

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15079

研究課題名(和文) 発がん初期捕捉に基づく「正常発達逸脱によるがん発生機構」解明

研究課題名(英文) Mechanisms of carcinogenesis through deviation from normal development

研究代表者

門松 健治 (Kadomatsu, Kenji)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80204519

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)：小児がんでは、何故、遺伝子変異がないのにがんになるのか？エピジェネティック制御が予想されるが、その実態は未知である。この課題に迫るために、私たちはがん発生初期を捉える新しい技術開発を行った。すなわち、がん発生極初期の細胞のスフェア培養に成功したこれにより、神経芽腫モデル(TH-MYCINマウス)では、がん化が組織学的に明らかでない胎児期中期に、がん形質の獲得が起こることを見出した。この手法と神経芽腫モデルを組み合わせることにより、エピジェネティック制御が、がん形成に重要であること、EZH2が治療のための優れた分子標的となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Why does tumor develop without driver gene mutations in pediatric cancers? Its reason remains elusive although it is speculated that epigenetic regulations are involved. To address this question, we developed a new method, i.e., tumor sphere culture from very early stages of carcinogenesis. We found that cancer has developed as early as in mid-gestation period in the neuroblastoma model TH-MYCIN mice. Furthermore, we found that epigenetic regulations are indeed critical for neuroblastoma development, and that EZH2 is a molecular target for its treatment.

研究分野：がん生物学

キーワード：癌 発生 分化

1. 研究開始当初の背景

小児がんの遺伝子変異は極端に少ない。例えば、神経芽腫の約7割は遺伝子変異を持たない。つまり大人のがんで複数のドライバー遺伝子変異ががん発生・進展に寄与するというスキームは、小児がんの多くには通用しない。従って「正常発達逸脱によるがん発生」のコンセプトが受け入れられてきたが、そのエビデンスは乏しい。わずかに髄芽腫などで一部解明への取り組みが始まったに過ぎない。

私たちはこれまでにヒト神経芽腫をよく反映する神経芽腫モデルマウス (TH-MYCN) を用いて、このモデルが生後2週で早期がんとも言える組織像を示すことなどを示した。さらに本研究の予備的データとして、次世代シーケンサーにより、このマウスががん組織でも遺伝子変異が殆どないことを見出した。従ってこのマウスモデルは本研究課題を解くのに有用であることが判明した。そして、「正常発達逸脱によるがん発生」の本質に迫るための重要な技術開発に私たちは成功した。すなわち、「がん発生極初期を捉えること」を可能にするスフェア培養技術である。

2. 研究の目的

小児がんでは、何故、遺伝子変異がないのにがんになるのか? エピジェネティック制御が予想されるが、その実態は未知である。この課題に迫るために、私たちが開発したがん発生初期を捉える新しい技術開発スフェア培養を用いて、TH-MYCN マウスを神経芽腫モデルとして、小児がんの発生機構を解くことが本研究の目的である。がん発生に重要な遺伝子群を同定し、エピジェネティック制御を解明し、新しいがん発生機構を明らかにする。そのために2つの異なるアプローチを交差させる。その解明は小児がんの治療への新しい道を開くだけでなく、発生学に新しい視点を与える可能性がある。

3. 研究の方法

がん発生初期を捉えるスフェア培養を核に、エピゲノム、遺伝子発現等のデータから、がん発生初期に特徴的な遺伝子の抽出を行うことを1つ目の柱にする。この遺伝子群にはがん発生そのものに重要な遺伝子が含まれるはずである。そこで、2つ目の柱に神経芽腫発生に重要であることが既に知られている MYCN 増幅 との合成致死遺伝子同定を置く。2つの柱を交差させ「正常発達逸脱によるがん発生」を解く。具体的に次を行う。

(1) スフェア培養法と神経芽腫モデルマウスを用いて、DNA メチル化、ヒストン修飾、mRNA/lncRNA 発現、miRNA 発現のデータを取得する。ヒト神経芽腫データと合わせ、インフォマティクスによる遺伝子の抽出を行う。

(2) shRNA ライブラリーを用いた MYCN

増幅 との合成致死遺伝子の同定を完結させる。

(3) 上2つの成果を基に候補分子群をさらに絞り込み、in vitro と in vivo でがん発生を検証する。

4. 研究成果

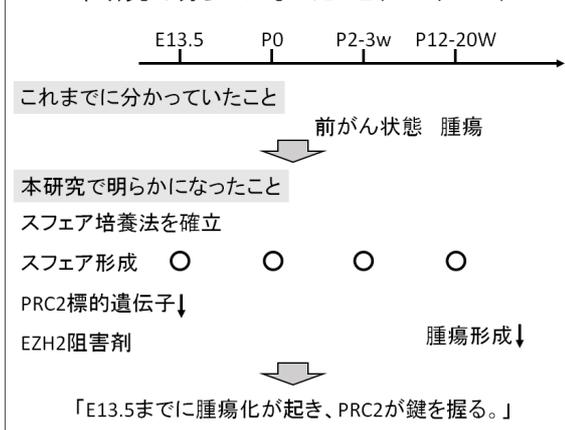
得られた成果をまとめると次の2つになる。

(1) 用いた神経芽腫モデルによりエピジェネティック制御ががん形成に重要であること、EZH2 が治療のための優れた分子標的となることを明らかにした。(2) MYCN 増幅 との合成致死遺伝子のスクリーニングに成功し、複数の候補分子を得た。そのうち、キナーゼ X の介入実験を行い、合成致死性を証明した。

(1) エピジェネティック制御：マウス神経芽腫腫瘍スフェア培養法は、神経堤細胞培養法を改良した(神経堤細胞は神経芽腫のオリジンと思われる細胞)。レチノイン酸を含まない培地を用いることで、生後2~3週のマウスの腹腔交感節から分化誘導を起こすことなくがん細胞の濃縮、継代ができた(図1「スフェア形成」)。交感節に移動した交感神経系神経芽細胞のマーカーである Phox2b で染色するとスフェア細胞のほぼ100%が神経芽細胞であることが分かった。

そこで生後3週の野生型および TH-MYCN マウスの交感神経節スフェアおよび TH-MYCN マウス由来の腫瘍から作ったスフェアについて遺伝子発現アレイを用いた解析を行った。発現パターンからこれら3群は明確に区別されることが分かった。さらに生後3週野生型マウス交感神経節スフェア 生後3週 TH-MYCN マウス交感神経節スフェア 腫瘍スフェアと、発現パターンが遷移していく様子が見て取れた。

図1 本研究で明らかになったこと(エピゲノム)



次に発がんがいつ起きるかという問に挑んだ。まず、MYCN 発現を qPCR で捕らえようとしたが胎生期では検出限界以下であった。そこで、小数の発現細胞でも検出できるように in situ hybridization を用いた。す

ると MYCN 発現は胎生期 13.5 日 (E13.5) の腹腔交感神経節まで遡れることがわかった。腹腔交感神経節解剖学的に同定するのは、技術的に E13.5 までが限界であるので、E13.5 腹腔交感神経節を用いてスフェア培養を試した。すると、初代培養は野生型マウスからも TH-MYCN マウスからも成功した。ところが、継代できるのは TH-MYCN マウス腹腔交感神経節細胞のみであった(図 1「スフェア形成」)。同様に、このスフェア培養法によると生直後および腫瘍からもスフェア培養に成功した。

驚いたことに、E13.5 TH-MYCN マウス腹腔交感神経節のスフェアをマウス皮下に移植すると腫瘍形成が起きた。これは腫瘍から樹立したスフェアと比較すると形成速度は遅いものの、できた腫瘍は区別がつかないものであった。以上から、TH-MYCN マウスでは遅くとも E13.5 の腹腔交感神経細胞から継代可能なスフェアを培養でき、そのスフェア細胞には腫瘍形成能があることが明らかになった。これはすなわち、TH-MYCN マウスでは E13.5 で腫瘍細胞が誕生していることを強く示唆するものであった。

そこで、野生型および TH-MYCN マウスの E13.5 交感神経節スフェアについて遺伝子発現アレイを用いた解析を行った。その結果、特徴的な機能を持つ遺伝子群が有意な変化を示した。それらには MYCN 下流遺伝子群をはじめ、Lin28b, Lmo1, Lmo3, Bdnf, Bmi1, Mybl2, Ssrp1, Supt16, Neurod1 などこれまでに神経芽腫発生進展との関係が報告された遺伝子群が発現上昇していた。同様に Ngfr, Clu, Ntrk3 など神経芽腫増殖と逆相関が報告されていた遺伝子群の発現抑制も確認された。

中でも殊に注目に値すると思われたのが、ポリコム抑制複合体 2 (PRC2) の標的遺伝子群の変化であった。すなわち、PRC2 標的遺伝子群、EED (PRC2 の構成分子) 標的遺伝子群、SUZ12 (PRC2 の構成分子) 標的遺伝子群のすべてが有意に発現抑制を受けていた。加えて、PRC2 が機能した結果起こる H3K27Me3 (ヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化) が有意に上昇し、実際に PRC2 標的遺伝子プロモーター領域の H3K27Me3 上昇を示した。

一方、E13.5 交感神経節スフェアや TH-MYCN マウス腫瘍などを材料にゲノム変化をアレイ CGH、エクソームシーケンスで解析したところ、ゲノムレベルの異常はほとんど見られず、この結果はヒト神経芽腫のデータと合致した。染色体異常ならびに遺伝子変異はなく、さらに DNA メチル化異常も見出されないことから、PRC2 による遺伝子発現制御の寄与が浮かび上がった。

MYCN の代わりに PRC2 の阻害による治療の可能性が出てきたので、PRC2 の責任分子である EZH2 の抑制を試みた。EZH2 ノックダウンは TH-MYCN マウス腹腔交感神経

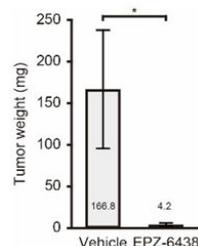
節由来スフェアの形成を著しく阻害した。さらに、その阻害剤である EPZ6438 は TH-MYCN マウスの腫瘍形成をほぼ完全に抑制した(図 2、上)。加えて、PRC2 標的分子群の発現は患者予後と逆相関を示した(図 2、下)。これらのデータを支持するように、PRC2 標的分子群の発現は MYCN 増幅症例で低く、ハイリスク患者群で低く、ステージ 4 で低かった。

もう一つ注目すべきは、ヒト神経芽腫でも、MYC 標的遺伝子群の発現と PRC2 標的遺伝子群発現の間に極めて強い逆相関があった。もちろん、両者共にあり、両者とも優れた予後因子であった。前述の通り、E13.5 TH-MYCN マウスの腹腔交感神経節由来スフェアは野生型マウススフェアに比べて MYC 標的遺伝子群の発現が上昇していた。以上のデータは、MYC と PRC2 に重要な機能的相関があることが示唆していた。そこで MYCN を E13.5 野生型マウスの腹腔交感神経節からの初代培養スフェアにウイルスベクターを用いて強制発現してみた。するとスフェアは継代可能なものにトランスフォームすることが分かった。しかもこのとき、EZH2 の発現が上昇した。さらに、N-Myc と EZH2 は複合体を形成することがわかった。これらの結果から、TH-MYCN マウスでは MYCN の発現により、N-Myc と EZH2 は複合体を形成し、その結果 PRC2 が特定の遺伝子プロモーター領域にリクルートされ局所的な H3K27Me3 上昇を引き起こすという機構が示唆された。

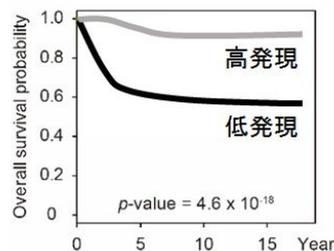
以上から、TH-MYCN マウスでは、遅くとも E13.5 から腫瘍形成が始まり、その際に PRC2 によるエピゲノム制御が重要な働きを担うことが明らかになった。治療実験の結果から、PRC2 の構成分子である EZH2 は神経芽腫治療のための重要な標的分子であることが判明した。

図 2

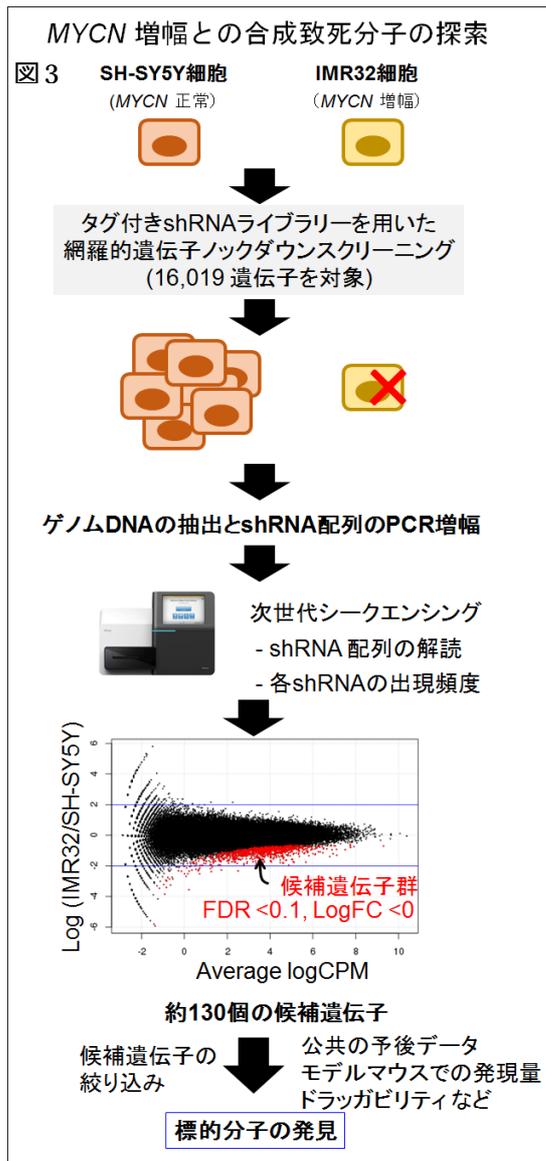
EZH2阻害剤の腫瘍抑制効果



PRC2標的分子発現と予後との強い逆相関

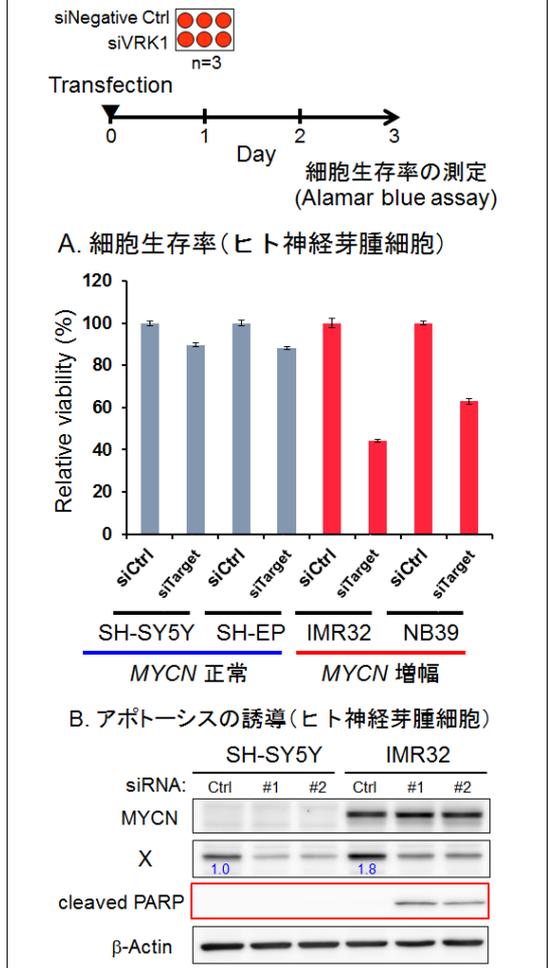


(2) 合成致死：神経芽腫発生に重要であることが既に知られている MYCN との合成致死遺伝子同定に臨んだ。タグ付きの shRNA ライブラリー(16,019 遺伝子を標的) を MYCN 増幅 (IMR32 細胞) および正常細胞 (SH-SY5Y 細胞) に感染させ、細胞増殖の程度に差がある遺伝子を、次世代シーケンサーを用いて探索した (図 3)。



その結果、約 130 個の遺伝子が候補として浮かび上がった。候補遺伝子から 公共の予後データ モデルマウスでの発現量 ドラッグピリティなどを指標にさらなる絞り込みを行った。MYCN 増幅 (IMR32 細胞など数種) および正常細胞 (SH-SY5Y 細胞など数種) の細胞株に対して候補遺伝子のノックダウンを施し、MYCN との合成致死について評価した (図 4)。その結果、セリンスレオニンキナーゼ X が候補分子標的として有力であることが判明した。X は肺がんなど MYC 遺伝子 (c-MYC) が増幅するがんについて同様の合成致死を示す可能性も出てきた。

図 4 標的分子KDはMYCN 増幅との合成致死を誘導する



候補分子 X については今後阻害剤開発を進めていくと同時に、個体レベルでの治療効果を示すことで治療応用への可能性を追求していきたい。

(3) がん発生初期機構と MYCN 合成致死の 2 つの成果の交差点：がん発生初期機構としてエピゲノム制御、とりわけ EZH2 を核にした PRC2 の関与を明らかにしたが、EZH2 と N-myc が物理的に結合し複合体を作ること、MYCN 発現が EZH2 発現を促進することは大きな意味を持つと考えられる。何故なら、神経芽腫の予後は MYCN 増幅のみでなく、MYC 標的遺伝子群の高発現によって担われる可能性を指摘した論文も現れ、臨床的に MYCN の重要性が増しているからである。そして、こうして神経芽腫の成り立ちを考慮した場合も、本研究の 2 番目の課題である MYCN との合成致死が治療分子標的探索に有効な戦略であることを保証したと考えることもできる。

今後、EZH2 などの PRC2 構成分子が MYCN との合成致死を示すのかを検証することは、治療戦略とロジックを結びつける上

でも重要だと考えている。

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 12 件)

Matsumoto N, Konno A, Ohbayashi Y, Inoue T, Matsumoto A, Uchimura K, Kadomatsu K, Okazaki S, Correction of spherical aberration in multi-focal multiphoton microscopy with spatial light modulator. *Opt Express*, 査読有, 2017, 25(6), 7055-7068

DOI: 10.1364/OE.25.007055

Zhang Z, Takeda-Uchimura Y, Foyez T, Ohtake-Niimi S, Narentuya, Akatsu H, Nishitsuji K, Michikawa M, Wyss-Coray T, Kadomatsu K, Uchimura K, Deficiency of a sulfotransferase for sialic acid-modified glycans mitigates Alzheimer's pathology, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, 2017, 114(14), E2947-E2954

DOI: 10.1073/pnas.1615036114

Yoshimura T, Hayashi A, Handa-Narumi M, Yagi H, Ohno N, Koike T, Yamaguchi Y, Uchimura K, Kadomatsu K, Sedzik J, Kitamura K, Kato K, Trapp BD, Baba H, Ikenaka K, GlcNAc6ST-1 regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system, *Sci Rep*, 査読有, 2017, 7, 42257

DOI: 10.1038/srep42257

Masuda T, Maeda K, Sato W, Kosugi T, Sato Y, Kojima H, Kato N, Ishimoto T, Tsuboi N, Uchimura K, Yuzawa Y, Maruyama S, Kadomatsu K, Growth Factor Midkine Promotes T-Cell Activation through Nuclear Factor of Activated T Cells Signaling and Th1 Cell Differentiation in Lupus Nephritis, *Am J Pathol*, 査読有, 2017, 187(4), 740-751

DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.12.006

Ukai J, Imagama S, Ohgomori T, Ito Z, Ando K, Ishiguro N, Kadomatsu K, Nogo receptor 1 is expressed in both primary cultured glial cells and neurons, *Nagoya J Med Sci*, 査読有, 2016, 78(3), 303-311

Zhang Z, Ohtake-Niimi S, Kadomatsu K, Uchimura K, Reduced molecular size and altered disaccharide composition of cerebral chondroitin sulfate upon Alzheimer's pathogenesis in mice, *Nagoya J Med Sci*, 査読有, 2016, 78(3), 293-301

Murakami-Tonami Y, Ikeda H, Yamagishi R, Inayoshi M, Inagaki S, Kishida S, Komata Y, Jan Koster, Takeuchi I, Kondo Y, Maeda T, Sekido Y, Murakami H, Kadomatsu K, SGO1 is involved in the DNA damage response in MYCN-amplified neuroblastoma cells, *Sci Rep*, 査読有, 2016, 6, 31615

DOI: 10.1038/srep31615

Scilabra SD, Yamamoto K, Pignoni M, Sakamoto K, Müller SA, Papadopoulou A, Lichtenthaler SF, Troeberg L, Nagase H, Kadomatsu K, Dissecting the interaction between tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1): Development of a "TRAP" to increase levels of TIMP-3 in the tissue, *Matrix Biol*, 査読有, 2017, 59, 69-79

DOI: 10.1016/j.matbio.2016.07.004

Honda Y, Shishido T, Takahashi T, Watanabe T, Netsu S, Kinoshita D, Narumi T, Kadowaki S, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Kishida S, Kadomatsu K, Takeishi Y, Kubota I, Midkine Deteriorates Cardiac Remodeling via Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Chronic Kidney Disease, Hypertension, 査読有, 2016, 67(5), 857-865

DOI:

10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06922

Ohgomori T, Yamada J, Takeuchi H, Kadomatsu K, Jinno S, Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *Eur J Neurosci*, 査読有, 2016, 43(10), 1340-1351

DOI: 10.1111/ejn.13227

Suzuki K, Satoh K, Ikeda S, Sunamura S, Otsuki T, Satoh T, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Nogi M, Numano K, Sugimura K, Aoki T, Tatebe S, Miyata S, Mukherjee R, Spinale FG, Kadomatsu K, Shimokawa H, Basigin Promotes Cardiac Fibrosis and Failure in Response to Chronic Pressure Overload in Mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 査読有, 2016, 36(4), 636-646

DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306686

Hashimoto H, Ishino Y, Jiang W, Yoshimura T, Takeda-Uchimura Y, Uchimura K, Kadomatsu K, Ikenaka K, Keratan Sulfate Regulates the Switch from Motor Neuron to Oligodendrocyte Generation During Development of the Mouse Spinal Cord, *Neurochem Res*, 査読有, 2016, 41(1-2), 450-462

DOI: 10.1007/s11064-016-1861-9

〔学会発表〕(計 5 件)

Kadomatsu K, Sulfated glycans regulate autophagy and axon regeneration, *SfN-Neuroscience2016*, November 12-16, 2016, San Diego, USA

門松健治, マスタープランの現状について～統合的生命科学研究推進プラットフォーム～, 第14回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 2016.11.1-2, ソラシテ

イ コンファレンスセンター（東京お茶の水、東京都千代田区）

Kadomatsu K, Mechanisms of axon regeneration inhibition after neuronal injury, Freiburg/Adelaide/Nagoya Annual Symposium, October 17-18, 2016, The University of Adelaide, Australia

門松健治, 硫酸化糖鎖によるオートファジーと軸索再生の制御, 第57回 日本生化学会 中国・四国支部例会, 2016.5.27-28, 高知大学 岡豊キャンパス (高知県南国市)

Kadomatsu K, Mechanisms of Axon Regeneration and its Inhibition, Fourth Midkine Symposium, Apr 28-30, 2016, Hungarian Institution of Foreign Affairs & Trade, Budapest, Hungary

〔その他〕

ホームページ等

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/bio-chem/mol-biology/

名古屋大学大学院医学系研究科分子生物学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門松 健治 (KADOMATSU, Kenji)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80204519

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

清成 信一 (Kiyonari, Shinichi)

名古屋大学・大学院医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70570836

竹内 一郎 (Takeuchi, Ichiro)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40335146

高橋 義行 (Takahashi, Yoshiyuki)

名古屋大学・大学院医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40432273