：自然退縮 がん 神経芽腫

## 1. 研究開始当初の背景

自然退縮は、がんの不可思議な現象の一つである。成人がんにもまれに見られるが、小児がん神経芽腫で最も特徴的であり、特に1期および4期に見られる。自然退縮の機構解明は治療応用に直結する重要テーマであるが、現実にはこれまで糸口さえ得られていない。我々は神経芽腫のモデル *MYCN* Tg マウスに、ヒト神経芽腫1期の自然退縮に酷似した表現型が出現することを見出した。すなわち、生後2週全例で局所に限局した早期がんが現れるにも関わらず、その7割しかがん進展はなく、残りの3割は生後6週までに自然退縮する。これは、「これまでで初めての自然退縮モデル」を得たことを意味する。

## 2. 研究の目的

この基盤を生かして、本研究で自然退縮の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

極早期のがん細胞を材料に、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームのレベルでの詳細な解析を行う。そして、その結果候補として同定された遺伝子群の機能解析、その細胞・個体レベルでの自然退縮誘起の証明へと繋げていきたい。具体的には、まず、データ解析にはバイオインフォマティクスを駆使する。それによってデータの統合を図り、自然退縮対がん進展(3対7)に注目して自然退縮制御遺伝子群の同定を行う。候補となる遺伝子異常・遺伝子発現について、早期がんのうち、自然退縮の可能性のあるがん細胞の遺伝子あるいは遺伝子発現を改変して、自然退縮を回避できるかをゴールにする。その評価は早期がん tumorsphere の長期培養において自然退縮を回避できるかを見ることによって行う。また、これと相補的な実験、すなわち、自然退縮の起きない早期がんあるいは進行がんの tumorsphere の遺伝子あるいは

遺伝子発現を改変して、自然退縮を誘導できることをもう一つのゴールとする。

## 4. 研究成果

元来、小児がんは driver gene mutation と言われるがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子の変異が極めて少ないことで知られている。神経芽腫はその代表格の一つで、次世代シーケンサーの解析でも約7割の症例には変異は見つからない。それなのに何故がんができるのか、あるいはその後に自然退縮が起こるのか、何も分かっていない。これまで自然退縮に関しては cell autonomous な理由によるもの(例えばあらかじめ細胞にプログラムされた機構)か、微小環境によるもの(例えば NGF のような成長因子の年齢依存的な枯渇)を想定してきたが、そもそもそれを検証するための細胞の確立はできていなかった。

本研究で、生後2週早期がん全例の sphere culture に成功した。さらに、胎生期の交感神経節からも *MYCN* Tg マウスで sphere を作ることに成功した。この意義は大きい。というのもこの sphere は継代ができるうえに同系統マウス皮下に移植して腫瘍を作ることができる。この特徴は野生型胎仔からの sphere では見られない。すなわち、野生型胎仔からの sphere は初代のみ培養可能であり、腫瘍形成能はない。本研究ではさらに、我々が確立した sphere 培養法をもちいて調整した細胞について今後の解析に耐えるだけの量を準備できた。今回、当初目標とした、自然退縮責任遺伝子の同定までは至らなかったが、胎生期 E13.5~生後2週~末期腫瘍の3点についてゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームのレベルでの詳細な解析が進めば、神経芽腫のがん発生過程解明、自然退縮機構解明に繋がる大きな成果を期待できる。すなわち、「自然退縮の分子機構を明らかにする」ことを目的とした本研究は大きく前進した。

今後、これまでに得たデータに加えて、E13.5～生後 2 週の sphere を中心に詳細なエピゲノム、トランスクリプトームのデータを取得する。準備した sphere 細胞を材料に、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームのレベルでの詳細な解析を行う。そして、バイオインフォマティクスを駆使して、データの統合を図り、自然退縮 対 がん進展 (3 対 7) に注目して自然退縮制御遺伝子群の同定を行うことが必要であると考えられた。

さらに、今回得たデータは、神経芽腫の発生機構への大きな足掛かりとなる。野生型マウスの胎生 13.5 日交感神経節からは sphere の初代培養はできるが継代はできない。もし、がん化初期に決定的な遺伝子 (群) が発現するならば、野生型 sphere を継代のできる形質へ転換することができるはずである。逆に、神経芽腫モデルマウスの胎生 13.5 日交感神経節からの sphere は継代可能である。従って、がん化初期に決定的な遺伝子 (群) のノックダウンにより、その形質は失われるはずである。このような in vitro の検証を今後も必要であると考えられた。これと相補的な in vivo 実験も予定する必要がある。すなわち、神経芽腫モデルマウスの胎生 13.5 日交感神経節からの sphere は腫瘍形成能を持ち、野生型のそれは持たない。従って、がん化初期に決定的な遺伝子 (群) のノックダウンあるいは発現導入によって、腫瘍形成能の形質も変わるはずである。このような in vivo の検証が必要であると考えられた。また、がん化初期に決定的な遺伝子 (群) はがん化初期にがん幹細胞を生み出すことが予想され、そのプロモーターが活性化される可能性がある。プロモーター下流に EGFP などのレポーターを付け、スフェアへの導入により、FACS などによるがん幹細胞の効率的選別を解析する必要があると考えられた。

## 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 13 件 )

- 1.Yuan Y, Makita N, Cao D, Mihara K, Kadomatsu K, Takei Y. Atelocollagen-Mediated Intravenous siRNA Delivery Specific to Tumor Tissues Orthotopically Xenografted in Prostates of Nude Mice and Its Anticancer Effects. *Nucleic Acid Ther.* 査読有, 25(2), 2015, 85-94. doi: 10.1089/nat.2014.0526
- 2.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.* 査読有, 106(4), 2015, 390-396. doi: 10.1111/cas.12628
- 3.Chen D, Ito S, Yuan H, Hyodo T, Kadomatsu K, Hamaguchi M, Senga T. EML4 promotes the loading of NUDC to the spindle for mitotic progression. *Cell Cycle.* 査読有, 2015. doi:10.1080/15384101.2015.1026514
- 4.Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies. *Expert Opin Drug Discov.* 査読有, 10(1), 2015, 53-62. doi:10.1517/17460441.2015.974544
- 5.Nakaguro M, Kiyonari S, Kishida S, Cao D, Murakami-Tonami Y, Ichikawa H, Takeuchi I, Nakamura S, Kadomatsu K. The nucleolar protein PES1 is a marker of neuroblastoma outcome and is associated with neuroblastoma differentiation. *Cancer Sci.* 査読有, 106(3), 2014, 237-243. doi: 10.1111/cas.12598
- 6.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*. 査読有, 13(7), 2014, 1115-1131. doi: 10.4161/cc.27983

7. 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*. 査読有, 9(1), 2014, e86813. doi: 10.1371/journal.pone.

8. Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine: an emerging target of drug development for treatment of multiple diseases. *Br J Pharmacol*. 査読有, 171(4), 2014, 811-813. doi: 10.1111/bph.12571.

9. Monma F, Hozumi Y, Ikematsu S, Kawaguchi M, Kadomatsu K, Suzuki T. Expression of midkine in normal human skin, dermatitis and neoplasms: association with differentiation of keratinocytes. *J Dermatol*. 査読有, 40(12), 2013, 980-986. doi: 10.1111/1346-8138.12333.

10. Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P. Therapeutic potential of midkine in cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*. 査読有, 171(4), 2014, 936-944. doi: 10.1111/bph.12537.

11. Kishida S, Kadomatsu K. Involvement of midkine in neuroblastoma tumorigenesis. *Br J Pharmacol*. 査読有, 171(4), 2014, 896-904. doi: 10.1111/bph.12442.

12. Duverle DA, Takeuchi I, Murakami-Tonami Y, Kadomatsu K, Tsuda K. Discovering

combinatorial interactions in survival data. *Bioinformatics*. 査読有, 29(23), 2013, 3053-3059. doi: 10.1093/bioinformatics/btt532.

13. Kadomatsu K, Kishida S, Tsubota S. The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. *J Biochem*. 査読有, 53(6), 2013, 511-521. doi: 10.1093/jb/mvt035.a

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Kadomatsu K. Biomedical research at Nagoya University: International joint symposium Nagoya University, University of Adelaide, University of Freiburg, Mar 18, 2014, Nagoya University, Aichi Nagoya

〔図書〕(計 1 件)

1. Kishida S and Kadomatsu K. Springer, Sugar Chains, 2015, 11(127-138)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/>  
名古屋大学大学院医学系研究科分子生物学

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

門松 健治 (KADOMATSU Kenji)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 80204519

(2)研究分担者

なし