

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591271

研究課題名(和文)

Dependence receptor UNC5H4 経路による神経芽腫細胞死解析

研究課題名(英文)

Functional analysis of cell death in neuroblastoma by dependence receptor, UNC5H4

研究代表者

中村 洋子 (NAKAMURA YOHKO)

千葉県がんセンター(研究所)・研究局生化学研究部・主席研究員

研究者番号：60260254

研究成果の概要：

ヒト神経芽腫 cDNA ライブラリーから予後良好群と予後不良群の間で発現に差の認められる遺伝子を大量に同定したところ、予後良好群において発現の高い遺伝子として依存性受容体 *UNC5H4* が同定された。そこで *UNC5H4* の機能解析を行ったところ、*UNC5H4* は p53 の標的遺伝子でありアポトーシス誘導能を持つことが判った。また、そのアポトーシス誘導能は、UNC5 ファミリーのリガンドである netrin-1 によって抑制されることが明らかとなった。従って、*UNC5H4* は神経芽腫の細胞死において重要な役割を果たすことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
21 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：UNC5H4、神経芽腫細胞、p53、Dependence receptor、細胞死

1. 研究開始当初の背景

これまで当研究室において、ヒト神経芽腫 cDNA ライブラリーから予後良好群と予後不良群の間で発現に差の認められる遺伝子を

大量に同定してきた。その中で予後良好群において発現の高い遺伝子として UNC5H ファミリーの新規遺伝子 *UNC5H4(UNC5D)* が同定された。UNC5H4 は Dependence receptor の一つで

ある。また、Dependence receptor とは、リガンドに依存して二つの異なる signal transduction を誘導するレセプターのことである。*UNC5H4* は神経芽腫の予後良好群で発現の高い遺伝子として同定されたことから、神経芽腫の細胞死に関係した遺伝子である可能性は非常に高いが、その機能 (*UNC5H4* のリガンドは何か、p53 の標的遺伝子であるか、p53 の標的遺伝子であるなら p53 を介した細胞死のメカニズムは何か等) は未だに明らかではない。

2. 研究の目的

背景で記述したように、*UNC5H4* の機能、例えば、*UNC5H4* のリガンドは何か、p53 の標的遺伝子であるか、p53 の標的遺伝子であるなら p53 を介した細胞死のメカニズムは何か等は未だに明らかではない。他の *UNC5H* と同様に、*UNC5H4* が p53 の標的遺伝子として機能する可能性やカススペースによって活性化されることで細胞死を誘導する可能性はあり、細胞の生死をスイッチングする重要な受容体であることが予想される。自然退縮する神経芽腫において発現が高く、悪性度の高い神経芽腫では発現が抑制されている可能性から、がんの自然退縮ならびに治癒のメカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが期待される。従って、悪性度の高い神経芽腫に *UNC5H4* を発現させて、そのがん細胞に細胞死を誘導させることによって新しい治療法を開発することも可能である。このような経緯から神経芽腫の細胞死における *UNC5H4* の機能解析を行うことを目的とした。さらに、p53 の status による *UNC5H4* の機能を解析した。

3. 研究の方法

(1) 108 症例の神経芽腫を対象に Real-time

PCR 法によって *UNC5H4* の発現解析を行った。統計解析により予後との相関を検討した。

- (2) U20S (p53 野生型) 細胞ならびに H1299 (p53 変異型) 細胞にアドリアマイシンを処理し、PCR 法およびウエスタン法により *UNC5H4* の発現解析を行った。
- (3) U20S 細胞に *UNC5H4* siRNA をトランスフェクトし、アドリアマイシン処理によってアポトーシスが抑制されるか否か検討を行った。
- (4) SH- SY5Y (p53 野生型) 細胞および SK-N-AS (p53 変異型) 細胞に *UNC5H4* を過剰発現させ、colony formation assay を行い細胞増殖能を検討した。
- (5) 手術または生検で摘出された新鮮がん組織から細胞を分画し以下のアッセイを行った。分画した細胞に神経成長因子 NGF を加えた後、*UNC5* ファミリーのリガンドである netrin-1 を添加した条件のもと、NGF を除去することによってアポトーシス誘導能を検討した。

4. 研究成果

- (1) 神経芽腫の予後良好群 (16 症例) および予後不良群 (16 症例) において *UNC5H4* の発現を RT-PCR 法により検討した結果、予後良好群で *UNC5H4* の発現は高いことが判った。また、108 症例の神経芽腫を対象に Real-time PCR 法によって *UNC5H4* の発現解析を行ったところ、*UNC5H4* の高発現と良好な予後との相関が認められた。
- (2) U20S 細胞をアドリアマイシン処理すると *UNC5H4* の発現は増加したが、H1299 細胞では *UNC5H4* の発現に変化は認められなかった。p53 の status による可能性が示唆された。
- (3) *UNC5H4* siRNA を用いたアッセイ系で、

U2OS 細胞に Control siRNA をトランスフェクトした群の sub G0/G1 に比べ、UNC5H4 siRNA をトランスフェクトした群の Sub G0/G1 の比率は、減少していることが判った。すなわち、UNC5H4 siRNA によりアポトーシス誘導能が抑制されることが示唆された。

- (4) Colony formation assay にて、SH-SY5Y 細胞に UNC5H4 を過剰発現させると細胞増殖は抑制されたが、SK-N-AS 細胞では、細胞の増殖抑制は認められなかった。UNC5H4 の細胞死誘導は p53 に関与している可能性が示唆された。
- (5) 手術または生検で摘出された新鮮がん組織から分画した細胞によるアッセイの結果、netrin-1 未添加に比べ、netrin-1 添加条件下では、アポトーシスの誘導が減少していることが判った。従って、UNC5H4 の細胞死誘導は netrin-1 により制御される可能性が示唆された。
- (6) UNC5H4 は p53 経路を介した細胞の生死をスイッチングする重要な受容体である可能性が示唆された。さらに、UNC5H4 は予後良好な神経芽腫において発現が高く、悪性度の高い神経芽腫では発現が抑制されていたことから、神経芽腫の自然退縮機構において重要な役割を果たし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 10 件)

- ① Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y, Ozaki T, Isogai E, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, Nakagawara A. 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, 2009. 査読有.

- ② Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Ohira M, Shinjo M, Kishida S, Kadomatsu K. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci.* 99:2070-2074, 2008. 査読有.

- ③ Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamiyo T, Murakami Y, Nakagawara A. 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.

- ④ Arai H, Ozaki T, Niizuma H, Nakamura Y, Ohira M, Takano K, Matsumoto M, Nakagawara A. 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.

- ⑤ Wang H, Ozaki T, Shamim Hossain M, Nakamura Y, Kamiyo T, Xue X, Nakagawara A. 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.

- ⑥ Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein

BG, Nakagawara A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*, 27:441-449, 2008. 査読有.

- ⑦ Iwao-Koizumi K, Maekawa K, Nakamura Y, Saito S, Kawamoto S, Nakagawara A, Kato K. A novel technique for measuring variations in DNA copy-number: competitive genomic polymerase chain reaction. *BMC Genomics.*, 8:206, 2007. 査読有.
- ⑧ Nakanishi H, Ozaki T, Nakamura Y, Hashizume K, Iwanaka T, Nakagawara A. Purification of human primary neuroblastomas by magnetic beads and their in vitro culture. *Oncol. Rep.*, 17:1315-1520, 2007. 査読有.
- ⑨ Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, Ohira M, Kamiyo T, Nakagawara A. Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochem. Biophys.* 2007. 査読有.
- ⑩ Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, Nakagawara A, Kaneko M. 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.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Nakamura Yohko. Molecular diagnosis of neuroblastoma: the nation-wide on-line report system. 第66回日本癌学会学術総

会, 2007. 10. 3, 横浜.

- ② 中村洋子, p53により発現誘導される新しい神経芽腫予後関連遺伝子 UNC5H4. 第23回日本小児がん学会学術集会, 2007. 12. 16, 仙台.
- ③ Nakamura Yohko, Molecular Diagnosis of Neuroblastoma: the Nation-wide On-line Report System in Japan. *Advances in Neuroblastoma Research 2008*, 2008. 5. 23, Makuhari Messe International Conference Hall, Chiba, Japan.
- ④ Ohira M., Nakamura Y. et al., 第17番染色体増加領域に座位し、進行神経芽腫に高発現する新規 non-coding RNA の同定, 第67回日本癌学会学術総会, 2008. 10. 28, 名古屋国際会議場.
- ⑤ 大平美紀, 中村洋子, 他, 進行神経芽腫で高発現する新規 17番染色体 non-coding RNA 遺伝子の同定, 第24回日本小児がん学会, 2008. 11. 16, 幕張メッセ国際会議場.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 洋子 (NAKAMURA YOYUKO)

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

上條 岳彦 (KAMIJO TAKEHIKO)

千葉県がんセンター (研究所)・研究局・
部長

研究者番号 : 90262708

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