

令和元年6月12日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10051

研究課題名(和文) 難治性神経芽腫モデルマウスを用いた単細胞解析による創薬標的スクリーニング

研究課題名(英文) Single cell screening of molecular target in using malignant neuroblastoma animal model

研究代表者

竹信 尚典 (Takenobu, Hisanori)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・研究員

研究者番号：60392247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は幹細胞マーカーであるCD133のプロモーター領域を解析し、転写を誘導する転写因子CDX1を同定した。CDX1は神経芽腫細胞の増殖を促進し、スフェア形成を誘導したが、同時に細胞の増殖を抑制する機能を有することが示唆された。CDX1は複数の幹細胞関連遺伝子の発現に関わっていることが示唆され、神経芽腫の静止状態のがん幹細胞で働いていることを明らかにした。CD133およびCDX1を組織特異的に発現するTgマウスを作成し、解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫を始めとした小児がんは、成人のがんと異なって遺伝子の変異を伴わずに発生する。したがって、発がんには何らかの遺伝子の発現異常が生じていると考えられるが、その分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究で見出したCDX1は、神経芽腫のがん幹細胞に発現している転写因子であり、CD133をはじめとした幹細胞関連遺伝子の発現を上昇させることから、発がんだけでなく、複数の組織幹細胞の維持に関わっているものと考えられる。本課題で作出したCDX1のTgマウスは、発がんだけでなく、神経堤由来の組織の発生メカニズムを明らかにする、非常に有用なモデルとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Stem cell marker CD133 was upregulated in neuroblastoma (NB) sphere. CDX1 was identified as a transcription factor that directly induced CD133 expression in NB spheres by analysis of CD133 promoter region. CDX1 upregulated stem cell-related genes in NB cells. On the other hand, CDX1 suppressed tumor-related proliferation pathways. Then we generated CD133 and CDX1 conditional transgenic mice. These mice expressed transgenes in neural crest originated tissues.

研究分野：医歯薬学

キーワード：幹細胞 発がん 細胞分化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんにおいて、発がんや再発および転移には、正常組織の持つ組織幹細胞に似た"がん幹細胞"が存在すると考えられる。がん幹細胞は、1) 少数の細胞でがんを形成する発がん能力を持つこと、2) 性質の異なった細胞への分化する能力を持つこと、3) 薬剤に対して他の細胞よりも高い耐性能力を持つことなどから、Stemness を獲得した特殊な細胞といえる。悪性のがんが、しばしば再発や転移を引き起こす原因は、がん幹細胞が治療後も残存していることによるものであると考えられている。このことから、がん幹細胞の分離しその性質を明らかにし、それに対する新規の治療法を開発することは、難治性がんの克服には必須である。しかしながら、がん幹細胞を特定するマーカーや、がん幹細胞自体の性質を制御する分子は、これまでに明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

神経堤細胞に由来する小児固形腫瘍である神経芽腫は、難治例では治療抵抗性を示し、転移を起こして悪性化する。我々は、幹細胞特異的な分子 CD133 の発現は、がん幹細胞を濃縮する sphere 培養法で上昇し、神経芽腫の分化を抑制して悪性化に関するメカニズムをこれまでに明らかにした(Takenobu et al., *Oncogene*, 2011)。本研究の目的は、神経芽腫の sphere 特異的に発現し、CD133 などの幹細胞マーカーの発現を誘導するキー分子である CDX1 を組織特異的に高発現することで、神経芽腫細胞の悪性化を惹起し、がん幹細胞の性質である転移を促進させるメカニズムを明らかにすることである。転移性の腫瘍は新たな遺伝子の発現に関わる、特にエピジェネティックな変化を有していると考えられる。そこで、転移したがん細胞について、単細胞ごとの遺伝子発現の変化やそれらを引き起こすエピジェネティックな変化を特定することは、転移性の難治神経芽腫の新たな治療法開発に結びつくものと期待される。

### 3. 研究の方法

#### 1) CDX1 を神経堤に高発現する Tg マウスの作出と解析

ヒト CDX1 遺伝子を、マウスの発生段階において神経芽腫の発生起原となる神経堤細胞に発現させるため、組織特異的 Cre によって誘導可能なマウスを作出する。具体的には、マウス Rosa26a 領域に、lox 配列によって発現停止がなされるように設計した CAG プロモーター-ヒト CDX1 を挿入したマウスを作出する。当該マウスを、DBH プロモーター下で発現する Cre 遺伝子を持ったマウスと掛け合わせることで、一定の割合で神経堤細胞にヒト CDX1 遺伝子を発現するマウスが得られることが予想される。生まれたマウスの遺伝型を確認し、予想された割合で Cre と CDX1 の両遺伝子を持つマウスが存在するかどうかを検討し、存在しない場合は胎児での神経堤や副腎組織の形成に異常が生じないか解析する。

#### 2) 神経芽腫で CDX1 依存的に発現量が変化するがん幹細胞関連遺伝子の同定

ヒト神経芽腫細胞株において、レンチウイルスを用いて CDX1 を高発現させる。それらの細胞における遺伝子発現量の変化のうち、初期段階で生じるものについては、CDX1 依存的なものが多く、それらの中のがん幹細胞性に関わる遺伝子および悪性化に関わる遺伝子が多数含まれると予想される。そこで、CDX1 高発現ウイルスを感染して 72 時間以内の細胞を回収し、RNA を調製してマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行う。CDX1 によって高発現した遺伝子群のみ、または発現変化のあった遺伝子群すべてについて、パスウェイ解析、GSE (Gene Set Enrichment) 解析を行うことで、細胞に対してどのような影響を及ぼす経路の遺伝子発現が変化したかを明らかにする。

#### 3) CDX1 の下流で働く遺伝子の発現調節機能の解析

CDX1 の下流で変動する遺伝子のパスウェイのうち、重要と判断されたものについては、遺伝子の発現調節領域のゲノム DNA をクローニングして、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を連結して、発現制御機構を解析する。遺伝子発現調節領域を組み込んだベクターと、ヒト CDX1 を細胞に高発現させ、ルシフェラーゼの活性を調べることで、CDX1 が発現制御に直接関わっているかどうかを明らかにすることができる。さらに、CDX1 を発現した細胞において、ChIP 解析を行うことで、細胞内で CDX1 が標的遺伝子の発現制御領域に結合しているかどうかを明らかにする。

#### 4) 臨床検体での CDX1 の発現解析

CDX1 が発現する神経芽腫細胞は、がん幹細胞の性質を持っており、がん組織の中にも少数しか存在しないと考えられる。そこで臨床検体の切片を CDX1 に対する抗体で染色し、患者の予後と CDX1 陽性細胞数との相関を調べる。なお、CDX1 に対する抗体についてはこれまでに定評のあるものが存在しないため、CDX1 を高発現したヒト神経芽腫細胞株をヌードマウスに移植したものを用意し、入手可能な抗体で免疫染色を行って適当な抗体を選別する。

### 4. 研究成果

1) ヒト CDX1 を組織特異的に発現するため、理化学研究所で CAG プロモーター下に lox と終止コドンとヒト CDX1 遺伝子を連結したフラグメントを Rosa26a 領域に挿入した ES 細胞から、キメラマウスを作出した(hCDX1-Tg マウス)。マウスについては、当初 2 系統を維持した。理化学

研究所バイオリソースセンターから入手したDBH-Cre マウスとhCDX1-Tg マウスを交配したところ、いずれかのヘテロマウスのみが得られた。これらのことから、ヒト CDX1 が神経堤細胞に発現することは、マウスの胎生致死につながるのではないかと予想された。その後胎児から副腎を摘出し、RT-PCR とウェスタンブロッティングを行い、ヒト CDX1 の発現を確認した。しかし、ヒト CDX1 は mRNA、タンパク質とも非常に低発現であったため、ヒト CDX1 の発現の及ぼす影響が明らかでないと判断した。そこで、改めて ES 細胞から 3 系統のマウスを作出した。DBH-Cre マウスとの交配を続けている。

2) ヒト CDX1 は、使用されているほとんどの培養細胞で mRNA レベルで発現が見られないため、高発現実験によって標的遺伝子を探索することができる。複数のヒト神経芽腫細胞株に、レンチウイルスで hCDX1 を高発現し、mRNA を用いたマイクロアレイ解析を行ったところ、これまで明らかにしていた CD133 だけでなく、Fujii et al. 2012 Proc Natl Acad Sci USA に報告された KLF5、SALL4 を含む複数の幹細胞関連遺伝子の発現が、細胞株を問わず上昇した。パスイ解析でも、幹細胞に発現する遺伝子セットが上位を占めており、CDX1 はがん幹細胞性を制御する重要な遺伝子であることが示唆された。一方で GSE 解析では、がん遺伝子の下流の細胞増殖等に関わる遺伝子群が複数存在していることから、増殖しにくく治療に抵抗を持つ、がん幹細胞の性質も制御しているものと考えられた。

3) CDX1 を高発現した神経芽腫細胞を回収し、上記の 2) で明らかになった遺伝子の発現を制御する領域に対して、ChIP 解析を行った。その結果、CDX1 は CD133 を含む複数の幹細胞関連遺伝子の発現制御領域に直接結合して、遺伝子の発現を促進していることが明らかになった。また、増殖に関わるがん遺伝子のプロモーター領域にも直接結合が見られたことから、CDX1 は遺伝子の発現誘導と発現抑制の両方の働きを持つことが示唆された。実際に CD133 およびがん遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼレポーターベクターにクローニングし、CDX1 と共発現させることで、CD133 プロモーターはルシフェラーゼ活性を上昇させるが、がん遺伝子では低下させることが *in vitro* でも証明された。

4) 予後不良の神経芽腫の組織は、がん幹細胞が多く含まれると考えられる。臨床検体の染色に当たり、陽性コントロールとして、ヒト CDX1 を高発現させた神経芽腫細胞株をヌードマウスに移植して腫瘍を形成させた。また、神経堤細胞や末梢神経系でヒト CDX1 を高発現する Tg マウスの組織を使用することも考えたが、現在までに十分な数の組織が得られていない。さらにヒト CDX1 に対する、免疫染色に有用な抗体は文献でも明らかになっておらず、実際に市販の抗体を試したが、染色像が得られなかった。そこで Nakayama et al. 2018 Cancer Sci において、藤田保健衛生大学の稲田 健一先生が作成された、CDX1 に対する抗体を分与していただき、検討を行っている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Chikaraishi K, Takenobu H, Sugino RP, Mukae K, Akter J, Haruta M, Kurosumi M, Endo TA, Koseki H, Shimojo N, Ohira M, Kamijo T. CFC1 is a cancer stemness-regulating factor in neuroblastoma. *Oncotarget*. ( 査読有り ) 2017 8(28):45046-45059. doi: 10.18632/oncotarget.18464.

2. Li Z, Takenobu H, Setyawati AN, Akita N, Haruta M, Satoh S, Shinno Y, Chikaraishi K, Mukae K, Akter J, Sugino RP, Nakazawa A, Nakagawara A, Aburatani H, Ohira M, Kamijo T. EZH2 regulates neuroblastoma cell differentiation via NTRK1 promoter epigenetic modifications. *Oncogene*.( 査読有り ) 2018 37(20):2714-2727. doi: 10.1038/s41388-018-0133-3.

〔学会発表〕(計 件)

1. Akita N, Takenobu H, Kamijo T, 他 2 名, Polycomb group protein BMI1 protects neuroblastoma cells from DNA damage-induced apoptotic death in cooperation with L3MBTL2, 第 107 回米国癌学会総会(AACR2016), 2016 年 4 月, ニューオーリンズ, アメリカ

2. Takenobu H, Kamijo T, 他 8 名, CDX1 regulates cancer stemness pathway in neuroblastoma, CDX1 regulates cancer stemness pathway in neuroblastoma, 国際神経芽腫学会 (ANR2016), 2016 年 6 月, ケアンズ, オーストラリア

3. Takenobu H, Kamijo T, 他 6 名, 神経芽腫幹細胞を制御する新規シグナル経路の解析, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月, 横浜

4. Sugino R, Takenobu H, Kamijo T, 他 4 名, iPS 細胞から神経堤細胞への分化における統合

解析, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月, 横浜

5. Li Z, Takenobu H, Kamijo T, 他 8 名, EZH2 による神経芽腫の分化抑制, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月, 横浜

6. Takenobu H, Kamijo T, 他 4 名, 神経芽腫幹細胞を制御する新規シグナル経路の解析, 第 58 回日本小児血液がん学会学術集会, 2016 年 12 月, 品川

7. Chikaraishi K, Takenobu H, Kamijo T, 他 3 名, 神経芽腫幹細胞を制御する新規シグナル経路の解析, 第 58 回日本小児血液がん学会学術集会, 2016 年 12 月, 品川

8. Kamijo T, Effects of development regulators on neuroblastoma biology, 第 76 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム), 2017 年 9 月, 横浜

10. Chikaraishi K, Takenobu H, Kamijo T, 他 9 名, CFC1 regulates cancer stemness phenotypes in neuroblastoma via Activin signaling suppression, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月, 横浜

11. Takenobu H, Kamijo T, 他 6 名, Sphere specific transcription factor CDX1 has dual functions for regulating stemness of neuroblastoma, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月, 横浜

12. Sugino R, Takenobu H, Kamijo T, 他 4 名, Characterization of cell type by DNA methylation pattern using principal component analysis-based approach, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月, 横浜

13. Li Z, Takenobu H, Kamijo T, 他 8 名, EZH2 regulates neuroblastoma cell differentiation via NTRK1 promoter epigenetic modifications, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月, 横浜

14. Akter J, Takenobu H, Kamijo T, 他 8 名, CRISPR/Cas9-based knockout of the chromatin remodeling factor ATRX and its effect in neuroblastoma (NB) cells, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月, 横浜

15. Takenobu H, Kamijo T, 他 10 名, EZH2 regulates neuroblastoma cell differentiation via NTRK1 promoter epigenetic modifications, 第 3 回アジア・パシフィック神経芽腫シンポジウム (APSN2017), 2017 年 10 月, 東京

16. Takenobu H, Kamijo T, 他 10 名, EZH2 regulates neuroblastoma cell differentiation via NTRK1 promoter epigenetic modifications, 第 59 回日本小児血液がん学会学術集会, 2017 年 11 月, 松山

17. Takenobu H, Kamijo T, 他 10 名, Sphere specific transcription factor CDX1 regulates stemness of neuroblastoma, 第 59 回日本小児血液がん学会学術集会, 2017 年 11 月, 松山

18. Chikaraishi K, Takenobu H, Kamijo T, 他 9 名, Effect of CFC1 on cancer cell stemness in neuroblastoma, 第 59 回日本小児血液がん学会学術集会, 2017 年 11 月, 松山

19. Satoh S, Takenobu H, Kamijo T, 他 2 名, Reevaluation of PDGFR $\alpha$  signal in neuroblastoma: high expression and a new nonsynonymous mutation, 国際神経芽腫学会 (ANR2018), 2018 年 5 月, サンフランシスコ, アメリカ

20. Takenobu H, Kamijo T, 他 9 名, CDX1 regulates neuroblastoma stemness through MYC pathway modulation and reprogramming gene activation, 国際神経芽腫学会 (ANR2018), 2018 年 5 月, サンフランシスコ, アメリカ

21. Li Z, Takenobu H, Kamijo T, 他 13 名, EZH2 regulates neuroblastoma cell differentiation via NTRK1 promoter epigenetic modifications, 国際神経芽腫学会 (ANR2018), 2018 年 5 月, サンフランシスコ, アメリカ

22. Chikaraishi K, Takenobu H, Kamijo T, 他 9 名, CFC1 is a Cancer Stemness-Regulating Factor in Neuroblastoma, 国際神経芽腫学会 (ANR2018), 2018 年 5 月, サンフランシスコ, アメリカ

23. Mukae K, Takenobu H, Kamijo T, 他 9 名, iPS 細胞由来神経堤細胞の神経芽腫発生メカニズム解析のための細胞モデル開発, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年 9 月, 大阪

24. Takenobu H, Kamijo T, 他 11 名, CDX1 は MYC パスウェイの抑制とリプログラミング遺伝子の発現上昇を介して神経芽腫の幹細胞性を制御する, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年 9 月, 大阪

25. Okada R, Takenobu H, Kamijo T, 他 10 名, ポリコーム群タンパク質 L3MBTL2 は BMI1 と協調的に神経芽腫細胞死を抑制する, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年 9 月, 大阪

26. Endo Y, Takenobu H, Kamijo T, 他 10 名, 神経芽腫における EZH2 阻害剤の感受性を制御する分子の探索, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年 9 月, 大阪

27. Endo Y, Takenobu H, Kamijo T, 他 11 名, 神経芽腫における EZH2 阻害剤の感受性を制御する分子の multi-omics 探索, 第 60 回 日本小児血液がん学会学術集会, 2017 年 11 月, 松山

28. Takenobu H, Kamijo T, 他 16 名, EZH2 は神経芽腫の予後因子 NTRK1 の発現をエピジェネティックに制御する, 第 60 回 日本小児血液がん学会学術集会, 2017 年 11 月, 松山

他 X 名。

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 上條 岳彦

ローマ字氏名: Takehiko Kamijo

所属研究機関名: 埼玉県立がんセンター

部局名: 臨床腫瘍研究所

職名: 所長

研究者番号(8桁): 90262708

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。