

令和元年5月20日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08617

研究課題名(和文) 神経芽腫における成長因子Midkineの細胞内シグナル伝達機構

研究課題名(英文) The intracellular signaling of Midkine in neuroblastoma

研究代表者

岸田 聡 (Kishida, Satoshi)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20402563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：分泌性の成長因子であるMidkineについて、神経芽腫の骨髄転移細胞において、抗がん剤であるシスプラチンに対する耐性誘導に寄与している可能性が示された。つまり、シスプラチンとMidkine標的治療とを併用することにより、骨髄転移巣を効果的に叩くことができる可能性がある。一方でin vitroの結果からは、マウス線維芽細胞(MEF)がMidkineに対して顕著に応答することを見出した。線維芽細胞がMidkineに応答したことから、がん組織におけるMidkineの作用について、その標的が、がん細胞だけでなく、線維芽細胞等、間質を形成する細胞も含まれる可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫の治療において、最も致命的となるのは「再発」であり、好再発部位の一つが骨髄である。つまり、悪性度の高い神経芽腫細胞にとって、原発部位よりもむしろ、骨髄の環境の方が幸便であることが推察される。この骨髄に転移した神経芽腫細胞を効果的に叩く治療法が開発されればインパクトがあるが、本研究で明らかにしたMidkineの機能は、その大きなヒントを与えていると考えられる。Midkineが、骨髄に転移した神経芽腫細胞のシスプラチン耐性誘導に寄与している可能性が示唆されたため、その働きを阻害することで、シスプラチン薬効の奏功を期待できる。

研究成果の概要(英文)：Midkine, a secreted growth factor, was shown to be involved in cisplatin resistance of bone marrow-metastasized neuroblastoma cells. The midkine-targeting therapy together with cisplatin could efficiently kill bone marrow-metastasized neuroblastoma cells. We also found that mouse embryonic fibroblast (MEF) remarkably responded to midkine. This result suggests that midkine would signal not only to neuroblastoma cells but also stromal cells including fibroblasts.

研究分野：分子生物学、がん

キーワード：神経芽腫 Midkine 骨髄転移 線維芽細胞 シスプラチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は難治性の小児悪性固形腫瘍であり、近年では分子標的治療や免疫治療も導入されつつあるものの、その治療成績はまだ充分とは言えない。我々は、分泌性成長因子である Midkine に注目し、その神経芽腫への寄与を明らかにすると並行して、分子標的治療のためのツールを開発してきた。Midkine は神経芽腫を含む様々な腫瘍において高発現しているが、正常な個体における発現はほとんど胎児期に限られる。更には細胞外に分泌されるタンパク質であることから、分子治療の標的として極めて好便な条件を備えている。我々はこれまでに、血中への Midkine の分泌量が有意な予後不良因子になること、そしてモデルマウスを用いた解析から、Midkine が神経芽腫の発生と進展に寄与していることを明らかにしてきた。そして一方で、企業と協同して RNA aptamer (株式会社リボミック)、モノクローナル抗体 (株式会社医学生物学研究所) という Midkine を標的とした分子治療のツールの開発を進め、有望な抗腫瘍効果を確認している。モノクローナル抗体に関しては既にヒト化も完了しており (特願 2012-168637)、更に Midkine への親和性を高めた改良型を複数作製している。

尚、これらの Midkine 標的治療は、シスプラチンとの併用を念頭において検討を行ってきた。シスプラチンは神経芽腫治療に欠かせない主力抗がん剤であるが、副作用である腎障害が致命的な欠点になっている。腎障害は不可逆的であり治癒しない。これは小児がんである神経芽腫治療においては特に決定的な暗部であるが、実は Midkine が理想的な解決策をもたらす。まず Midkine の不活化は、好中球浸潤抑制を介してシスプラチン腎障害を緩和する。更に、抗体とシスプラチンの併用投与は神経芽腫に対して相乗的な抗腫瘍効果を示す。つまり、Midkine 標的治療はシスプラチン腎障害を防ぎつつ、抗腫瘍効果を増強できる。

2. 研究の目的

神経芽腫に対する分子治療の有力な候補遺伝子である Midkine の作用機序について、次の二つの点からアプローチする。

一つ目は、神経芽腫モデルである TH-MYCN Tg マウス、及び Midkine ノックアウトマウスを用いて、神経芽腫に対するシスプラチン治療と、それに対する Midkine の寄与を *in vivo* で示すことである。これまでの知見からは、Midkine 非存在下 (Midkine ノックアウトマウス) では、シスプラチンの効果が奏功することが期待される。

もう一つは、Midkine が働く分子機構 (特に Midkine を受容した細胞の細胞内シグナル伝達) へのアプローチである。神経芽腫細胞はあまねく Midkine を発現しており、ノックダウンすると増殖が抑制されて死んでしまうため、細胞内シグナルを解析することが困難であった。そこで、Midkine シグナルを解析するモデル系として、マウス線維芽細胞 (MEF) の検討を行った。

3. 研究の方法

TH-MYCN Tg マウスの homozygote は、100%神経芽腫を発症して 6-7 週齢までに死亡することがわかっている。そこで、Midkine^{+/+}と Midkine^{-/-}の homozygote に対してシスプラチンを投与し、7 週齢以降の経過を観察した。異常が認められた場合は安楽死させ、腫瘍の有無を確認すると同時に、大腿骨から骨髓を採取し、当教室が開発した sphere culture の条件で培養を行った。この系では、悪性度の高い神経芽腫細胞を sphere として選択的に培養することができる。つまり、sphere として培養することによって骨髓転移神経芽腫細胞を検出でき、その培養した sphere 細胞を用いて、*in vitro* での機能解析を行うことができる。

マウス線維芽細胞 (MEF)は E16.5 の野生型胚から樹立し、培養を継続して株化した。3 時間の serum starvation の後、MEF に対して yeast に発現させて精製した recombinant Midkine タンパク質を添加し、ウェスタンブロッティングでリン酸化 RPS6 を検出することによって、mTOR 経路の活性化を確認した。

4. 研究成果

(1) TH-MYCN Tg homozygote マウスへのシスプラチン投与

TH-MYCN Tg homozygote に対してシスプラチンを投与し、一旦寛解状態にした後の再発を検討した。まず、シスプラチンの投与条件を検討した結果、6-8 週齢にかけての 8mg/kg/week が適当であると判断した。これより高用量を投与した場合には、腎障害等の副作用が生じた。次に、Midkine^{+/+}と Midkine^{-/-}のそれぞれについて、上記条件でのシスプラチン投与を行った。この治療によって原発腫瘍はほぼ消失し、その後の経過を検証した。体重減少や腹部膨張などの異常が認められた段階でサクリファイスし、腫瘍の有無を確認すると同時に、骨髓を採取して sphere 培養を行った。なお、異常なく生存したマウスについては、20 週齢に達した段階でサクリファイスし、同様に腫瘍の確認と骨髓からの sphere 培養を行った。その結果、期待に反して、Midkine^{+/+}と Midkine^{-/-}に関わらず、一定の割合で再発個体が現れ、両者の間で差は認められなかった。更に、骨髓から sphere を培養できた個体 (= 骨髓転移をきたしている個体)の割合についても、Midkine^{+/+}と Midkine^{-/-}で差は認められなかった。つまり、骨髓転移そのものに Midkine は寄与していない可能性が示唆される。ところが興味深いことに、Midkine^{-/-}マウスから培養した sphere はほとんど継代できなかったのに対して、Midkine^{+/+}マウスから培養した sphere は繰り返しの継代が可能であった (表 1)。

	再発マウス (匹)	Sphere 培養可 (匹)	Sphere 継代可 (匹)
Midkine ^{+/+}	7	7	6 (85.7%)
Midkine ^{-/-}	5	4	1 (25.0%)

表 1 シスプラチン治療後の再発マウスから培養した sphere の表現型

Sphere を継代できるという表現型は、sphere 細胞の自己複製能を示唆すると考えられる。Midkine^{-/-}マウスでは、骨髓転移細胞から培養した sphere において自己複製能が毀損しているという結果から、Midkine のノックアウトによって、骨髓転移細胞に対するシスプラチンの薬効が奏功している可能性が考えられる。今回のシスプラチン投与条件は 8mg/kg/week を 3 回というものであったが、個々の個体に合わせて、原発腫瘍が消失するまで投与を続けるという条件で検討すれば、治療後の生存曲線においても有意な差が得られると考えており、今後の検討課題とする。

培養した sphere 細胞について、Midkine^{+/+}と Midkine^{-/-}との間でシスプラチン感受性に差があるかどうかを *in vitro* で検討したが差は認められず、両者ともヒト神経芽腫細胞と比較して感受性が相対的に高い結果となった。この原因については、周囲の間質細胞等、*in vivo* 特有の条件が欠落しているという要因がまず考えられる。また、sphere 用の培地においては、15%の Chick Embryonic Extract (CEE)を添加しているが、この CEE には Midkine が含まれていることを確認している。因みに、通常の細胞培養に使用する Fetal Bovine Serum (FBS)からは Midkine は全く検出されない。これは、Sphere として培養される、悪性

度の高い神経芽腫細胞に Midkine が重要な寄与をしている可能性を示唆するものである一方、*in vitro*で Midkine^{+/+}と Midkine^{-/-}の sphere の間でシスプラチン感受性に差が認められなかった原因とも考えられる。そこで、heparin sepharose を用いて CEE 中の Midkine を取り除き、その条件下でシスプラチン感受性を検討したが、やはり差は生じなかった。Heparin sepharose で除去される Midkine 以外の分子の寄与も考えられるので、この *in vitro*での sphere 細胞の機能解析については、実験系の検討を含めて今後の課題とする。

(2) Midkine の細胞内シグナル伝達解析

受容体を含めて、Midkine によって活性化される細胞内シグナルを明らかにするためには、解析のための実験系として、*in vitro*で Midkine に明確に応答する細胞株が必要である。その候補として、マウス線維芽細胞 (MEF) を検討した。その理由として、MEF の増殖が FBS に強く依存していることがあった。FBS を除いて starvation をかけた場合、ヒト神経芽腫細胞株は 24 時間経っても形態上の変化はほとんど見られないが、MEF は多数が浮いてくるなど、著しいダメージを受けた。これはつまり、MEF の培養は FBS 中に含まれる成長因子群に依存していることを示しており、Midkine にも鋭敏に反応する可能性があると考えて検討を行った。まず、serum starvation を 3 時間まで短縮したところ、形態上のダメージはほとんど生じないことを確認した。3 時間の starvation によって、FBS に含まれる種々の成長因子による細胞内シグナルは一旦キャンセルできていると考え、この条件下で recombinant Midkine の添加実験を行った。まず 10 μ g/ml で 5-60 分処理し、mTOR 経路の下流因子として RPS6 のリン酸化をウェスタンブロッティングで検討した。その結果、5-30 分にかけて、一過的なリン酸化の亢進が認められた (図 1)。



図1 Midkineに対するMEFの応答(RPS6リン酸化のタイムコース)

次に、recombinant MK の添加量を検討したところ、0.4 μ g/ml でも明確な RPS6 の活性化が認められた (図 2)。5 分というタイムコースから考えると、この応答が Midkine の受容体を介した直下のシグナル伝達によるものと考えられる。

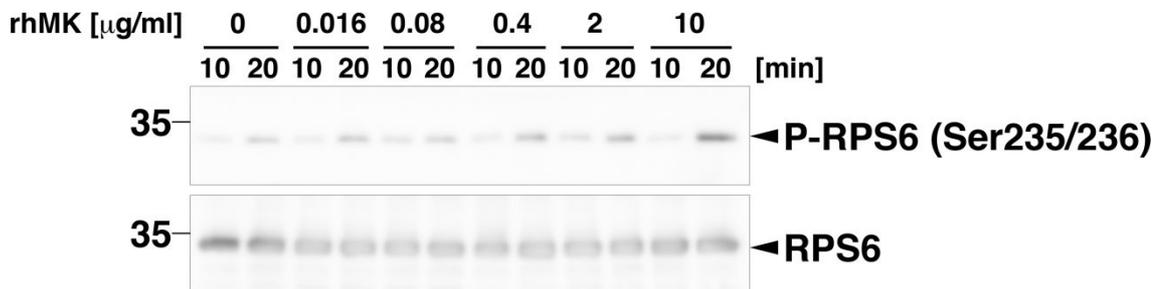


図2 一連のMidkine量に対するMEFの応答(RPS6リン酸化)

更に、別ソースの Midkine で更に確認する目的で、conditioned medium を準備した。ヒト

神経芽腫細胞株 SH-SY5Y は、moderate な量の内在性 Midkine を分泌しているが、この SH-SY5Y 細胞をベースとして、Midkine を強制発現した株と、ノックダウンした株をそれぞれ樹立し、その conditioned medium を MEF に添加した際の応答を検討した。その結果、ネガティブコントロールとして用いたノックダウン conditioned medium の添加によっても、RPR6 のリン酸化が誘導されてしまった。これは SH-SY5Y から分泌される Midkine 以外の因子によるものと考えられ、この実験系では Midkine による応答を検討することはできなかった。別ソースの Midkine としては、市販の recombinant 品を複数検討し、同じ応答を確認する必要がある。

今回、Midkine に対して線維芽細胞が鋭敏に応答することが明らかになった。この結果は、Midkine の細胞内シグナルを解析するプラットフォームを得たという点で、非常に意義があるものであるが、一方で、神経芽腫における Midkine のバイオロジーを考察する上での重要な示唆を含んでいる可能性がある。これまでの研究では、神経芽腫細胞が分泌した Midkine は、神経芽腫細胞自身が受け取る autocrine をイメージしてきた。実際、神経芽腫細胞株において、Midkine をノックダウンすると増殖が著しく阻害されることから、このメカニズムが一定程度 *in vivo* でも寄与していることが示唆される。一方で今回の結果は、神経芽腫細胞から分泌された Midkine の受け取り手として、線維芽細胞を含む間質細胞も視野に入れるべきだということを提起している。神経芽腫細胞が間質へと働きかけて自らに有利な微小環境を構築するためのシグナルを Midkine が担っている可能性が考えられ、治療標的候補分子として Midkine を捉えていく上で、今後の重要な検討課題になるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Su Z, Kishida S, Tsubota S, Sakamoto K, Cao D, Kiyonari S, Ohira M, Kamiyo T, Narita A, Xu Y, Takahashi Y, Kadomatsu K., Neurocan, an extracellular chondroitin sulfate proteoglycan, stimulates neuroblastoma cells to promote malignant phenotypes, *Oncotarget*, 査読有, 2017 Nov 15;8(63):106296-106310. doi: 10.18632/oncotarget.22435. eCollection 2017 Dec 5.
2. Mu P, Akashi T, Lu F, Kishida S, Kadomatsu K., A novel nuclear complex of DRR1, F-actin and COMMD1 involved in NF- κ B degradation and cell growth suppression in neuroblastoma, 査読有, *Oncogene*, 2017 Oct 12;36(41):5745-5756. doi: 10.1038/onc.2017.181. Epub 2017 Jun 12.
3. Tsubota S, Kishida S, Shimamura T, Ohira M, Yamashita S, Cao D, Kiyonari S, Ushijima T, Kadomatsu K., PRC2-Mediated Transcriptomic Alterations at the Embryonic Stage Govern Tumorigenesis and Clinical Outcome in MYCN-Driven Neuroblastoma, *Cancer Res*, 査読有, 2017 Oct 1;77(19):5259-5271. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3144. Epub 2017 Aug 14.
4. Ichihara-Tanaka K, Kadomatsu K, Kishida S., Temporally and Spatially Regulated Expression of the Linker Histone H1fx During Mouse Development, *J Histochem Cytochem*, 査読有, 2017 Sep;65(9):513-530. doi: 10.1369/0022155417723914. Epub 2017 Aug 2.

[学会発表] (計 3 件)

1. Satoshi Kishida, Neurocan, a chondroitin sulfate proteoglycan, is a crucial extracellular component in neuroblastoma tissues, which promotes malignant phenotypes (Advances in Neuroblastoma Research 2018), 2018 (May 12)
2. 岸田聡、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン NCAN は神経芽腫細胞の悪性を誘導する細胞外因子である、生命科学系学会合同年次大会、2017年12月7日
3. Satoshi Kishida, The involvement of Midkine, a growth factor exacerbating cisplatin-induced nephrotoxicity, in cisplatin resistance of neuroblastoma cells (Advances in Neuroblastoma Research 2016), 2016 (June 21)

[図書](計 0 件)

[産業財産権](計 0 件)

[その他](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：坂元 一真
ローマ字氏名：SAKAMOTO Kazuma
所属研究機関名：名古屋大学
部局名：医学系研究科
職名：助教
研究者番号(8桁): 60612801

(2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。