

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2016～2017  
課題番号：16K19644  
研究課題名(和文) 神経芽腫の発症・進展におけるDENND2Aの役割に関する研究

研究課題名(英文) Role of DENND2A for development of neuroblastoma

## 研究代表者

山本 暢之 (YAMAMOTO, NOBUYUKI)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20596043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫は小児における代表的な再発・難治がんで、高リスク群患者の長期生存率は未だ40%に満たない。神経芽腫の再発は、治療抵抗性がん幹細胞の再活性化と捉えられており、その制御に細胞内小胞輸送の制御分子であるDENNドメイン蛋白質が関わっていることを明らかにしてきた。本研究では、DENNドメイン蛋白質のメンバーとして同定したDENND2Aが活性化するRabファミリー低分子量G蛋白質のメンバーとしてRab9Bを同定し、DENND2A-Rab9B系が神経芽腫の発症・進展に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Neuroblastoma is a typical recurrent and refractory tumor in children and its long-term survival remains less than 40%. Neuroblastoma relapse is caused by activation of chemo-resistant cancer stem cells (CSCs). Key regulators of intracellular vesicle trafficking, DENN domain proteins, were implicated in this process. In this study, a member of DENND domain proteins DENND2A and its target Rab family small G protein Rab9B were found to be involved in the development and progression of neuroblastoma.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：神経芽腫 がん幹細胞 DENND2A Rab9B 細胞内小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、小児がん死亡の約 15%を占める代表的な小児難治性固形がんである。特に高リスク群患者は 50%以上が再発し、その長期生存率は未だ 40%に満たない。そのため、高リスク患者の予後改善は、現在の小児がん診療における喫緊の課題である。

近年、高リスク神経芽腫患者における治療標的分子の同定を目指した全ゲノム解析が進められた結果、1 患者当たりの遺伝子異常の数は約 20 と他のがんにして非常に少ないこと、約 3/4 の患者には現時点で治療標的となる遺伝子変異が認められないこと、が示された。つまり、治療標的分子の同定には、遺伝子解析に代わる新たなアプローチが必要だと考えられる。

多くのがんで、自己複製能と多分化能をもつがん幹細胞が同定されており、がんの発症・進展はがん幹細胞の増殖・分化によると考えられている。神経芽腫においても同様に、再発は治療抵抗性がん幹細胞の再活性化と捉えられており、その制御に細胞内小胞輸送の制御分子である DENN とメイン蛋白質が関わっていることを明らかにしてきた。

DENN ドメイン蛋白質は、~180 アミノ酸からなる DENN (differentially expressed in normal and neoplastic cells) ドメインを有する蛋白質で、これまでに 26 のメンバーが同定されている。DENN ドメイン蛋白質は、60 以上のメンバーからなる Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質(Rab) を活性化し、各々特異的な Rab のメンバーを GDP と結合した不活性化型から GTP と結合した活性化型へと変換することで、Rab の特定の膜ドメインへの局在を規定し、細胞内小胞輸送の特異性・選択性を制御すると考えられている。

DENN ドメイン蛋白質による細胞内小胞輸送の活性制御異常は、既にがんを含む幾つかのヒト疾患で報告されており、DENND1B は、原発性胆汁性肝硬変やクローン病の疾患感受性遺伝子として同定されている。また DENND2B は、子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞では腫瘍抑制遺伝子として、乳癌細胞株 1833TR 細胞では腫瘍促進遺伝子として示されている。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、我々は DENN ドメイン蛋白質に注目し、これまでに DENND2A が神経芽腫の発症・進展において抑制的に働くことを見出した。そこで本研究では、DENND2A による神経芽腫の発症・進展の分子機構の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) DENND2A により活性化される Rab メンバーの同定と機能解析

DENN ドメイン蛋白質のメンバーは、Rab のメンバーを特異的に活性化する。本研究では DENND2A によって活性化される Rab メンバーの同定を試みる。まず DENND2A によって活性化されることが既に報告されている Rab9A と Rab9B について、過剰発現した神経芽腫細胞と発現抑制した神経芽腫細胞におけるスフェア形成能、コロニー形成能、腫瘍形成能の解析を DENND2A の場合と同様に行い、神経芽腫細胞における Rab9A, Rab9B の機能を明らかにする。

### (2) DENND2A-Rab 系の上流/下流シグナルの同定

Rab のメンバーには GTP 結合型と GDP 結合型が存在し、全てのメンバーに共通の遺伝子変異を導入することで GTP およ

び GDP 結合型変異体を作成することが出来る。上記で同定した Rab メンバーの GTP および GDP 結合型変異体を作成する。DENND2A および同定した Rab メンバーの野生型、GTP および GDP 結合型を過剰発現した神経芽腫細胞を樹立し、それぞれの神経芽腫細胞における遺伝子発現解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) Rab9B の神経芽腫細胞の発症・進展への関与

神経芽腫における Rab9 と神経芽腫の進展との関連を解析した。DENN ドメイン蛋白質と同様に、通常の神経芽腫細胞とスフェアにおける Rab9A, Rab9B の発現を Real-time RT-PCR 法で解析した結果、Rab9B が通常の神経芽腫細胞とスフェアにおいて発現の著しく異なる Rab のメンバーとして同定された。そこで次に、Rab9B の発現が神経芽腫の腫瘍形成に与える影響について検討した。

Rab9B の過剰発現細胞・発現抑制細胞について、ニューロスフェアに準じた条件で培養した場合のスフェア形成能、寒天培地におけるコロニー形成能及び免疫抑制マウスにおける腫瘍形成能を解析した。Rab9B の過剰発現細胞では、スフェア形成能・コロニー形成能・腫瘍形成能とも低下したのに対して、Rab9B の発現抑制細胞においては、スフェア形成能・コロニー形成能・腫瘍形成能とも亢進した。また、過剰発現細胞は通常の神経芽腫細胞に比べて分化した形態となることを明らかにした。

これらの結果から、Rab9B も DENND2A と同様に、神経芽腫の発症・進展に抑制的に働くことが示された。

##### (2) 神経芽腫患者の予後と DENND2A, Rab9B の発現の関係についての検討

Rab9B の発現と患者予後についても、神経芽腫データベースである R2 を用いて検討した。Rab9B を高発現していた患者群は発現の低い群に比べて有意に予後が良好で、Rab9B の発現が神経芽腫に対して抑制的に働くことを支持する結果であった。

以上の結果から、神経芽腫において細胞内小胞輸送に関わる分子である DENND2A と DENND2A により活性化される低分子量 G 蛋白質である Rab9B が、神経芽腫の発症・進展に関与することを見出した。

##### (3) Rab9B の GTP 結合型及び GDP 結合型の作成と神経芽腫細胞への導入、細胞株の樹立

Rab9B について、遺伝子変異を導入して GTP 結合型(常に活性化型となる変異体)と、GDP 結合型(常に不活性化型となる変異体)を作成し、野生型、GTP 結合型、GDP 結合型を過剰発現した神経芽腫細胞株を樹立した。

現在これらの細胞株を用いて遺伝子発現解析を行っている。神経芽腫はほかの悪性腫瘍に比べて治療標的となり得る遺伝子異常の数が非常に少なく、細胞の形態の違いから細胞内小胞輸送に注目した本研究は治療標的分子の探索において新たな端緒となる可能性がある。

#### 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 1 件)

Hirase, S. Saitoh, A. Hartomo, T. B. Kozaki, A. Yanai, T. Hasegawa, D. Kawasaki, K. Kosaka, Y. Matsuo, M. Yamamoto, N. Mori, T. Hayakawa, A. Iijima, K. Nishio, H. Nishimura, N. Early detection of tumor

relapse/regrowth by consecutive minimal residual disease monitoring in high-risk neuroblastoma patients.

*Oncol Lett.* 12(2):1119-1123, 2016

[学会発表](計 3 件)

Nobuyuki Yamamoto, Khin Kyaemon Thwin, Jun-ya Fujimura, Keita Nakanishi, Takeshi Mori, Akira Hayakawa, Hisahide Nishio, Masafumi Matsuo, Daiichiro Hasegawa, Kei-ichiro Kawasaki, Yoshiyuki Kosaka, Kazumoto Iijima, Noriyuki Nishimura. *Advance in Neuroblastoma Research meeting 2014*, Cairns, Australia. 19<sup>th</sup>-23<sup>rd</sup> June, 2016.

Noriyuki Nishimura, Thi Van Huyen Pham, Khin Kyaemon Thwin, Nobuyuki Yamamoto, Takeshi Mori, Akira Hayakawa, Hisahide Nishio, Masafumi Matsuo, Daiichiro Hasegawa, Yoshiyuki Kosaka, Kazumoto Iijima. Rab6B mediates the progression of neuroblastoma through the interaction with MTMR5. *Advance in Neuroblastoma Research meeting 2014*, Cairns, Australia. 19<sup>th</sup>-23<sup>rd</sup> June, 2016.

Nobuyuki Yamamoto, Khin Kyaemon Thwin, Satoru Takafuji, Suguru Uemura, Nanako Nino, Takeshi Mori, Toshiaki Ishida, Dai-ichiro Hasegawa, Yoshiyuki Kosaka, Kazumoto Iijima, Noriyuki Nishimura. Involvement of DENND2A and Rab9B in the progression of neuroblastoma. *3<sup>rd</sup> Asia-Pacific International Symposium of Neuroblastoma*. Tokyo, JAPAN, Oct 6, 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

山本 暢之(Yamamoto, Nobuyuki)  
神戸大学大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：20596043

(2) 研究協力者

西村 範行(Nishimura, Noriyuki)  
神戸大学大学院・特命教授  
研究者番号：00322719

森 健(Mori, Takeshi)  
神戸大学大学院・特命講師

小阪 嘉之(Kosaka, Yoshiyuki)

兵庫県立こども病院 血液腫瘍内科部長