

平成22年 6月 16日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：平成19年～平成21年
課題番号：19790274
研究課題名 (和文) 神経細胞Stemnessを制御する新規がん幹細胞マーカーの同定と機能解析
研究課題名 (英文) Identification and functional analysis of novel stem cell markers in neuronal-related cells
研究代表者
竹信 尚典 (TAKENOBU HISANORI)
千葉県がんセンター(研究所) 発がん制御研究部 研究員
研究者番号：60392247

研究成果の概要 (和文)：

神経芽腫に発現している幹細胞マーカーCD133は、細胞の分化の抑制、細胞増殖の促進、足場非依存的な増殖および、造腫瘍能を更新させる機能を持つ事が明らかになった。また、CD133は神経栄養因子の受容体分子RETの発現抑制を介して、細胞の分化を抑制していることを示した。この結果から、CD133が神経芽腫に対する分化誘導療法の新たな標的となりうる事が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We found that CD133 was expressed in several neuroblastoma (NB) cell lines/tumor samples. Intriguingly, CD133 repressed NB cell differentiation, accelerated cell proliferation, anchorage-independent colony formation, and *in vivo* tumor formation of NB cells. CD133-related differentiation suppression in NB was in part dependent on neurotrophic receptor RET tyrosine kinase regulation. RET transcription was suppressed by CD133 in NB cells and GDNF treatment failed to induce RET in CD133-expressing cells. CD133 in cancer cells and our findings may be applied to improve differentiation induction therapy for NB patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,100,000	0	1,100,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	570,000	3,570,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：幹細胞, 発がん, 分化

1. 研究開始当初の背景

正常組織の発生および再生組織幹細胞によるものであるように、がんにおいても発がんや再発、転移には、“がん幹細胞”が必要である証拠が、近年多数報告された。がん幹細胞の持つ性質は、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。

がん幹細胞の分取には、特異的なマーカータンパク質が必須である。神経の幹細胞マーカーとして報告の有る **CD133** は、脳腫瘍においては造腫瘍能の高い細胞に特異的に発現していることから、がん幹細胞のマーカーとして有用であると考えられる。**CD133** の発がんや幹細胞に関わる機能は、全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

神経の幹細胞マーカーとして知られている **CD133** は、神経由来のがんである神経芽腫において、発がん機能に関わっている可能性が高い。そこで、

- (1) 神経芽腫における **CD133** の発現様式を明らかにする
- (2) がんにおける **CD133** の発現メカニズムを明らかにし、がん幹細胞の発生に関わる機構を解明する。
- (3) **CD133** 分子の幹細胞性に関わる機能を明らかにすることで、**CD133** を標的とした新規治療法の可能性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 神経芽腫における **CD133** の発現を調べるため、神経芽腫の各細胞株の RNA と、予後の明らかな臨床検体由来の RNA を用いて、発現量を解析する。
- (2) **CD133** の発現を調節するゲノム DNA 領域を解析し、**CD133** の発現を制御する分子を明らかにする。
- (3) **CD133** を神経芽腫細胞に高発現または発現抑制することで、**CD133** ががん細胞の造腫瘍性や増殖に関わる機能を明らかにする。また、幹細胞生徒の関係を明らかにするため、細胞の分化への影響と、分子メカニズムを検討する。

4. 研究成果

(1) 神経および脳腫瘍の幹細胞マーカーである **CD133** の発現量は、神経芽腫の悪性な予後と相関する遺伝子 **MYCN** の増幅と相関して増加することを見出した。

(2) そこで、**CD133** の Exon2 を検索したところ、3箇所 **MYCN** 結合配列が存在していることを確認した。そこで、**MYCN** の免疫沈降実験によって、**MYCN** は **CD133** の Exon2 上流に結合しており、**MYCN** の過剰発現が **CD133** の転写を促進することを確認した。

(3) 神経芽腫細胞株を用いて **CD133** を高発現または発現抑制したところ、**CD133** 発現は細胞増殖速度、軟寒天中でのコロニー形成、ヌードマウスの腫瘍形成能のそれぞれに対し、促進的に働いていることが明らかとなった。さらに、神経芽腫のがん幹細胞の増殖を促すスフェア(細胞塊)培養を用いることで、**CD133** 高発現な神経芽腫が濃縮出来ることを明らかにした。また、**CD133** を過剰発現するとスフェア内での細胞の生存率の上昇が見られ、**CD133** はがん幹細胞の維持に重要な役割を持つことが示唆された。また、神経芽腫において **CD133** の発現を抑制すると神経芽腫突起の伸長が誘導され、逆に **CD133** 低発現の細胞で **CD133** を高発現させると神経栄養因子 **GDNF** の受容体 **RET** の転写が抑制され、**GDNF** 依存的な細胞分化を著明に抑制することが明らかとなった。これらのことから **CD133** が受容体 **RET** を介して神経芽腫の **Stemness** の維持に関する重要な役割を担っていることが示された。一方で **CD133** の制御には神経芽腫の **MYCN** での転写誘導が存在することが明らかとなった。このことから、**CD133** の転写機構をターゲットにすることで、神経芽腫の分化を促進する、新たな治療法の可能性が示唆された。

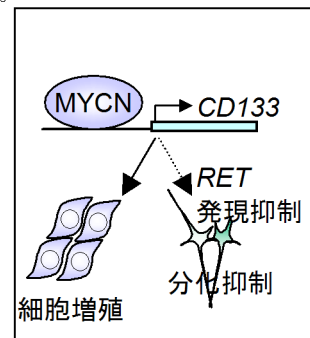


図. 本研究の成果まとめ

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 5 件)

1. Hossain MS, Ozaki T, Wang H, Nakagawa A, Takenobu H, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara

- A. N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma. *Oncogene*. **2008**, 27(46):6075-6082
2. Komatsu S, Takenobu H, Ozaki T, Ando K, Koida N, Suenaga Y, Ichikawa T, Hishiki T, Chiba T, Iwama A, Yoshida H, Ohnuma N, Nakagawara A, Kamijo T. Plk1 regulates liver tumor cell death by phosphorylation of TAp63. *Oncogene*. **2009**, 28(41):3631-3941
 3. Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamijo T. Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene*. **2010**, 29(18):2681-2690
 4. Iwata S, Takenobu H, Kageyama H, Koseki H, Ishii T, Nakazawa A, Tatezaki SI, Nakagawara A, Kamijo T. Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma. *Cancer Sci*. **2010** (Epub ahead of print)
 5. Shi Y, Takenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Ling LJ, Kamijo T. HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer*. **2010** (in press)
- [学会発表] (計 10 件)
1. 竹信尚典, 下里修, 木村昌樹, 中川原章, 上條岳彦, Effects of CD133 on stemness-related characters of neuroblastoma cells, 第66回 日本癌学会学術総会, 2007年10月, 横浜
 2. 竹信尚典, 下里修, 木村昌樹, 大平美紀, 好田忠行, 中川原章, 上條岳彦, 幹細胞マーカーCD133が神経芽腫のstemnessに及ぼす役割, 第23回 日本小児がん学会学術集会, 2007年12月, 仙台
 3. 竹信尚典, 下里修, 木村昌樹, 落合秀匡, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, Stem cell marker CD133 is a novel MYCN target and regulates aggressiveness in neuroblastoma, 2008 国際神経芽腫学会 (ANR 2008) 2008年5月, 千葉
 4. 竹信尚典, 下里修, 落合秀匡, 木村昌樹,
- 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, MYCN target gene CD133 regulates proliferation and stemness of neuroblastoma, 第67回 日本癌学会学術総会, 2009年10月, 名古屋
 5. 竹信尚典, 下里修, 落合秀匡, 木村昌樹, 松下せりな, 山口陽子, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, MYCNの新規転写ターゲット CD133は神経芽腫の増殖と幹細胞性を制御する, 第24回 日本小児がん学会総会, 2008年11月, 千葉
 6. 竹信尚典, 下里修, 落合秀匡, 山口陽子, 松下せりな, 木村昌樹, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, MYCNは幹細胞マーカーCD133の転写を制御する, 第31回 日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月, 神戸
 7. 竹信尚典, 下里修, 落合秀匡, 山口陽子, 松下せりな, 木村昌樹, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, MYCNの新規な標的遺伝子である CD133は神経芽腫の増殖と幹細胞性を制御する, 第104回 小児血液腫瘍懇話会, 2009年1月, 東京
 8. 竹信尚典, 下里修, 落合秀匡, 木村昌樹, 山口陽子, 松下せりな, 中島久美子, 中川原章, 上條岳彦, CD133 is epigenetically regulated and regulates differentiation via RET in neuroblastoma cells, 第68回 日本癌学会学術総会, 2009年10月, 横浜
 9. 竹信尚典, 下里修, 落合秀匡, 木村昌樹, 山口陽子, 松下せりな, 中島久美子, 中川原章, 上條岳彦, エピジェネティックな制御を受ける幹細胞マーカー CD133は RETの発現制御を介して神経芽腫の分化を制御する, 第25回 日本小児がん学会, 2009年11月, 浦安
 10. 竹信尚典, 下里修, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, 幹細胞マーカーCD133はRETの発現抑制を介して神経芽腫の分化を制御する, 第14回 神経芽腫研究会, 2010年3月, 名古屋
- [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

<http://www.chiba-cc.jp/inst/jp/project/011.html>

<http://www.chiba-cc.jp/inst/eng/project/011.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹信 尚典 (TAKENOBU HISANORI)

研究者番号：60392247