

平成 30 年 5 月 29 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：15K10933

研究課題名(和文) PPP3CBによる神経芽腫進展の分子機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Functional role of PPP3CB in neuroblastoma and potential anti-tumor effect of calcineurin inhibitor on neuroblastoma

研究代表者

李 元元 (LI, YUANYUAN)

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・研究員

研究者番号：00392259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脱リン酸化酵素カルシニューリンの触媒サブユニットであるPPP3CBによる神経芽腫進展の分子機構とその阻害剤の抗腫瘍効果を検討した。その結果、PPP3CBは活性化 T 細胞核因子(NFAT)、AktおよびMAPK経路を活性化することによって、神経芽腫の増殖を促進することと、カルシニューリン阻害剤がPPP3CBの発現と活性を抑えることによってNFAT標的遺伝子の発現を抑制し、細胞死を引き起こすことを明らかにした。これらの研究成果はPPP3CBが神経芽腫の進展に寄与することを示し、さらに、カルシニューリンの活性阻害が高リスク神経芽腫の有効な治療法の一つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：PPP3CB is the catalytic subunit of calcineurin, a calcium-dependent serine/threonine phosphatase. In this study we found that overexpression of wildtype PPP3CB or constitutively active PPP3CB mutant (PPP3CBmut) identified from a neuroblastoma (NB) tumor promoted cell growth in NB cells. PPP3CB and PPP3CBmut activated nuclear factor of activated T-cells (NFAT)2/NFAT4 transcription factors, Akt and MAPK signaling, resulting in the increase in the expressions of c-Myc, MYCN and  $\beta$ -catenin. Treatment with calcineurin inhibitors (Cals) suppressed cell proliferation and induced apoptotic cell death in several NB cell lines. Expression of PPP3CB along with those of c-Myc, MYCN and  $\beta$ -catenin was decreased in response to Cals. Our findings demonstrate that PPP3CB contributes to the aggressive behavior of NB tumors and Cals have a strong anti-tumor activity in vitro by targeting PPP3CB, suggesting that inhibition of calcineurin activity might have therapeutic potential for high-risk NBs.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：神経芽腫 PPP3CB calcineurin inhibitor

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 小児固形悪性腫瘍である神経芽腫の患者は臨床病期、年齢、腫瘍細胞内の MYCN 遺伝子のコピー数、国際病理分類、腫瘍細胞内の染色体の数の5つの予後因子を用いて低リスク群、中間リスク群と高リスク群に分類され、その予後も異なる。近年、治療法が改善されつつあるが、高リスク群は依然として予後不良であり、有効な治療法の確立が切望されている。

(2) 我々は、次世代シーケンサーを用いて、神経芽腫の予後に関わる遺伝子の探索を行った。原発性神経芽腫56例について全エクソームを解析した結果、プロテインホスファターゼ3CB 遺伝子 (PPP3CB) のC末端にはストップ獲得型突然変異が同定された。興味深いことに、この突然変異はC末端の自己阻害ドメインの前に現れるため、これにより翻訳されたタンパク産物は恒常的活性型となる。PPP3CB はカルシウム依存的な脱リン酸化酵素カルシニューリンの触媒サブユニットであり、カルシウムの存在下で転写因子の Nuclear Factor of Activated T Cell (NFAT) ファミリーを脱リン酸化することにより活性化させ、その核内移行を促進する。カルシウム/カルシニューリン/NFAT シグナルは腫瘍の進行において重要な役割を果たしている。この経路が異常活性化状態になると、NFAT は核内に移行・蓄積し、その標的遺伝子 c-Myc、COX2 と VEGF の発現を上昇させることにより、腫瘍増殖・浸潤および新生血管形成を促進する。さらに、我々は72例の神経芽腫における PPP3C ファミリーメンバー (PPP3CA、PPP3CB と PPP3CC) の発現を調べたところ、PPP3CA と PPP3CC の発現は神経芽腫の予後との相関関係が見られないが、PPP3CB の高発現は神経芽腫の予後不良と有意に相関することを明らかにした。そして、他の予後因子との相関関係を検討した結果、

PPP3CB は発症年齢、臨床病期、MYCN 増幅など今まで確立した予後因子との相関関係が認められず、新規の独立した予後不良因子であることが判明した。これらの研究結果から、PPP3CB が MYCN 遺伝子の増幅に依存せず、高リスク神経芽腫の進展に寄与することが強く示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は、神経芽腫の進展における PPP3CB の役割とその分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、カルシニューリン阻害剤による PPP3CB シグナリングへの抑制とその抗腫瘍効果を検討することによって、高リスク群神経芽腫に対する有効な治療法の確立に新しい知見を提供することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) PPP3CB 変異体の発現ベクターの作製

野生型 PPP3CB を鋳型として、神経芽腫臨床検体から同定した恒常的活性変異体をクローニングし、その発現ベクターを作製した。その発現効果をウェスタンブロット法にて確認した。

### (2) 細胞増殖・生存・細胞死解析

野生型と変異型 PPP3CB の過剰発現、逆に siRNA による発現阻害が神経芽腫の細胞増殖に与える影響を細胞増殖曲線解析にて検討した。また、カルシニューリン阻害剤による細胞増殖抑制効果と細胞死誘導効果を MTT アッセイ、トリパンプルー色素排除試験法とフローサイトメトリー法にて検討した。

### (3) 軟寒天コロニー形成アッセイ

神経芽腫細胞株 SK-N-AS に野生型と変異型 PPP3CB を導入し、安定発現細胞株を樹立した。これを用いて軟寒天コロニー形成アッセイを行い、PPP3CB とその変異体の腫瘍形成能へ

の影響を評価した。

#### (4) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

MYCN と  $\beta$ -Catenin 遺伝子のプロモーター領域に存在する潜在的な転写因子 NFAT の結合モチーフを検索した。予測された NFAT 結合モチーフを含むプロモーター領域をそれぞれクローニングし、ルシフェラーゼレポーターベクターを作製した。これらのレポーターベクターを用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、NFAT 活性化による MYCN と  $\beta$ -Catenin 遺伝子への転写制御を調べた。

#### (5) mRNA・タンパク質発現解析

PPP3CB とその変異体およびカルシニューリン阻害剤処理が NFAT 標的遺伝子発現に与える影響を定量的リアルタイム PCR 法にて解析した。また、PPP3CB とその変異体による NFAT 転写因子の活性化、Akt 経路・MAPK 経路の活性化および NFAT 標的遺伝子の発現制御をウェスタンブロット法にてタンパク質レベルで解析した。

### 4. 研究成果

我々は以前、PPP3CB が神経芽腫の独立した予後不良因子であることを明らかにした。さらに、神経芽腫腫瘍検体に PPP3CB 遺伝子の恒常的活性型変異を同定した。そこで、神経芽腫における PPP3CB とその恒常的活性変異体 (PPP3CBmut) の作用機序を調べた。その結果、PPP3CB と PPP3CBmut の過剰発現は MYCN 増幅の有無にかかわらず神経芽腫細胞株の細胞増殖を促進し、逆に、siRNA による PPP3CB の発現阻害は神経芽腫の細胞増殖を抑えることが判明した。さらに、軟寒天コロニー形成アッセイにより、PPP3CB 活性変異体の過剰発現は神経芽腫細胞の足場非依存性増殖を著しく促進することを見出した。次いで、カルシニューリンの標的である NFAT ファミ

リの活性化状態とその核内蓄積を調べたところ、PPP3CB と PPP3CBmut の過剰発現は、NFAT ファミリーメンバーの NFAT2 と NFAT4 の脱リン酸化を促進し、その核内移行が上昇することが観察された。さらに、PPP3CB と PPP3CBmut の過剰発現ががんの増殖と生存に重要なシグナル伝達因子 Akt と Erk の活性化リン酸化を促進することがわかった。これらの研究結果から、PPP3CB が NFAT、Akt 経路および MAPK 経路を活性化することによって、神経芽腫の増殖を促進すると考えられた。

一方、PPP3CB と PPP3CBmut を過剰発現させると、転写因子 NFAT の標的遺伝子 c-Myc のみならず、MYCN と  $\beta$ -Catenin の発現上昇も見られ、NFAT の新規標的遺伝子である可能性が示唆された。我々は、MYCN と  $\beta$ -Catenin 遺伝子のプロモーター領域において潜在的な NFAT 結合モチーフを見出した。そして、ルシフェラーゼレポーターアッセイにて検証したところ、イオノマイシン処理で内在性の NFAT を活性化させると、既知の NFAT 標的 c-Myc と同様に、MYCN と  $\beta$ -Catenin プロモーター領域の転写活性が上昇した。また、NFAT2 を過剰発現させると、その転写活性がさらに上昇した。また、恒常的活性変異体 PPP3CB を過剰発現させる場合、三つの遺伝子ともそのプロモーター転写活性が上昇することがわかった。これらの結果は MYCN と  $\beta$ -Catenin が NFAT の標的遺伝子であることを示した。

PPP3CB はカルシニューリンの触媒サブユニットであるため、カルシニューリン阻害剤による PPP3CB シグナリングへの抑制とその神経芽腫への抗腫瘍効果を検討した。その結果、臨床的に用いられているカルシニューリン阻害剤 Cyclosporin A と FK506 は共に神経芽腫細胞株に対して時間および濃度依存性に細胞増殖を抑え、プログラム細胞死を引き起こすことが判明した。さらに、二種類の阻

害剤処理は、NFAT2とNFAT4の活性化を抑え、PPP3CBの発現はタンパク質レベルで、NFATの標的遺伝子c-Myc、MYCNとβ-Cateninの発現はmRNAレベルとタンパク質レベルの両方で低下することがわかった。これらの研究結果はカルシニューリン阻害剤がPPP3CBの発現と活性を抑えることによってNFATの標的遺伝子の発現を抑制し、神経芽腫に対して抗腫瘍効果を発揮することを示し、PPP3CBを含むカルシニューリンの活性阻害が高リスク神経芽腫の有効な治療法の一つとなる可能性が示唆された。

#### 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)

1. 李元元、木下儀晶、中川原章、Familial neuroblastoma(家族性神経芽腫)日本臨牀(増刊号)、査読無、73(1083)、2015、pp 108-114、

[http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z\\_mokuji/7308kazoku.html](http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7308kazoku.html)

2. Li Y, Ohira M, Zhou Y, Xiong T, Luo W, Yang C, Li X, Gao Z, Zhou R, Nakamura Y, Kamijo T, Kaneko Y, Taketani T, Ueyama J, Tajiri T, Zhang H, Wang J, Yang H, Yin Y, Nakagawara A. Genomic analysis-integrated whole-exome sequencing of neuroblastomas identifies genetic mutations in axon guidance pathway. Oncotarget, 査読有、2017,8(34):56684-56697  
doi: 10.18632/oncotarget.18079.

3. Nakagawara A, Li Y, Izumi H, Muramori K, Inada H, Nishi M. Neuroblastoma. Jpn J Clin Oncol. 査読有、2018, 48: 214-241  
doi: 10.1093/jjco/hyx176.

[学会発表](計 2 件)

1. Yuanyuan Li, Irina Shakhova, Miki Ohira, Yohko Nakamura, Svetlana R. Varfolomeeva, Alexander G. Rumyantsev and Akira Nakagawara. PPP3CB is a novel prognostic indicator of high-risk neuroblastoma contributing to aggressive behaviors. Advances in Neuroblastoma Research (ANR) 2016.

2. Yuanyuan Li and Akira Nakagawara. Genomic Analysis-Integrated Whole-exome Sequencing of Neuroblastomas. The 3rd China International Forum of Pediatric Development. 2017.

[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

李 元元 (Li, Yuanyuan)

佐賀県医療センター好生館・ライフサイ  
ンス研究所・研究員

研究者番号：00392259

### (2) 研究分担者

中川原 章 (Nakagawara, Akira)

佐賀県医療センター好生館・理事長

研究者番号：50117181

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )