

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591262

研究課題名 (和文) ヒト神経芽腫における phox2b 高発現と増殖、分化への影響

研究課題名 (英文) Impact of sustained expression of phox2b gene on the differentiation of neuroblastoma

研究代表者

家原 知子 (IEHARA TOMOKO)

京都市立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：20285266

研究成果の概要：神経芽腫 (NB) の分化障害の原因として、phox2b、ASCL1 遺伝子の高発現維持とそれによる Delta-Notch 経路の恒常的な活性化の可能性を明らかにした。また、Notch 阻害剤の神経芽腫に対する新たな分子標的療法の可能性について明らかにした。本研究を進展させ、phox2b 高発現維持のメカニズム解明について検討を進めることにより、神経芽腫の分化障害、自然退縮のメカニズム、新たな分化誘導療法に対するアプローチを与えることが可能になると期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：神経芽腫、phox2b、ASCL1、Notch、 γ secretase

1. 研究開始当初の背景

- (1) ヒト神経芽腫(NB)は胎生期の神経冠細胞を母地とする腫瘍であるが、その発生の詳細なメカニズムについてはいまだ明らかとなっていない。また、多様な性質を持つ細胞集団からなり、その臨床経過も、予後良好群、自然退縮群、予後不良群など多様な経過をとることが知られている。NB の腫瘍化のメカニズムを知ることは、いまだ予後不良な進行 NB に対してより効果的な治療戦略の開発に役立つものと考えられる。
- (2) 神経芽腫発生のメカニズムと正常交感

神経系の分化の過程には密接なかかわりがあると考えられているが、交感神経細胞分化では、自己複製能と多分化能を有する組織特異的な細胞集団、つまり神経幹細胞が存在し、適切な条件下で種々の細胞に分化することが明らかとなっている。神経幹細胞は HMG-box factor である sox10 を発現しているが、適切な薬剤投与下に交感神経系に分化誘導させると、sox10 の発現抑制とともに phox2b、hASH1 が一過性の発現を示すことが明らかにされた(Kim J et al. Neuron 38: 17-31 2003)。また、家族性 NB の解析では、生殖細胞系に phox2b に変異が存在し、NB 発生と密接に関連している

可能性が示された(Bourdeaut F et al. Cancer letter 228: 51-58 2005)。さらに、我々は、免疫組織学化学、real time PCR法により、NB 細胞株において phox2b 高発現が維持されている知見を得た。つまり、NB の発生には、その母地となっている可能性のある神経幹細胞の分化段階で神経分化関連遺伝子に何らかの異常が生じ、腫瘍化している可能性が推察される。また、家族性 NB 症例の遺伝子解析やわれわれの得た知見より、異常遺伝子の候補として神経分化に密接に関わる転写因子である phox2b の変異が寄与していると考えられ、その機能を明らかにすることは NB の発生や分化を理解するために必要不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) NB において神経分化関連遺伝子である phox2b の発現とその機能を解析する。
- (2) Phox2b 遺伝子に関連する Delta-Notch 経路と神経芽腫分化の関連について検討する。

3. 研究の方法

- (1) NB 細胞株と臨床検体での phox2b 遺伝子、蛋白の発現解析。
- (2) All trans retinoic acid による分化誘導時の神経芽腫細胞の形態と phox2b、ASCL1 遺伝子の発現変化の検討。
- (3) phox2b 遺伝子の発現抑制（ノックダウン）による細胞の形態、増殖、分化への影響の検討。
- (4) Notch 阻害剤である γ secretase 添加による神経芽腫細胞の分化における影響と、phox2b、ASCL1 遺伝子の発現に対する影響の検討。

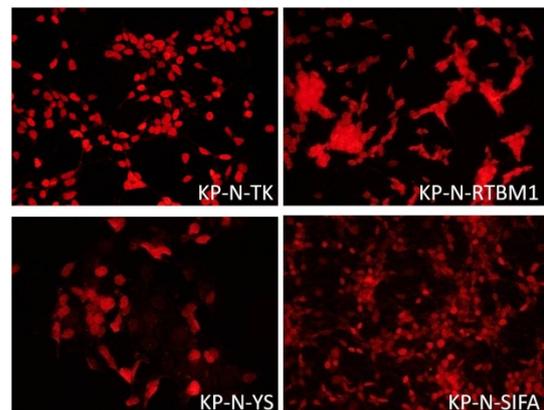
4. 研究成果

- (1) NB 細胞株と臨床検体での phox2b 遺伝子、蛋白の発現解析。

NB 細胞株を用いて、神経分化関連転写因子の発現について real-time PCR 法、免疫染色法で検討したところ、NB 細胞株 (N type cell) は本来神経分化の際に一過性に発現する、phox2b、ASCL1 遺伝子の高発現が維持されていること、一部の細胞では未分化神経肝細胞

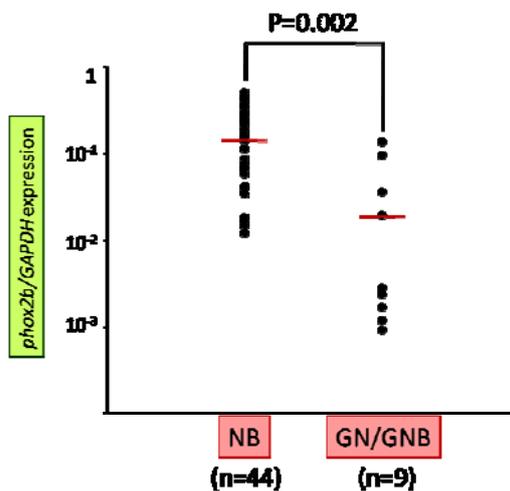
マーカーである SOX10 が高発現していることが確認できた (図 1)。

図 1 : phox2b 蛍光免疫染色



また、NB 腫瘍より抽出した mRNA を用いて phox2b 発現について現在検討を行っているが、Ganglioneuroma に対してより未分化な Neuroblastoma 細胞で phox2b 発現が高いという結果を得た (n=53, p=0.002, Welch's t-test) (図 2)。

図 2 : 神経芽腫臨床検体での phox2b 発現 (real-time PCR 法)

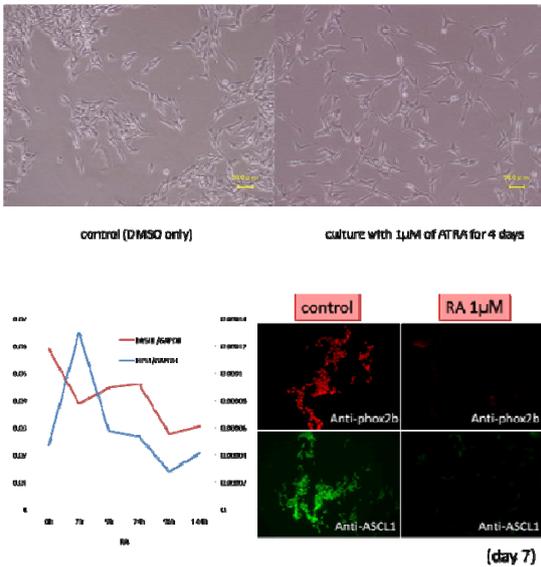


- (2) All trans retinoic acid による分化誘導時の神経芽腫細胞の形態と phox2b、ASCL1 遺伝子の発現変化の検討。

NB 細胞株にレチノイン酸 (ATRA) を投与し分化誘導を行ったところ、ATRA 投与開始 2 時間後より ASCL1 の、6 時間後ごろより

phox2b の著しい発現抑制が見られたのち、神経突起を延長させ分化が誘導された (図 3)。

図 3 : ATRA による神経芽腫細胞分化誘導と phox2b、ASCL1、HES1 遺伝子の変化



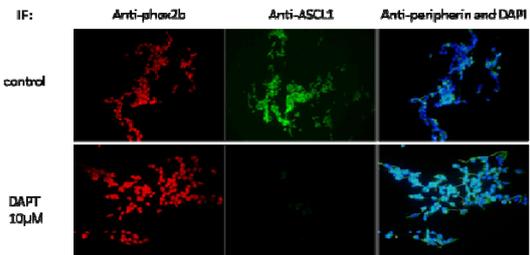
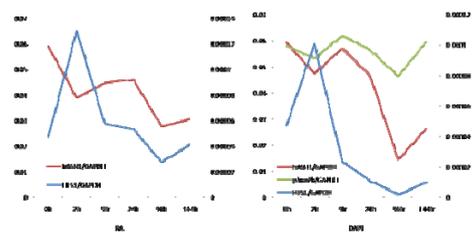
(3) phox2b 遺伝子の発現抑制 (ノックダウン) による細胞の形態、増殖、分化への影響の検討。

RNAi による発現抑制実験を行ったところ、phox2b 遺伝子の siRNA では、phox2b の knock down による分化誘導や、増殖抑制は見られなかった。

(4) Notch 阻害剤である γ secretase 添加による神経芽腫細胞の分化における影響と、phox2b、ASCL1 遺伝子の発現に対する影響の検討。

NB 細胞株に Notch 阻害剤を投与したところ、ASCL1 遺伝子の発現抑制と、神経突起の延長が見られたが、phox2b の発現抑制は見られなかった (図 4)。

図 6 : γ secretase 投与による神経芽腫細胞株の phox2b、ASCL1、HES1 遺伝子の発現変化と分化への影響。



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 7 件)

- ① Yagyu S, Iehara T, et al Circulating methylated-DCR2 gene in serum as an indicator of prognosis and therapeutic efficacy in patients with MYCN nonamplified neuroblastoma Clin Cancer Res 14 7011-7019 2008 (査読あり).
- ② Cohn SL, Iehara T et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System. J Clin Oncol. 27 289-297 2008 (査読あり)
- ③ Hiyama E, Iehara T et al. Effectiveness of screening for neuroblastoma at 6 months of age: a retrospective population-based cohort study. Lancet. 371(9619):1173-1180. 2008 (査読あり)
- ④ Osone S, Iehara T, et al Low-dose protracted irinotecan as a palliative chemotherapy for advanced neuroblastoma. J Pediatr Hematol Oncol. 30 853-856 2008 (査読あり)
- ⑤ Katsumi Y, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H et al. Trastuzumab Activates Allogeneic or Autologous Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Malignant Rhabdoid Tumor Cells and Interleukin-2 Augments the Cytotoxicity. Clin Cancer Res. 14 1192-1199 2008 (査読あり)
- ⑥ Kikuchi K, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H et al. Effects of PAX3-FKHR

on malignant phenotypes in alveolar rhabdomyosarcoma. Biochem Biophys Res Commun. 365 568-574. 2008 (査読あり)

- ⑦ Yagyu S, Iehara T, Hosoi H et al. Late appearance of a Philadelphia chromosome in a patient with therapy-related acute myeloid leukemia and high expression of EVI1. Cancer Genetics and Cytogenetics 180(2):115-20. 2008 (査読あり)

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① Shigeki Yagyu, Tomoko Iehara, Hajime Hosoi et al. Methylation Analysis of DCR2 gene Using Tumor and Serum DNA of Neuroblastoma Patients. 44th annual meeting of American Society of Clinical Oncology. 2008 年 5 月 ; Chicago.
- ② T Iehara, H Hosoi, et al. MYCN Amplified Neuroblastoma in Infants: From The Japanese Infantile Neuroblastoma Cooperative Study. Advances in Neuroblastoma Research 2008. 2008 年 5 月 ; Japan Chiba.
- ③ Shigeki Yagyu, Tomoko Iehara, Hajime Hosoi et al. Methylation Analysis of DCR2 gene Using Tumor and Serum DNA of Neuroblastoma Patients. Advances in Neuroblastoma Research 2008. 2008 年 5 月 ; Japan Chiba.
- ④ Shinichi Tamura, Tomoko Iehara, Hajime Hosoi et al. MYCN amplification contributes to dysfunction of the p53 pathway in neuroblastoma. Advances in Neuroblastoma Research 2008. 2008 年 5 月 ; Japan Chiba
- ⑤ Katsumi Y, Iehara T, Hajime Hosoi et al. PD 0332991 Inhibits Cell Proliferation And Induces G1Cell Cycle Arrest against Malignant Rhabdoid Tumor Cells Which Constitutively Express p16Ink4a at a Low Level. 40th International Society of Pediatric Oncology 2008 年 10 月 ; Berlin, German.
- ⑥ Shigeki Yagyu, Tomoko Iehara, Hajime Hosoi et al. EVALUATION OF PROGNOSIS AND EFFICACY OF THERAPY FOR NEUROBLASTOMA PATIENTS BY QUANTIFICATION OF METHYLATED DCR2 GENE

PROMOTER IN SERUM DNA. 40th International Society of Pediatric Oncology 2008 年 10 月 ; Berlin, German.

- ⑦ Ken Kikuchi, Tomoko Iehara, Hajime Hosoi. Detection of IGF2 and H19 imprinting abnormalities in rhabdomyosarcoma patients using tumor and serum DNA. 40th International Society of Pediatric Oncology 2008 年 10 月 ; Berlin, German
- ⑧ Tomoko Iehara, Hajime Hosoi et al. IS THE PROGNOSIS OF STAGE 4S NEUROBLASTOMA OF 12 MONTHS OLD AND OVER REALLY EXCELLENT? 40th International Society of Pediatric Oncology 2008 年 10 月 ; Berlin, German.
- ⑨ 柳生茂希, 家原知子 他神経芽腫患者の血清中遊離DNAを用いた 11 番染色体長腕欠失の検出 第 24 回日本小児がん学会学術集会 2008 年 11 月千葉、幕張
- ⑩ 杉本徹、家原知子、他過去 20 年間に樹立した神経芽腫細胞株の臨床・基礎研究への貢献。第 24 回日本小児がん学会学術集会 2008 年 11 月千葉、幕張
- ⑪ 松山琴音、家原知子、他小児がん治療ガイドラインおよび小児がん治療成績のインターネット配信実現に係る研究第 24 回日本小児がん学会学術集会 2008 年 11 月千葉、幕張

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家原 知子 (IEHARA TOMOKO)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：2085266

(2) 研究分担者

細井 創 (HOSOI HAJIME)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：20238744