

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462718

研究課題名(和文) 腫瘍特異的遺伝子の解析によるヒト腎芽腫およびヒト肝芽腫の新規腫瘍関連遺伝子の探索

研究課題名(英文) Searching for tumor associated genes of human nephroblastoma and human hepatoblastoma by analysis of tumor specific genes

研究代表者

越永 従道 (KOSHINAGA, Tsugumichi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70205376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎芽腫及び肝芽腫における新規腫瘍関連遺伝子の同定と、治療標的としての可能性の検討を目的とした。マウス皮膚がん組織においてゲノムメチル化状態および発現レベルが変異している遺伝子を網羅的に解析し、得られた候補のうち、ZAR-1が肝芽腫・腎芽腫両細胞株で、正常組織と比べ有意に低発現であることを確認した。しかしZAR-1の発現抑制では明確な形質の変化は見られなかった。次に、別の候補遺伝子NRP1について、肝芽腫における機能解析を行い、NRP1の発現抑制により肝芽腫細胞のコロニーが縮小し増殖率も低下することを確認した。この結果はNRP1が癌遺伝子として機能している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Current study was performed to newly identify tumor related genes and investigate their possibility as noble therapeutic targets in nephroblastoma and hepatoblastoma. First, we screened the candidate genes aberrantly methylated and expressed in mice skin cancer, which were induced by two step chemical carcinogenesis. Among those candidate genes, we found that the expression level of Zygote Arrest 1 (ZAR-1) was significantly suppressed in nephroblastoma and hepatoblastoma cell lines compared to normal tissues. To elucidate the function of ZAR1, we silenced this gene in these cell lines by using siRNA, however no obvious difference was observed between ZAR1 silenced cells and controls. We then conducted the functional analysis of Neuropilin 1 (NRP1) in hepatoblastoma. It was clearly shown that NRP1 silenced hepatoblastoma cells showed lower growth rate and smaller colony size compared to those in control cells. This result indicate that NRP1 has an oncogenic function in hepatoblastoma.

研究分野：小児外科

キーワード：小児腫瘍学 肝芽腫 腎芽腫 細胞増殖能

1. 研究開始当初の背景

日本における小児悪性腫瘍の新規年間登録数はおよそ2,000例であり、小児期の死亡原因としては不慮の事故に次ぐ2番目に多い。小児固形腫瘍に限ると、毎年600~700例の登録があり、神経芽腫、腎芽腫、肝芽腫が代表的な疾患である。

腎芽腫と肝芽腫は、小児腎腫瘍と小児肝腫瘍のそれぞれ約90%を占める。化学療法、放射線療法、手術療法を組み合わせた集学的治療により治療成績は徐々に向上してきているが、術前化学療法を行っても切除可能とならない症例、遠隔転移を伴う症例は依然として予後不良である。現在までに腎芽腫、肝芽腫共に強力な予後規定因子は報告されておらず、腫瘍関連遺伝子の同定や新規治療薬の開発が強く望まれている。

DNAメチル化は、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、正常の発生に必須な現象である。しかし、最近では様々な腫瘍においてDNAメチル化異常により腫瘍遺伝子の活性化、腫瘍抑制遺伝子の不活性化が生じ、腫瘍発生に関わっていることが報告されている。我々は現在までに、マウス組織特異的、特に精巣特異的なDNAメチル化変化領域を神経芽腫において解析する事で、神経芽腫の予後と強く相関する遺伝子 *ZNF206* を同定した (Kawashima H, et al. *Int J Oncol.* 2012)。また、組織特異的なDNAメチル化変化領域を神経芽腫細胞株と神経芽腫臨床検体で検討し、*ZARI* や *SLC16A5* といった神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子を同定した (Sugito K, et al. *Pediatr Blood Cancer.* 2013, Sugito K, et al. *J Pediatr Surg.* 2013)。このように、DNAメチル化異常は組織や臓器の枠組みを超えて、新規腫瘍関連遺伝子の同定に利用できる。

今回、我々は、7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を用いた2段階発癌プロトコールにより皮膚腫瘍モデルマウスを作製した。その皮膚腫瘍組織および正常皮膚組織より genomic DNA をそれぞれ採取し、メチル化DNA免疫沈降および NimbleGen promoter plus CpG island array にて網羅的DNAメチル化解析を行った。その結果、正常皮膚組織と比較して皮膚腫瘍組織で高メチル化領域が77箇所、低メチル化領域が538箇所あった。さらに同組織からRNAを抽出し、Agilent whole genome microarray にて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、正常皮膚組織と比較して皮膚腫瘍組織において有意に高発現であった遺伝子が2,320個、逆に正常皮膚組織において有意に高発現であった遺伝子が1,676個であった (Fujiwara K, et al. *Mol Carcinog.* 2015)。

以上より絞り込まれた55個の遺伝子は腫瘍組織と正常組織とで比較し発現変化とDNAメチル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新規腫瘍関連遺伝子の可能性があると考えられた。神経芽腫においてこれらの遺伝子発現解析とDNAメチル化解析を行い、新規腫瘍特異的遺伝子として *Tcfap2e* 遺伝子および *Ephb2* 遺伝子の同定に成功した。

一方、悪性腫瘍の増殖・促進の重要な因子として血管新生に着目した。血管新生には、その促進因子として血管内皮増殖因子

(vascular endothelial growth factors: VEGFs) が大きく関与している。加えて、細胞膜受容体である Neuropilin 1 (NRP1) が VEGFs の共受容体として、血管新生増殖因子であることが報告されている。

NRP1 は多くの固形腫瘍で高発現が報告されており、抑制によって腫瘍の増殖・浸潤・遊走が抑制されることがわかっている。現在、NRP1 を標的とした高親和性組み換えヒト IgG モノクローナル抗体である MNRP1685A に関して、進行固形癌患者を対象とした Phase I a および Phase I b 臨床試験が行われている (Weekes CD, et al. *Invest New Drugs.* 2014, Patnaik A, et al. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014)。しかしながら、NRP1 の肝芽腫での研究報告はなく、役割は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子を同定した方法を参考にし、腎芽腫 および肝芽腫において新規腫瘍関連遺伝子を同定し、治療標的としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 新規腫瘍関連遺伝子の絞り込み
皮膚腫瘍モデルマウスによって絞られた55個の新規腫瘍関連候補遺伝子のヒト相同領域を UCSC Genome Browser on Human (<http://genome.ucsc.edu/>) にてデータベースサーチを行い同定する。55個の候補遺伝子のうちヒト相同領域のない遺伝子を除外し、CpG に位置するものを優先的に行う。

(2) 候補遺伝子の遺伝子発現解析
正常腎組織と腎芽腫細胞株 (SKNEP-1, G401) および正常肝組織と肝芽腫細胞株 (HepG2, Huh6 clone5) を用いて、上記で絞り込まれた新規腫瘍関連候補遺伝子につき Real-time PCR にて定量的遺伝子発現解析を行う。

(3) 候補遺伝子の機能解析

(2) で、正常組織と腫瘍組織で発現に差を認めた遺伝子について、機能解析を行う。Lipofection 法を用いて siRNA を導入し、遺伝子の抑制状態における①細胞形態、②細胞増殖能、を解析する。

① 細胞形態:

肝芽腫細胞株 (HepG2, Huh6) に siRNA

を導入後、48 時間時点での形態を顕微鏡下に観察・記録する。

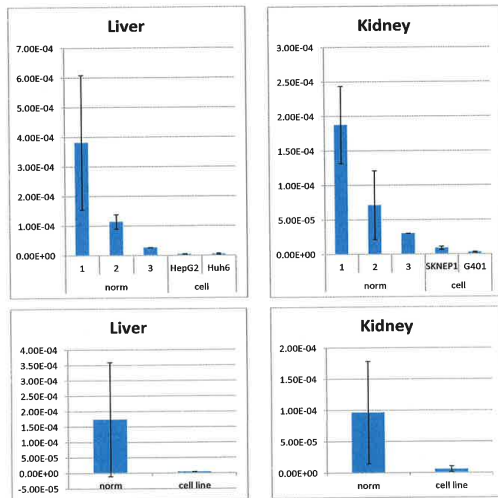
- ② 細胞増殖能：WST-8 assay
候補遺伝子に対する siRNA、および Control siRNA を SK-N-AS に transfect し、 1.0×10^4 個/100 μ l/well になるように 96well plate に播種した。その後培養を行い、12、24、36、48 時間後に吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) 新規腫瘍関連遺伝子の絞り込み
55 個の新規候補遺伝子のヒト相同領域を絞り込んだ結果、*Zygote Arrest 1 (ZAR-1)* が腫瘍関連遺伝子として同定された。

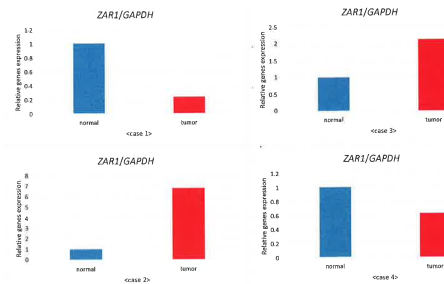
(2) 候補遺伝子の発現解析

(1) で同定された遺伝子 *ZAR-1* に対して、ヒト小児肝腫瘍については正常ヒト小児肝組織 3 検体とヒト肝芽腫細胞株 2 株 (HepG2, Huh6 clone5) を、ヒト小児腎腫瘍については正常ヒト小児腎組織 3 検体とヒト腎芽腫細胞株 2 株 (G401, SK-NEP-1) を対象として、それぞれ RNA を抽出した。Real-time PCR を行い、mRNA レベルでの定量的遺伝子発現解析を行った。



その結果、肝組織での *ZAR-1* の発現は正常組織に比べ、肝芽腫細胞株で低発現であった。腎組織においても同様に、*ZAR-1* の発現は正常組織に比べ、腎芽腫細胞株で低発現であった。

また、当科で保存している肝芽腫臨床検体 4 例に対して、正常肝組織と腫瘍組織における *ZAR-1* の発現を Real-time PCR で解析し、比較した。



その結果、正常組織と比べて腫瘍組織での発現量が高い症例が 2 例、発現量が低い症例が 2 例であり、一定の結果が得られなかった。

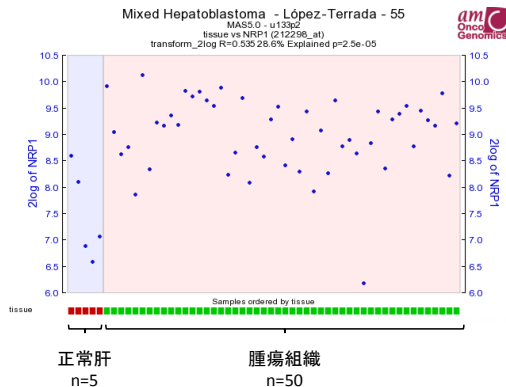
(3) 候補遺伝子の発現抑制

ZAR-1 の機能解析を行うために、ヒト肝芽腫細胞株 2 株 (HepG2, Huh6 clone5) に対して、Lipofection 法を用いて siRNA 導入による発現抑制を試みた。しかしながら、どちらの細胞株に対しても一定の抑制効果が得られなかった。

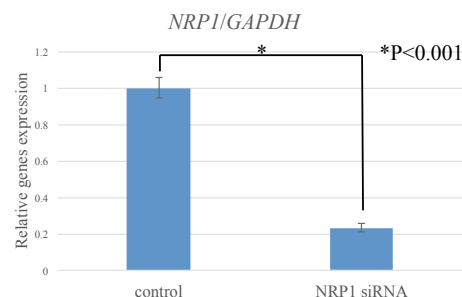
(4) その他の候補遺伝子の機能解析

NRP1 の臨床検体における発現を public database である R2: Genomics Analysis and Visualization Platform

(<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) で検索したところ、腫瘍組織において有意に高発現 ($p=2.5e-05$) であった。



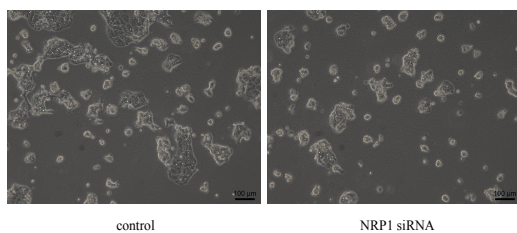
そこで、肝芽腫細胞株 (Huh6) に対して、*NRP1* に対する siRNA を導入し発現抑制効果を Real-time PCR で解析したところ、*NRP1* の有意な発現抑制効果が得られた。



そのため、NRP1 の抑制状態において、①細胞形態、②細胞増殖能を解析した。

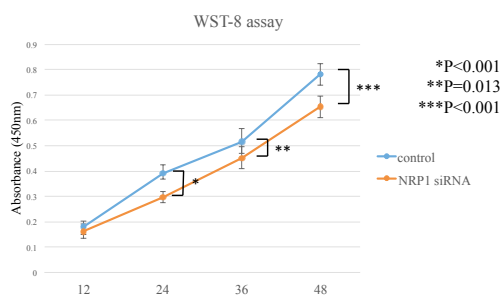
① 細胞形態

siRNA 導入群で細胞塊が縮小した。



② 細胞増殖能

siRNA を導入し、12・24・36・48 時間後の生細胞数を WST-8 assay で解析したところ、siRNA 導入群において 24・36・48 時間後の生細胞数が有意に低下した。



以上の結果から、肝芽腫において、NRP1 が腫瘍促進的に働いていることが示唆された。

今後は、肝芽腫に対してのさらなる機能解析と、腎芽腫細胞株に対しての研究を進める予定である。

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 1 件)

①

Yoshizawa Shinsuke, Koshinaga Tsugumichi, et al. Pyrrole-midazole polyamide-mediated silencing of KCNQ10T1 expression induces cell death in Willms' tumor cells. *Int J Oncol.* 2015 Jul;47(1):115-21. doi: 10.3892/ijo.2015.3018. Epub 2015 May 22. (査読あり)。

[学会発表] (計 4 件)

- ① 渡邊 揚介、越永 従道 (13 人中 13 番目)、ヒト神経芽腫における Zygote Arrest 1 (ZAR1) の機能の検討、第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会、2015 年 11 月 27 日、甲府富士屋ホテル (山梨県・甲府市)
- ② 渡邊 揚介、越永 従道 (12 人中 10 番目)、ヒト神経芽腫細胞株における ZAR1 遺伝子とレチノイン酸関連遺伝子の検討、第 52 回日本小児外科学会学術集会、2015 年 5 月 28 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ③ 渡邊 揚介、越永 従道 (12 人中 10 番目)、ヒト神経芽腫における Zygote arrest 1 (ZAR1) の機能の検討、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 18 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- ④ 星 玲奈、越永 従道 (12 人中 10 番目)、マウス皮膚腫瘍特異的 DNA メチル化領域を用いた新規ヒト神経芽腫関連遺伝子の探索、第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会、2014 年 11 月 28 日、岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

[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
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越永 従道 (KOSHINAGA, Tsugumichi)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：70205376

(2) 研究分担者

杉藤 公信 (SUGITO, Kiminobu)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：10328750

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：40595708

古屋 武史 (FURUYA, Takeshi)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：20568539