

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861484

研究課題名(和文) 神経芽腫におけるアダプター蛋白質Shfの機能解析と治療への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of Shf in neuroblastoma

研究代表者

高木 大輔 (TAKAGI, Daisuke)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60611580

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)：我々はこれまでの研究において、予後良好な神経芽腫症例に高発現するアダプター蛋白質であるSrc homology 2 domain containing F (Shf) が、受容体型チロシンキナーゼであるanaplastic lymphoma kinase (ALK) と結合し、相互作用を示すことを発見した。またShfはPDGF受容体や神経成長因子NGF受容体TrkAと結合することも既に報告されている。今回の研究ではALK、PDGF受容体およびTrkAとの相互作用の解析を進めることでShfの機能をさらに詳細に解明しようと試みたが、残念ながら期間内に有意義な成果をあげることはできなかった。

研究成果の概要(英文)： We previously identified Src homology 2 domain containing F as one of the adaptor protein expressed at high levels in favorable neuroblastoma. We also found that Shf interacted with anaplastic lymphoma kinase (ALK), an oncogenic receptor tyrosine kinase in neuroblastoma. Shf was already known to interact with PDGF receptor and TrkA. In this work, we attempted to elucidate the additional function of Shf. However, we could not produce sufficient result in the term.

研究分野：小児外科学

キーワード：神経芽腫

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 神経芽腫について

神経芽腫は胎生期の神経堤由来の腫瘍であり、小児固形腫瘍の中では脳腫瘍に次いで頻度が高い。現代の集学的治療の進歩に関わらず、進行神経芽腫の治療成績は依然として極めて不良である。神経芽腫には、しばしば自然に退縮する予後の良いサブセットや、悪性度の強い予後不良なサブセットが存在し、臨床的に多彩な像を示すことから、その発症や進展には多彩な分子病態が存在すると考えられている。

### (2) Src homology 2 domain containing F (Shf) について

Shf は 4 個のリン酸化チロシン残基と 1 個の SH2 ドメインを持つアダプター蛋白質であり、Src homology 2 domain protein of beta-cells (Shb) と非常に高い相同性を示す。2000 年に発表された論文では、PDGF $\alpha$  受容体と結合してアポトーシスを抑制することが報告されたが、それ以外の性質や機能はほとんど知られていなかった。近年、千葉県がんセンター研究所における神経芽腫 cDNA プロジェクトにより、予後良好な神経芽腫に高発現する遺伝子の一つとして同定された。その後の研究において、神経成長因子 NGF 受容体 TrkA と結合し、NGF 依存的に神経分化を促進することが明らかとなった。

### (3) Anaplastic lymphoma kinase (ALK) について

ALK は受容体型チロシンキナーゼの一つである。その異常については、非 Hodgkin リンパ腫や非小細胞性肺癌などで複数の遺伝子との転座によるキメラ産物形成と活性化が報告されており、ALK チロシンキナーゼに対する特異的阻害剤を用いた治療も開始されている。2008 年に入り、複数の研究が

グループにより家族性および散発性神経芽腫における ALK の変異が報告された。多数の臨床サンプルの解析から、ALK 遺伝子異常は全症例の約 6~9%にみられること、特に増幅とキナーゼドメインの変異が神経芽腫の腫瘍悪性化に関与していることが示唆されている。他の疾患同様、神経芽腫においても ALK 阻害剤の研究が進められている。

### (4) これまでの研究成果

我々は他施設との共同研究において、神経芽腫臨床検体における mRNA レベルでの発現解析にて、Shf 低発現かつ ALK 高発現の群は、Shf 高発現かつ ALK 低発現の群と比較して、優位に予後不良であることを発見した。そこから両者の相互作用に着目し、Shf と ALK とが結合すること、ならびに細胞内で共局在することを見出した。さらに我々は Shf が ALK との結合を介して、神経芽腫における ALK 下流シグナルを抑制すること、すなわち細胞増殖能および遊走・浸潤能を低下させることを発見した。

## 2. 研究の目的

神経芽腫は小児期における代表的な悪性固形腫瘍の一つであるが、しばしば非常に治療抵抗性であり、現在も新たな治療薬の開発を求められている。我々は Shf が神経芽腫の発生・進展に関わり得る分子であると予想し、Shf との結合が証明されている ALK、Trk および PDGF 受容体との相互作用に注目して比較検討を行い、これらのシグナル伝達を解析することによって新たな知見を得られるものと考えた。本研究はこれまでの研究をさらに発展させ、Shf の機能をより詳細に解明することを目的とし、将来的な臨床応用を目指すための基盤となる研究である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 発現解析

定量的リアルタイム PCR 法を用いて、研究室に保存されている神経芽腫臨床検体および神経芽腫細胞株における Shf、ALK、TrkA および PDGF 受容体の mRNA レベルでの発現を解析する。

#### (2) 免疫沈降実験

Shf と ALK、TrkA および PDGF 受容体との結合の再現性を免疫沈降実験にて確認する。

#### (3) 細胞増殖実験

ヒト神経芽腫細胞株を用いて MTT assay を行い、Shf と ALK、TrkA および PDGF 受容体との相互作用が細胞増殖能に及ぼす変化を比較検討する。それぞれの蛋白質を過剰発現、あるいは siRNA を用いてそれらの発現を抑制した細胞を観察する。

#### (4) 細胞遊走・浸潤実験

ヒト神経芽腫細胞株を用い、Shf と ALK、TrkA および PDGF 受容体との相互作用が細胞遊走・浸潤能に及ぼす変化を比較検討する。それぞれの蛋白質を過剰発現、あるいは発現抑制した細胞を観察する。

#### (5) 細胞分化実験

神経芽腫はしばしば自然退縮・分化傾向を示すものが存在することが知られている。マウス褐色細胞腫細胞株を用い、Shf、ALK、TrkA および PDGF 受容体の過剰発現による分化能の変化を観察する。All-trans retinoic acid (ATRA) あるいは神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) を加えたときに起こる神経分化への影響も観察する。またヒト神経芽腫細胞株を用い、Shf と ALK、TrkA および PDGF 受容体との相互作用が細胞分化能に及ぼす変化を比較検討する。それぞれの蛋白質

を過剰発現、あるいは発現抑制した細胞を観察する。

#### (6) in vivo での機能解析

実験マウスを用いた in vivo での機能解析を行う。それぞれの蛋白質を過剰発現、あるいは発現抑制した神経芽腫細胞株をマウス皮下へ注入し、腫瘍サイズの変化を観察する。

### 4. 研究成果

初年度より必要な物品を購入し、また設備を整えながら実験を進めたが、実際に研究に従事できる時間が限られていたことや、細胞株の培養でエラーが続いたことなどが原因で、期間内に有意義な成果をあげることができなかった。

貴重な研究費を有益な成果に繋げられなかったことは誠に遺憾であるが、今回の経験を生かして実験を継続し、医学の発展に貢献できるよう努めていく所存である。

#### <参考文献>

Takagi D, et al. Novel adaptor protein Shf interacts with ALK receptor and negatively regulates its signals in neuroblastoma. *Cancer Science* 2013;104:563-62.

Lindholm CK, et al. Shf, a Shb-like adaptor protein, is involved in PDGF-a-receptor regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278:537-43.

古屋 武史, 他. 神経芽腫における Shf の機能的役割に関する研究. *日大医学雑誌* 2006;65;367-75.

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高木 大輔 ( TAKAGI, Daisuke )

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 60611580

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし