

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860801

研究課題名(和文) DENNドメイン蛋白質による神経芽腫がん幹細胞の発生・分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of DENN domain proteins in the development of neuroblastoma cancer stem cells.

## 研究代表者

山本 暢之 (Yamamoto, Nobuyuki)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20596043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫高リスク群患者は、50%以上が再発し、未だ長期生存率は40%に満たない。細胞のダイナミックな変化を支える細胞内小胞輸送は、再発に関与する神経芽腫がん幹細胞の発生・分化に重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、細胞内小胞輸送の重要な制御分子であるDENNドメイン蛋白質に注目し、そのメンバーが神経芽腫の腫瘍形成・進展に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：More than half of high-risk neuroblastoma patients experience tumor relapses and less than 40% can expect a long-term survival. Intracellular vesicle transport seems to play an important role on the development of neuroblastoma cancer stem cells that are responsible for tumor relapses. In this study, we focused on DENN domain proteins, regulators of intracellular vesicle transport, and revealed that a member of DENN domain proteins is involved in the progression of neuroblastoma.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：神経芽腫 細胞内小胞輸送 低分子量G蛋白質 DENNドメイン蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児がん死亡の約 15%を占める代表的な小児難治性固形がん、自然消退例がある一方、高リスク群では 50%以上が再発し、長期生存率は 40%に満たない。そのため、高リスク群での予後改善は現在の小児がん診療における喫緊の課題である。

近年、高リスク神経芽腫患者における治療標的分子の同定を目指した全ゲノム解析が行われ、約 1/4 の高リスク患者に治療標的となる遺伝子変異が見出されたが、残り 3/4 の患者の治療標的分子の同定には、遺伝子解析に代わる新たな手法が必要だと考えられる。

神経芽腫を含む多くのがんで自己複製能と多分化能をもつがん幹細胞が同定され、神経芽腫の再発は、治療後も残存したがん幹細胞が再活性化されることで起こると考えられるようになった。しかしながら、がん幹細胞の発生・分化機構は未だ明らかにされておらず、その解明は新規治療法の開発に繋がると期待される。

免疫不全マウスに接種することで神経芽腫を生み出す神経芽腫がん幹細胞は、通常神経芽腫細胞と異なる球状の“sphere”と呼ばれる形態を示すことが既に知られており、神経芽腫がん幹細胞の発生・分化には細胞形態のダイナミックな変化を支える細胞内小胞輸送の活性制御が必須であると予想される。

細胞内小胞輸送の制御分子の一つである DENN ドメイン蛋白質(DENN/RabGEFs)は、Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質(Rab)の活性化と共に細胞内での局在を規定する。これまでに DENN/RabGEFs のメンバーとがんを含むヒト疾患との関連が報告されており、Rab のメンバーについても、神経芽腫細胞の分化に関与することが報告されている。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では神経芽腫がん幹細胞の発生・分化において、細胞内小胞輸送を制御する DENN/RabGEFs が果たす役割の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 神経芽腫がん幹細胞の発生・分化に関わる DENN/RabGEFs のメンバーの同定

神経芽腫培養細胞株 BE(2)-C 細胞を用いて、通常の条件で培養した神経芽腫細胞と、ニューロスフェアに準じた条件で培養し単離した、神経芽腫がん幹細胞の形成するスフェアから RNA を抽出し、Real-time RT-PCR 法を用いて、DENN/Rab GEFs の全てのメンバーの発現解析を行う。

(2) 見出された DENN/RabGEFs のメンバーが、神経芽腫の腫瘍形成能に与える影響についての検討

上記(1)で見出された DENN/RabGEFs のメンバーについて、過剰発現細胞・発現抑制細胞を用いて、コロニー形成能、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能の解析を進める。

(3) 見出された DENN/RabGEFs に活性化される Rab メンバーの同定

DENN/RabGEFs のメンバーは、各々 Rab のメンバーを特異的に活性化すると考えられるので、見出された DENN/RabGEFs に活性化される Rab のメンバーを同定する。

## 4. 研究成果

(1) 神経芽腫がん幹細胞の発生・分化に関わる DENN/RabGEFs のメンバーの同定

通常の神経芽腫細胞と、ニューロスフェアに準じた条件で培養し単離したスフェアにおける DENN/RabGEFs の発現解析を行った結果、著しく発現量の変化するメンバーとして、DENND2A を見出した。

また、DENND2A を、shRNA を用いて発現を抑制した神経芽腫細胞と、発現プラスミ

ドを用いて過剰発現した神経芽腫細胞を樹立し、スフェア形成能を解析したところ、過剰発現した細胞ではスフェアの数が減少し、発現を抑制した細胞ではスフェアの数が増加した。

これらの成果により、神経芽腫において、DENND2A が神経芽腫がん幹細胞の発生・分化に関わっていることが示唆された。

(2) DENND2A が神経芽腫の腫瘍形成能に与える影響についての検討

次に、DENND2A が神経芽腫の腫瘍形成能に与える影響について検討した。DENND2A の過剰発現細胞と発現抑制細胞を樹立し、寒天培地におけるコロニー形成能及び免疫不全マウスにおける腫瘍形成能を解析したところ、DENND2A の過剰発現細胞ではコロニー形成能、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能とも低下した。一方、DENND2A の発現抑制細胞では、コロニー形成能、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能とも亢進した。このことから、DENND2A は神経芽腫の進展において抑制的に働くことが考えられた。

(3) DENND2A に活性化される Rab のメンバーの同定

DENND2A が活性化する Rab のメンバーとして、Rab9A と Rab9B が既に報告されているので、神経芽腫における Rab9 の発現と神経芽腫の進展との関連を解析した。DENN/RabGEFs と同様に通常の神経芽腫細胞と、スフェアにおける Rab9A, Rab9B の発現を Real-time RT-PCR 法で解析した結果、Rab9B が通常の神経芽腫細胞とスフェアにおいて発現の著しく異なる Rab のメンバーとして同定された。

次に Rab9B の発現が神経芽腫の腫瘍形成に与える影響について検討した。Rab9B の過剰発現細胞・発現抑制細胞を樹立し、その各々について、ニューロスフェアに準じ

た条件で培養した場合のスフェア形成能、寒天培地におけるコロニー形成能及び免疫抑制マウスにおける腫瘍形成能を解析した。Rab9B の過剰発現細胞では、スフェア形成能・コロニー形成能・腫瘍形成能とも低下したのに対して、Rab9B の発現抑制細胞においては、スフェア形成能・コロニー形成能・腫瘍形成能とも亢進した。

これらの結果から、Rab9B は神経芽腫の進展に抑制的に働くことが示された。

(4) 神経芽腫患者の予後と DENND2A, Rab9B の発現の関係についての検討

実際の患者における DENND2A の発現と、患者予後について、神経芽腫データベースである R2 (<http://r2.amc.nl>) を用いて検討した。DENND2A を高発現していた患者群は発現の低い群に比べて有意に予後が良く、DENND2A の発現が神経芽腫に対して抑制的に働くことを支持する結果であった。

以上の結果から、本研究では難治性小児がんである神経芽腫において、細胞内小胞輸送に関わる重要な分子である DENND2A と、それにより活性化される Rab9B が、神経芽腫の進展に関与していることを明らかにした。今回の研究成果は、神経芽腫における新たな治療のアプローチの端緒となる可能性がある。

## 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 3 件)

Yamamoto N, Kozaki A, Hartomo TB, Yanai T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Hirase S, Mori T, Hayakawa A, Iijima K, Nishio H, Nishimura N. Differential expression of minimal residual disease markers in peripheral blood and bone marrow samples from high-risk neuroblastoma patients. *Oncol Let.* 10(5): 3228-3232, 2015. (査

読あり), DOI: 10.3892/ol.2015.3710.

Hartomo TB, Van Huyen Pham T, Yamamoto N, Hirase S, Hasegawa D, Kosaka Y, Matsuo M, Hayakawa A, Takeshima Y, Iijima K, Nishio H, Nishimura N. Involvement of aldehyde dehydrogenase 1A2 in the regulation of cancer stem cell properties in neuroblastoma. *Int J Oncol*. 46(3): 1089-1098, 2015. (査読あり), DOI: 10.3892/ijo.2014.2801.  
Hirase S, Saitoh A, Hartomo TB, Kozaki A, Yanai T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Yamamoto N, Mori T, Hayakawa A, Iijima K, Nishio H, Nishimura N. Early detection of tumor relapse/re-growth by consecutive minimal residual disease monitoring in two high-risk neuroblastoma patients. *Oncol Let*. in press. (査読あり).

[学会発表](計 5 件)

Uemura S, Yamamoto N, Kozaki A, Yanai T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Hayakawa A, Iijima K, Nishio H, and Nishimura N. Neuroblastoma minimal residual disease markers are differentially expressed in peripheral blood and bone marrow samples. *11th Asian Society for Pediatric Research* Osaka, Japan, April 15-18, 2015

Nishimura N, Hartomo TB, Pham TVH, Yamamoto N, Hirase S, Hayakawa A, Yanai T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Iijima K, Nishio H. Aldehyde dehydrogenase ALDH1A2 regulates cancer stem cell

properties in neuroblastoma. **第56回日本小児血液・がん学会学術集会** 岡山, 2014年11月28-30日

Nishimura N, Hartomo TB, Pham TVH, Yamamoto N, Hirase S, Hayakawa A, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Takeshima Y, Iijima K, and Nishio H. Aldehyde dehydrogenase 1A2 expression correlates with cancer stem cell properties in neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research Conference 2014* Cologne, Germany, May 13-16, 2014

西村範行, Thi Van Huyen Pham, Tri Budi Hartomo, 山本暢之, 平瀬敏志, 早川晶, 矢内友子, 長谷川大一郎, 川崎圭一郎, 小阪嘉之, 松尾雅文, 飯島一誠, 西尾久英. 神経芽腫がん幹細胞の発生・分化における細胞内小胞輸送の制御因子 Rab6B の役割. **第56回日本小児血液・がん学会学術集会** 岡山, 2014年11月28-30日

Nishimura N, Hartomo TB, Pham TVH, Yamamoto N, Hirase S, Hayakawa A, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Takeshima Y, Iijima K, and Nishio H. Induction of ALDH1A2 expression is critical for cancer stem cell properties in neuroblastoma. *AACR Annual Meeting 2014* San Diego, CA, USA, April 5-9, 2014

[図書](計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 暢之 (Yamamoto, Nobuyuki)  
神戸大学医学部附属病院・助教

研究者番号：20596043

(2) 研究協力者

西村 範行 (Nishimura, Noriyuki)

神戸大学大学院・特命教授

研究者番号：00322719

早川 晶 (Hayakawa, Akira)

神戸大学大学院・准教授

研究者番号：40379376

小阪 嘉之 (Kosaka, Yoshiyuki)

兵庫県立こども病院 血液腫瘍科部長

矢内 友子 (Yanai, Tomoko)

兵庫県立こども病院 血液腫瘍科医長