

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目:基盤研究(B)

研究期間:2007-2008

課題番号:19390289

研究課題名(和文)

神経芽腫の新規ディペンデンス受容体の同定および機能解析と治療法開発への応用

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a novel human dependence receptor and its application to the therapeutic strategy.

研究代表者

中川原 章(NAKAGAWARA AKIRA)

千葉県がんセンター(研究所)・研究局・研究局長

研究者番号: 50117181

研究成果の概要:

独自に作製した神経芽腫 cDNA library から同定した新規依存性受容体 UNC5D について、機能を解析した。その結果、UNC5D は NGF 欠乏による細胞死 (プログラム細胞死) や DNA 損傷時に活性化される p53 によって発現が誘導され、カスパーゼによって切断された細胞内断片は核へ移行し、pro-apoptotic なターゲット遺伝子の発現を誘導した。神経芽腫の自然退縮を促進する重要な分子機構と思われた。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
20年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・小児科学

キーワード:依存性受容体、Unc5H、細胞死、自然退縮、神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫自然退縮の分子機構を解明することを目的として、手術摘出組織から作製した cDNA library の中から大量の遺伝子を抽出し、予後良好な神経芽腫において高発現する新規ヒト UNC5D 遺伝子を同定した。しかし、その機能と意義については全く未知であった。

2. 研究の目的

UNC5D 遺伝子の機能およびその神経芽腫自然退縮における意義について、分子生物学的

機能を明らかにする。

3. 研究の方法

我々がクローニングしたヒト UNC5D cDNA を用いて、神経芽腫細胞株およびその他の腫瘍の細胞株に遺伝子を発現させるか、あるいはその発現を siRNA でノックダウンして、細胞レベルでの機能を解析する。また、ノックアウトマウスを作製し、in vivo における機能を明らかにする。

4. 研究成果

UNC5 family の中で、唯一 UNC5D のみが予後良好な神経芽腫において高発現を示し、良好な予後と有意に関連した。また、そのリガンドである Netrin-1 の発現は腫瘍内では極めて低く、免疫染色では間質の極く一部の細胞のみが陽性であった。この所見は、自然退縮する神経芽腫における TrkA と NGF の発現パターンとほぼ同じであり、Netrin-1 は NGF 同様に腫瘍内では欠乏状態にあるものと思われた。また、NGF 欠乏によるプログラム細胞死の際に、UNC5D 発現のみが誘導され、他のファミリーメンバーは誘導されなかった。次に、UNC5D を細胞に強制発現させたところ、細胞死が誘導され、その際に細胞内ドメインがカスパーゼによって切断された。その切断フラグメントは核へ移行し、アポトーシスを誘導する遺伝子群の発現を誘導することが明らかになった。さらに、Unc5H4 (マウス UNC5D 遺伝子) ノックアウトを作製したところ、交感神経節細胞の NGF 欠乏によるプログラム細胞死が抑制された。

我々はこれまでに、UNC5D 遺伝子発現は p53 によって直接制御されていることを報告したが、今回の知見により、神経芽腫腫瘍組織においては、Netrin-1 が相対的欠乏状態にあり、UNC5D は細胞死を増強する重要な役割を担っていることが示唆された。

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 38 件)

- ① Delloye-Bourgeois C, Nakagawara A (15 人中 8 番目), et al. Rousseau R, Combaret V, Puisieux A, Valteau-Couanet D, Bénard J, Bernet A, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J. Exp. Med.* 206:833-47, 2009, 査読有
- ② Ambros PF, Nakagawara A (13 人中 6 番目), et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: Report from the international neuroblastoma risk grouping (INRG) biology committee. *Br. J. Cancer* 100:1471-1482, 2009, 査読有
- ③ Miyake I, Nakagawara A (4 人中 3 番目), et al. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 28:662-673, 2009, 査読有
- ④ Yu M, Nakamura Y (13 人中 9 番目), Nakagawara A (13 人中 13 番目), et al. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Int. J. Oncol.* 34:931-938, 2008, 査読有
- ⑤ Fujita T, Nakagawara A (7 人中 6 番目), et al. Clinicopathological relevance of UbcH10 in breast cancer. *Cancer Sci.* 2008 (Epub ahead of print), 査読有
- ⑥ Honda S, Nakagawara A (11 人中 8 番目), et al. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 99:1891-1899, 2008, 査読有
- ⑦ Ikematsu S, Nakagawara A (7 人中 2 番目), Nakamura Y (7 人中 3 番目), et al. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci.* 99:2070-2074, 2008, 査読有
- ⑧ Chen Y, Nakagawara A (14 人中 11 番目), et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455:971-974, 2008, 査読有
- ⑨ Munirajan AK, Nakagawara A (10 人中 10 番目), et al. KIF1B β functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 283:24426-24434, 2008, 査読有
- ⑩ Ando K, Nakamura Y (11 人中 7 番目), Nakagawara A (11 人中 11 番目), et al. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int. J. Cancer* 123:2087-2094, 2008, 査読有
- ⑪ Hossain MS, Nakagawara A (8 人中 8 番目), et al. N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma. *Oncogene* 27:6075-6082, 2008, 査読有
- ⑫ Nakagawa H, Nakagawara A (13 人中 12 番目), et al. Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cancer Lett.* 270:295-301, 2008, 査読有
- ⑬ Inoue K, Nakagawara A (7 人中 6 番目),

- et al. NFB1/MDC1 stabilizes oncogenic MDM2 to contribute to cell fate determination in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371:829-833, 2008, 査読有
- ⑭ Koida N, Nakagawara A (10 人中 10 番目), et al. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283:8555-8563, 2008, 査読有
- ⑮ Abe M, Nakagawara A (7 人中 6 番目), et al. Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology* 74:50-60, 2008, 査読有
- ⑯ Wang H, Nakagawara A (7 人中 7 番目), et al. A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370:594-598, 2008, 査読有
- ⑰ Honda S, Nakagawara A (13 人中 10 番目), et al. The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int. J. Cancer* 123:1117-1125, 2008, 査読有
- ⑱ Ichikawa T, Nakagawara A (5 人中 5 番目), et al. Δ Np63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369:994-1000, 2008, 査読有
- ⑲ Li Y, Nakagawara A (6 人中 6 番目), et al. A novel HECT-type E3 ubiquitin protein ligase NEDL1 enhances the p53-mediated apoptotic cell death in its catalytic activity-independent manner. *Oncogene* 27:3700-3709, 2008, 査読有
- ⑳ Okoshi R, Nakagawara A (10 人中 9 番目), et al. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J. Biol. Chem.* 283:3979-3987, 2008, 査読有
- ㉑ Bu Y, Nakagawara A (7 人中 6 番目), et al. Spl-mediated transcriptional regulation of NFB1/MDC1 plays a critical role in DNA damage response pathway. *Genes to Cells* 13:53-66, 2008, 査読有
- ㉒ Kurata K, Nakagawara A (6 人中 5 番目), et al. Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells. *Oncogene* 27:741-754, 2008, 査読有
- ㉓ Arai H, Nakamura Y (8 人中 4 番目), Nakagawara A (8 人中 8 番目), et al. ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma induced in response to retinoic acid. *Oncol. Rep.* 19:1381-1388, 2008, 査読有
- ㉔ Yoshida K, Nakagawara A (10 人中 10 番目), et al. ATM-dependent nuclear accumulation of IKK- α plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 27:1183-1188, 2008, 査読有
- ㉕ Tomioka N, Nakamura Y (16 人中 7 番目), Nakagawara A (16 人中 16 番目), et al. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene* 27:441-449, 2008, 査読有
- ㉖ Ichikawa T, Nakagawara A (5 人中 5 番目), et al. TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene* 27:409-420, 2008, 査読有
- ㉗ Iwao-Koizumi K, Nakamura Y (7 人中 3 番目), Nakagawara A (7 人中 6 番目), et al. A novel technique for measuring variations in DNA copy-number: competitive genomic polymerase chain reaction. *BMC Genomics* 8:206, 2007, 査読有
- ㉘ Nakanishi M, Nakagawara A (9 人中 9 番目), et al. NFB1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 282:22993-23004, 2007, 査読有
- ㉙ Furuya K, Nakagawara A (9 人中 9 番目), et al. Stabilization of p73 by nuclear I κ B kinase- α mediates cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282:18365-18378, 2007, 査読有
- ㉚ Takahashi M, Nakagawara A (10 人中 10 番目), et al. DFF45/ICAD restores cisplatin-induced nuclear fragmentation but not DNA cleavage in

- DFF45-deficient neuroblastoma cells. *Oncogene* 26:5669-5673, 2007, 査読有
- ③① Nimura Y, Nakagawara A(12人中9番目), et al. Silencing Ku80 using small interfering RNA enhanced radiation sensitivity in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 30:1477-1484, 2007, 査読有
- ③② Nakanishi H, Nakamura Y(6人中3番目), Nakagawara A(6人中6番目), et al. Purification of human primary neuroblastomas by magnetic beads and their in vitro culture. *Oncol. Rep.* 17:1315-1320, 2007, 査読有
- ③③ Nakamura Y(6人中1番目), Nakagawara A(6人中6番目), et al. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:892-898, 2007, 査読有
- ③④ Yamamoto H, Nakagawara A(8人中8番目), et al. Oxidative stress induces p53-dependent apoptosis in hepatoblastoma cell through its nuclear translocation. *Genes to Cells* 12:461-471, 2007, 査読有
- ③⑤ Antonelli A, Nakagawara A(6人中3番目), et al. Tumor suppressor proteins are differentially affected in human ependyoblastoma and medulloblastoma cells exposed to nerve growth factor. *Cancer Investigation* 25:94-101, 2007, 査読有
- ③⑥ Kaneko S, Nakamura Y(6人中3番目), Nakagawara A(6人中5番目), et al. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 133:185-192, 2007, 査読有
- ③⑦ Tomizawa M, Nakagawara A(13人中13番目), et al. Reciprocal expression of CCAAT/enhancer binding proteins α and β in hepatoblastomas and its prognostic significance. *Oncol. Rep.* 17:341-344, 2007, 査読有
- ③⑧ Abe M, Nakagawara A(6人中3番目), et al. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett.* 247:253-258, 2007, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川原 章 (NAKAGAWARA AKIRA)

千葉県がんセンター (研究所)・研究局・局長

研究者番号： 50117181

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中村 洋子 (NAKAMURA YOHIKO)

千葉県がんセンター (研究所)・研究局・主席研究員

研究者番号： 60260254