

平成 30 年 4 月 12 日現在

機関番号：87207

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09674

研究課題名(和文) Trim32を標的とした新たな神経芽腫分化誘導療法の開発

研究課題名(英文) Trim32-based new differentiation therapy for neuroblastoma

研究代表者

泉 秀樹 (IZUMI, Hideki)

地方独立行政法人佐賀県医療センター好生館(ライフサイエンス研究所)・ライフサイエンス研究所・部長

研究者番号：10397987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は新規分化誘導分子 Trim32 が神経芽腫細胞へ分化誘導効果を発揮する際の標的を明らかにして、新しい作用機序による神経芽腫の治療法の基礎を確立することを目的としている。Trim32 の過剰発現、あるいはこれに加えて13-cisを組み合わせて細胞分化の誘導を試み、Trim32と13-cisを併用処理した時の遺伝子発現をcDNA microarrayによって解析した結果、発現上昇した遺伝子としてCDKN1Aが同定された。CDKN1Aをノックダウンさせると、分化誘導能が低下し、さらにCDKN1Aの過剰発現に加えて13-cis処理を行うと、神経細胞への分化誘導能が増大することがわかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the molecular target of Trim32-based differentiation therapy for neuroblastoma cells and to establish a new treatment method of neuroblastoma by a novel mechanism. We attempted to identify new target gene(s) in Trim32-mediated cell differentiation by cDNA microarray. As a result of analysis by cDNA microarray, CDKN1A was identified as a gene whose expression increased in Trim32-mediated cell differentiation. When CDKN1A is knocked down in human neuroblastoma cells, 13-cis-retinoid (13-cis) mediated cell differentiation ability decreased. Furthermore, when 13-cis treatment is performed on human neuroblastoma cells after transfection of CDKN1A cDNA expression vector, the differentiation inducing ability significantly increased.

研究分野：小児科学

キーワード：分化誘導療法 神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、自然治癒や治療が著功するケースがある一方で、非常にアグレッシブなケースが存在し、その多くの場合、がん遺伝子 MYCN の増幅が見られる。また現在、広く使用されている抗がん剤の多くはがん細胞を殺すことにより、その治療効果を発揮する。しかし、その欠点として正常細胞にも作用するため深刻な副作用を引き起こすことがあげられる。そこで、ATRA のようなレチノイドによる分化誘導療法が行われているが、新たな異なる作用機構に基づいた治療法の開発が望まれている。我々は、最近、MYCN タンパク質の分解と神経細胞への分化を促進し、さらにスフェア環境下で神経芽腫幹細胞の増殖を抑える分子 Trim32 を発見した (文献①)。MYCN は転写因子として膨大な遺伝子の発現調節をしており、cDNA マイクロアレイの研究から、多数の遺伝子の発現を修飾していることが判明してきている。従って、MYCN を分解する Trim32 のような分化誘導剤は、BRM (Biological response modifier) および遺伝子発現修飾物質とも考えられ、神経芽腫細胞の細胞生物学的性質をも変化させる可能性がある。そこで、これまでに神経芽腫で有効とされているレチノイドに加えて、新たな分化誘導剤が神経芽腫細胞の増殖制御にも応用できるか否かを検討することは、今までとは異なる作用機構に基づいた神経芽腫治療法の開発につながる可能性がある。

私たちが新たに見出した分子 Trim32 は、おそらく神経芽腫のがん幹細胞に作用して、非対称分裂を誘導し、多くの分化した細胞を生み出すことが示唆された (文献①)。また現在、Trim32 は、神経芽腫の分化誘導剤として臨床的に用いられているレチノイドと同様に強い分化誘導活性を示すことがわかってきた。興味深いことにレチノイドは、Trim32 遺伝子の発現を誘導しないが、Trim32 分子は、レチノイドによる分化誘導を増強する作

用があることが白血病で知られている。このことから、Trim32 をレチノイドと併用することにより、有効な分化誘導剤となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は新規分化誘導分子 Trim32 が神経芽腫細胞への増殖抑制および分化誘導効果を発揮する際の分子的基盤ならびに分子標的を明らかにして、新しい作用機序による神経芽腫の治療法を確立することを目的とする。具体的には、本研究では Trim32 とレチノイドとの併用による神経芽腫細胞の増殖抑制と分化誘導の分子メカニズムを解明し、さらに、これらの処理の最も重要な分子標的を明らかにし、新しい分子標的治療法の基礎を築く。

3. 研究の方法

Trim32 を過剰発現させると MYCN が著名に分解され、非対称分裂が起こり、さらに、神経突起を伸ばす分化した細胞が出現することを見いだしている。そこで、Trim32 の過剰発現により、神経細胞に分化する割合を解析し、加えて 13-cis retinoid (13-cis) をそれぞれ併用した場合にも、神経細胞に分化する割合を検討する。

Trim32 と 13-cis を併用処理した時の遺伝子発現を cDNA microarray によって解析し、発現が上昇するもの、低下するものを、上位 3 遺伝子群を抽出し、これらの遺伝子発現と増殖抑制および分化誘導との関連性を siRNA による発現阻害や、逆に過剰発現の実験を行い、併用処理による増殖抑制および分化誘導に関連しているか否かを検討する。

4. 研究成果

これまでの研究から、もつともがん幹細胞様の性質を示す SK-N-DZ 細胞を用いて、Trim32

の過剰発現、あるいはこれに加えて神経芽腫の治療薬である13-cisを組み合わせて処理し、細胞分化の誘導を試みた。その結果、形態的に神経突起 (neurite) を伸ばす細胞の割合が、13-cis単独処理では、36.3%、Trim32の過剰発現単独では35.6%だったのに対して、Trim32の過剰発現と13-cisを組み合わせた処理では、83.3%に増大することがわかった。

SK-N-DZ細胞はがん幹細胞様の性質を示し、がん幹細胞マーカーであるCD133と神経幹細胞マーカーのひとつであるnestinを発現している。そこでこれらの幹細胞マーカーの発現と13-cis処理、さらにTrim32の過剰発現による影響を調べた。その結果、13-cis処理単独では、CD133, nestinとも発現の変化はあまり見られなかった。次にTrim32を過剰発現させるとCD133, nestinとも発現が劇的に低下し、さらに13-cis処理も加えると有意に上記の幹細胞マーカーの発現低下が見られた。

我々は以前、ヒト神経芽腫の培養細胞を用いてTrim32を過剰に発現するように操作したところ、神経芽腫細胞の非対称分裂が誘導されることを報告したので、同様の方法でCD133, nestinとTrim32が細胞分裂の際、非対称に分布するかどうかを調べたところ、割合的には低い(約10%)が、CD133, nestinとTrim32に基づいた非対称分裂が観察されることを見出した。このことは、CD133, nestinが発現しているがん幹細胞から、非対称分裂により、CD133, nestinの発現のないがん細胞が生まれることを示す直接的な証拠となると考えられた。

Trim32の過剰発現、あるいはこれに加えて13-cisを組み合わせて細胞分化の誘導を試み、Trim32と13-cisを併用処理した時の遺伝子発現をcDNA microarrayによって解析し、発現が上昇する遺伝子群と低下する遺伝子

群を抽出し、これらの遺伝子発現と増殖抑制および分化誘導との関連性をsiRNAによる発現阻害等を行い、薬剤併用処理による増殖抑制および分化誘導に関連しているか否かを検討した。薬剤処理により、発現上昇した遺伝子として、ABCB1、ADD3、ARHGEF3、CDKN1Aが同定され、一方発現が低下した遺伝子として、IGFB P5、KCTD12、ASCL1が同定された。引き続き、発現上昇した遺伝子については、ノックダウン実験を行い、逆に発現が低下した遺伝子については、過剰発現実験を行った。その結果、これらの遺伝子のうち、CDKN1Aをノックダウンさせると、13-cisによる分化誘導能が有意に低下することがわかった。

そこで神経芽腫細胞に、CDKN1AのcDNA発現ベクターを導入後、13-cis処理を行うと、神経への分化誘導能が劇的に増大することがわかった。

<文献①>

Izumi H and Kaneko Y.

Trim32 facilitates degradation of MYCN on spindle poles and induces asymmetric cell division in human neuroblastoma cells.

Cancer Res. 74:5620-5630 (2014).

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 Nakagawara A, Li Y, Izumi H, Muramori K, Inada H, Nishi M. Neuroblastoma. Jpn. J. Clin. Oncol. 48:214-241 (2018). DOI:10.1093/jjco/hyx176

[学会発表] (計 5件)

- ① 泉 秀樹、中川原 章、金子安比古
ヒト神経芽腫培養細胞をモデルとしたがん幹細胞の非対称分裂機構のメカニズムの解明

第 26 回日本サイトメトリー学会学術
集会 2016 年 7 月. 福岡.

② 泉 秀樹

ヒト神経芽腫培養細胞をモデルとした
がん幹細胞の非対称分裂機構のメカニ
ズムの解明

日本放射線影響学会第 59 回大会
2016 年 10 月. 広島.

③ 泉 秀樹、中川原 章、金子安比古

ヒト神経芽腫細胞における非対称分
裂の誘導とレチノイド併用による悪
性度低下機構の解析

第 23 回神経芽腫研究会
2016 年 10 月. 佐賀.

④ 泉 秀樹、中川原 章、金子安比古

がん幹細胞の治療を目指したヒト神
経芽腫細胞における非対称分裂機構
の解明

第 58 回日本小児血液・がん学会学術
集会
2016 年 12 月. 東京.

⑤ 泉 秀樹. ヒトがん細胞の新しい分化誘

導療法を目指した非対称分裂機構の
解析. 第 24 回好生館医学会総会.
2015. 12 月. 佐賀.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者 泉 秀樹 (IZUMI, Hideki)
佐賀県医療センター好生館・ライフサイエ
ンス研究所・部長
研究者番号：10397987

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし
()