

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10132

研究課題名（和文）BMCC1によるゲノム安定維持とその神経芽腫悪性化防止への関与

研究課題名（英文）Tumor suppressor function of BMCC1 in neuroblastoma

研究代表者

巽 康年（Tatsumi, Yasutoshi）

千葉県がんセンター（研究所）・がん予防センター 腫瘍ゲノム研究室・上席研究員

研究者番号：00450578

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小児固形腫瘍の神経芽腫の予後良好因子として当研究所において同定されたBMCC1による神経芽腫悪性化防止の分子基盤の解明を目指した。その研究成果の一部として、Akt生存シグナルのブレーキ役であり、ミトコンドリア細胞死を誘導するBMCC1は、抗癌剤によるDNA損傷が生じた後速やかにATM-E2F1依存的に転写誘導されるとともに、ミトコンドリア細胞死が誘導された後にカスパーゼ9依存的に切断・分解されることを発見し、BMC Cancer誌に責任著者として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、ミトコンドリア細胞死におけるBMCC1の発現プロファイルおよびその制御機構を明らかにした。BMCC1の時期特異的な発現プロファイルは、抗癌剤感受性およびゲノムの安定維持に関わるDNA損傷からミトコンドリア細胞死に至る過程におけるBMCC1の機能を理解する重要な手がかりとなる点で学術的に意義深い。BMCC1の発現制御メカニズムは、難治性となった神経芽腫の有効な治療法の開発への応用が期待できる点で、社会的に意義深い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the molecular basis of BMCC1, a favorable prognostic factor for neuroblastoma, in repression of malignant transformation of neuroblastoma. As part of our results, we found that BMCC1, which acts as a brake for Akt-survival signal and induces mitochondrial cell death, was rapidly transcribed in an ATM-E2F1-dependent manner in response to DNA damage with cisplatin. We also found that BMCC1 was cleaved and degraded by caspase 9-dependent mechanism at the later stage of apoptotic cell death in mitochondrial pathway. We reported these findings in BMC Cancer.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：神経芽腫 BMCC1 アポトーシス DNA損傷応答

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、進行性のがんが難治性を示す小児固形腫瘍の神経芽腫を研究対象とし、難治性神経芽腫の有効な治療法を開発するための手がかりを掴むために、神経芽腫の悪性化と自然退縮メカニズムの解明を目指している。特に、「自然退縮」は18ヶ月未満の乳幼児に発生した神経芽腫に認められ、たとえ遠隔転移を起こしていたとしても腫瘍が消滅する現象が知られるが、ここに治療標的となり得る神経芽腫の弱点が存在すると申請者らは考え、研究を進めている。

BMCC1は、当研究施設で行われた神経芽腫の新規予後因子探索研究の成果として発見された神経芽腫の予後良好性遺伝子で、その細胞死促進機能を介した神経芽腫の悪性化防止と自然退縮メカニズムへの寄与を解明しつつある(文献1,2,3)。中でも、Akt細胞生存シグナル経路の亢進は神経芽腫を含む種々のがんにおいて知られるが、BMCC1はAkt細胞生存シグナル経路の複数のステップにおいてブレーキとして機能し、ミトコンドリア経路の細胞死を誘導する働きを持つ(文献2)。近年、BMCC1が前立腺がんのがん抑制遺伝子であることが示され(文献4)、またBMCC1の機能抑制型変異が副甲状腺がんやメルケル細胞がんなどで発見され「新規癌抑制遺伝子」として注目されている(文献5,6)。

神経芽腫の悪性化に関して、これまでの研究から、MYCN遺伝子の増幅およびALK(Anaplastic Lymphoma Kinase)遺伝子の活性型変異や増幅などがドライバーとして働くことが示されている。これらの遺伝子異常に加えて、次世代型シークエンサーを用いた網羅的解析から、癌抑制遺伝子のARID1A/B(文献7)およびATR(文献8)の変異、またTERT遺伝子の増幅及び発現亢進(文献9)なども悪性化に寄与することが報告された。申請者らのグループは、連携研究者(中村)を代表とした『次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム・創薬コンセプトに基づく戦略的治療デザインの確立』の下で、施設の組織バンクに蓄積された約3,000症例の神経芽腫検体のうち、MYCN非増幅でありながら11q lossと17q gainを有し再発を繰り返す難治性サブタイプ(中間予後群:P2sおよびP3s,(文献10)96症例を抽出し、全エクソンシークエンス・RNAシークエンス・メチローム解析などを行い、TP53とRB/E2F関連遺伝子及びゲノム維持関連遺伝子の異常、すなわち、11q loss(ATM,CHK1,H2AXの欠損)と合わせてゲノム不安定性の増大が本サブタイプの悪性化に寄与することを見出した。

このような研究の進展にも関わらず、神経芽腫の悪性化と自然退縮機構ならびにこれらメカニズムへのBMCC1の分子関与については依然として不明である。

### 2. 研究の目的

(研究目的1)ミトコンドリア依存的な細胞死を誘導した神経芽腫細胞株におけるその鍵分子のBMCC1の転写調節メカニズムの解明、ミトコンドリア依存的な細胞死が進行中の神経芽腫細胞株におけるその鍵分子のBMCC1蛋白質の量的制御メカニズムの解明、さらに予後良好な神経芽腫で高発現するBMCC1の発現意義とその役割について神経芽腫細胞株の網羅的解析による解明を行い、自然退縮を含む神経芽腫の悪性化防止機構の理解に繋げることを目的とした。

(研究目的2)DNA損傷を受けた神経芽腫細胞株におけるATM-E2F1経路を介したBMCC1の発現制御メカニズムの解明を行い、ATMのリン酸化(DNA損傷応答)を促進する働きを持つBMCC1が、神経芽腫のゲノム安定維持に寄与する分子基盤の理解に繋げることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(研究方法1)BMCC1の転写調節メカニズムの解明は、BMCC1を発現する神経芽腫細胞株(SK-N-AS細胞)に対して抗がん剤のシスプラチンを処理することによってミトコンドリア依存的な細胞死を誘導する実験系を使用して行った。ミトコンドリア依存的な細胞死が進行してCaspaseの切断と活性化が認められる細胞におけるBMCC1蛋白質の分解制御メカニズムを解明するために、Caspaseインヒビターを用いた細胞レベルの実験と、活性型Caspaseリコンビナント蛋白質を用いた試験管レベルの実験を行った。BMCC1を発現するNBL-S細胞株に対してshRNAを用いてBMCC1のノックダウンを行い、その際に発現が変動する遺伝子についてマイクロアレイ遺伝子発現解析法を用いて網羅的に調べ、神経芽腫におけるBMCC1の発現意義とそのがん抑制因子としての役割について検討を行った。

(研究方法2)DNA損傷を受けた神経芽腫細胞株におけるATM-E2F1経路を介したBMCC1の発現制御メカニズムの解明は、シスプラチン処理後に継時的に培養した神経芽腫細胞株(SK-N-AS細胞)を用いた。この細胞に対してATM阻害剤の処理あるいはshRNAを用いたE2F1またはBMCC1のノックダウンを行い、その影響を検証した。

### 4. 研究成果

(研究成果1-1)シスプラチン処理によってミトコンドリア経路の細胞死を誘導した神経芽腫細胞株SK-N-AS細胞について継時的にサンプリングを行った後、ウエスタンブロット法を用いてBMCC1の発現時期を検討した。その結果、ATM、Chk2およびH2AXのリン酸化が指標となるDNA損傷応答が観察され始める時期(シスプラチン処理後2-3時間)に先立って、すなわち、シスプラチン処理1時間後の細胞においてBMCC1蛋白質量の速やかな蓄積が観察された。次に、シスプラチン処理後、継時的にサンプリングを行ったSK-N-AS細胞より調製したRNAを

用いて *BMCC1* の mRNA 量の変化についてリアルタイム PCR 法を用いて検討した。その結果、シスプラチン処理後の細胞において *BMCC1* の mRNA 量が増加することを見出した。これは DNA 損傷が起きた細胞において *BMCC1* が転写レベルで発現制御されることを示唆するものである。そこで、次に DNA 損傷を受けた細胞における *BMCC1* の転写調節メカニズムの解明を行った。先行研究において我々は *BMCC1* のプロモーター領域に転写因子の E2F 結合配列を持つこと、実際に E2F 結合配列および E2F1 依存的に転写が亢進することを明らかにしていたこと（文献 3） E2F1 は細胞増殖関連遺伝子のみならず細胞死関連遺伝子の転写にも関与することが知られていたことから、E2F1 による *BMCC1* の転写制御を検討した。shRNA を用いて E2F1 をノックダウンした SK-N-AS 細胞についてシスプラチン処理を行い継続的なサンプリングの後、ウエスタンブロット法を用いて *BMCC1* の発現を調べた。その結果、E2F1 をノックダウンした細胞では、DNA 損傷後に *BMCC1* の発現亢進が見られないことがわかった。ルシフェラーゼアッセイ法を用いて *BMCC1* プロモーターの転写活性を調べたところ、シスプラチン処理 2 時間後に観察される *BMCC1* プロモーターの活性化が、E2F1 をノックダウンした細胞では認められなくなった。以上の結果より、シスプラチン処理によってミトコンドリア経路の細胞死を誘導した神経芽腫細胞における *BMCC1* の速やかな蓄積は、E2F1 依存的な転写制御によることを明らかにした（図 1）。本研究成果は、責任著者として BMC Cancer 誌に報告した（Islam and Takano *et al.*, 2019）。

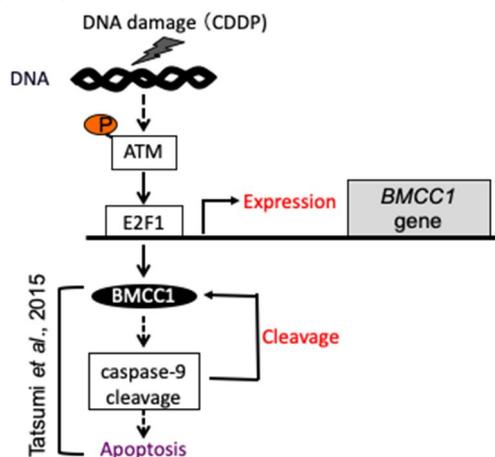
（研究成果 1-2）シスプラチン処理によってミトコンドリア経路の細胞死を誘導した SK-N-AS 細胞について継続的にサンプリングを行った後、ウエスタンブロット法を用いて *BMCC1* の発現変動を検討した。その結果、DNA 損傷後の細胞では *BMCC1* の mRNA 量が増加し続けているのにも関わらず、ミトコンドリア経路の細胞死の指標となる Caspase-9 や PARP1 の切断（活性化）が観察されるシスプラチン処理後 24 時間以降の細胞において 340-kDa 付近に検出される全長 *BMCC1* 蛋白質のバンド強度が顕著に減弱することを発見した。これは、*BMCC1* と同じくアポトーシス促進因子の Bim が、活性化された Caspase-3 によって切断される時期と一致していた。そこで、*BMCC1* も Bim 同様に細胞死の過程で Caspase によって切断されるかについて検証を行った。*BMCC1* のアミノ酸配列を検索した結果、Caspase-9 によって切断される蛋白質が持つ LEXD 配列が二箇所存在することを見出した。実際に、シスプラチン処理後に全 Caspase 阻害剤および Caspase-9 阻害剤の存在下で培養して Caspase-9 の切断（活性化）を抑制した SK-N-AS 細胞において、全長 *BMCC1* 蛋白質のバンド強度の減弱が見られなくなることがわかった。また、活性型 Caspase-9 リコンビナント蛋白質を、インビトロで合成した全長 *BMCC1* 蛋白質と混合したところ、加えた Caspase-9 蛋白質量の増加に従って全長 *BMCC1* 蛋白質が減少することを見出した。以上の結果から、ミトコンドリア経路の細胞死が引き起こされて Caspase-9 の切断（活性化）が見られる細胞において、全長 *BMCC1* 蛋白質は Caspase-9 依存的に切断・分解されることを明らかにした（図 1）。現時点では、Caspase-9 依存的な全長 *BMCC1* 蛋白質の分解制御の意義については不明であるが、*BMCC1* は Caspase-9 の切断（活性化）に必要であるとともに（文献 2） Caspase-9 を活性化した後は分解されることがミトコンドリア経路の細胞死の完了に寄与する可能性が考えられる。本研究成果は、責任著者として BMC Cancer 誌に報告した（Islam and Takano *et al.*, 2019）。

（研究成果 1-3）予後不良症例では *BMCC1* は低発現であることが知られ（文献 1） *BMCC1* の低発現が神経芽腫の悪性化に寄与すると考えられる。本仮説を実証するために、shRNA を用いて *BMCC1* を神経芽腫細胞株でノックダウンし、マイクロアレイ網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、Akt-生存シグナルの活性化に繋がると考えられる Akt の上流遺伝子群の発現亢進が見られた。これは、*BMCC1* が Akt の上流遺伝子群の発現を抑制することによって Akt 生存シグナルを負に制御する働きを持つことを示す結果である。すなわち、*BMCC1* はミトコンドリア経路の細胞死を誘導する機能に加えて、Akt シグナルを負に制御する本メカニズムを介して神経芽腫の悪性化防止に寄与すると考えられる。さらに、*BMCC1* のノックダウンは活性酸素の増加と解糖系の亢進が示唆される遺伝子群の発現変化、すなわち *BMCC1* の発現低下によってミトコンドリアに異常が誘導される可能性が示され、これも神経芽腫の悪性化に寄与すると考えられる。本研究成果は、学術論文としてまとめ、投稿準備中である。

（研究成果 2）研究成果 1 に記載したように、*BMCC1* は DNA 損傷を受けた細胞において E2F1 依存的な転写制御によって発現誘導される。そこで *BMCC1* の発現誘導に ATM のリン酸化が関わっているかについて検討した。シスプラチン処理によってミトコンドリア経路の細胞死を誘導した SK-N-AS 細胞について ATM 阻害剤存在下で培養し継続的にサンプリングを行った後、ウエスタンブロット法を用いて *BMCC1* の発現誘導について調べた。その結果、ATM 阻害剤によって ATM のリン酸化が抑制された細胞において、ATM による E2F1 のリン酸化および E2F1 の発現誘導の減弱が認められ、それに伴って DNA 損傷を受けた細胞で生じる E2F1 依存的な *BMCC1* の発現誘導が転写レベルで観察されなくなることを見出した。実際に、ルシフェラーゼアッセイ法を用いて *BMCC1* プロモーターの転写活性を調べたところ、シスプラチン処理 2 時間後に観察される *BMCC1* プロモーターの活性化が、ATM 阻害剤で処理した細胞では全く認められなかった。以上の結果より、シスプラチン処理によってミトコンドリア経路の細胞死を誘導し

た神経芽腫細胞における BMCC1 の速やかな蓄積は、ATM-E2F1 依存的な転写制御によることを明らかにした (図 1)。さらに、E2F1 のノックダウンによって DNA 損傷後の BMCC1 の発現亢進が見られない細胞では、ATM および H2AX のリン酸化を指標とした DNA 損傷応答が観察できなくなること、すなわち BMCC1 の発現が DNA 損傷応答を促進してゲノムの安定維持に寄与することが明らかとなった。本研究成果は、責任著者として BMC Cancer 誌に報告した (Islam and Takano *et al.*, 2019)。

( 図 1 ) Islam and Takano *et al.*, *BMC Cancer*, 2019



## 文献

- ( 1 ) Machida *et al.*, *Oncogene*, 2006
- ( 2 ) Tatsumi *et al.*, *Cell Death Dis*, 2015
- ( 3 ) Islam and Tatsumi *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2016
- ( 4 ) Salameh *et al.*, *PNAS*, 2015
- ( 5 ) Harms *et al.*, *Cancer Res*, 2015
- ( 6 ) Yu *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab*, 2015
- ( 7 ) Sausen *et al.*, *Nat Genet*, 2013
- ( 8 ) Pugh *et al.*, *Nat Genet*, 2013
- ( 9 ) Valentijn *et al.*, *Nat Genet*, 2015
- ( 10 ) Ohira *et al.*, *Cancer Sci*, 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Islam Mohammad Sazzadul, Takano Ryo, Yokochi Tomoki, Akter Jesmin, Nakamura Yohko, Nakagawara Akira, Tatsumi Yasutoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Programmed expression of pro-apoptotic BMCC1 during apoptosis, triggered by DNA damage in neuroblastoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-019-5772-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 巽康年、米本司、鴨田博人、塚西敏則、石井猛、大平美紀、永瀬浩喜、岩田慎太郎
2. 発表標題 小児骨肉腫における肺転移発生関連genomic markerの同定
3. 学会等名 第27回 日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森祐輔、早田浩明、滝口伸浩、鍋谷圭宏、竹内彩夏、巽康年、尾崎俊文、下里修
2. 発表標題 PTPRKによるがん幹細胞マーカーCD133の脱リン酸化を介した大腸がん進展の抑制
3. 学会等名 第27回 日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田慎太郎、米本司、鴨田博人、塚西敏則、石井猛、大平美紀、永瀬浩喜、巽康年
2. 発表標題 小児骨肉腫における肺転移発生関連genomic markerの同定
3. 学会等名 第51回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 巽康年、下里修、筆宝義隆、横井左奈、丸喜明、清宮淳、滝口伸浩、伊丹真紀子、山口武人、永瀬浩喜
2. 発表標題 千葉県がんセンター・バイオバンクの取り組みについて
3. 学会等名 第4回クリニカルバイオバンク学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 巽康年、米本司、宮冬樹、角田達彦、鴨田博人、石井猛、大平美紀、永瀬浩喜、下里修、岩田慎太郎
2. 発表標題 小児骨肉腫における肺転移発生に関連するゲノム異常
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森祐輔、巽康年、下里修
2. 発表標題 Cancer stem cell marker CD133 suppresses cell death of colon cancer cells induced by serum deficiency.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森祐輔、竹内彩夏、巽康年、下里修
2. 発表標題 がん幹細胞マーカー CD133 は血清欠乏状態による細胞死を抑制する
3. 学会等名 第16回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平美紀、上條岳彦、瀧本哲也、中澤温子、松本公一、菱木知郎、牛島俊和、中村洋子、巽康年、永瀬浩喜、田尻達郎、中川原章、JCCG JNBSG
2. 発表標題 ゲノム・エピゲノム異常を用いた神経芽腫の新規リスク分類-JCCGJNBSG高リスク臨床試験登録例の解析
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 巽康年、岩田慎太郎、宮冬樹、角田達彦、米本司、鴨田 博人、石井猛、大平美紀、永瀬浩喜
2. 発表標題 肺転移を伴う小児骨肉腫症例に特徴的なゲノム異常の同定
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村洋子、巽康年、奥村和弘、高取敦志、丸喜明、横井左奈、大平美紀、鍋谷圭宏、深沢賢、片山稔、三上春夫、永瀬浩喜
2. 発表標題 前向きコホート研究によるがんの高リスク群でのアミノ酸変化を伴う 多型の解析
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 巽康年、下里修、中村洋子、ジェイソンリン、滝口伸浩、三上春夫、永瀬浩喜
2. 発表標題 胃癌のゲノム研究の最前線とJMICC研究から同定した新規ARID2遺伝子SNPの胃癌との関連について
3. 学会等名 第28回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 巽康年、大平美紀、米本司、宮冬樹、角田達彦、鴨田博人、石井猛、永瀬浩喜、下里修、岩田慎太郎
2. 発表標題 日本人の小児骨肉腫の肺転移発生に関連するゲノム異常
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下里修、森祐輔、竹内彩夏、張旭東、永瀬浩喜、巽康年
2. 発表標題 A cancer stem cell marker CD133 suppresses colon cancer cell death triggered by serum deprivation.
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内彩夏、張旭東、巽康年、永瀬浩喜、下里修
2. 発表標題 大腸がんの薬剤感受性におけるヒストン脱メチル化酵素KDM2Bの機能解析
3. 学会等名 第28回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内彩夏、張旭東、巽康年、永瀬浩喜、下里修
2. 発表標題 Histone demethylase KDM2B epigenetically counteracts multidrug resistance in colon cancer cells.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内彩夏、張旭東、巽康年、永瀬浩喜、下里修
2. 発表標題 Histone demethylase KDM2B epigenetically regulates drug resistant-related genes in colon cancer cells
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----