

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度
 課題番号：19790707
 研究課題名 (和文) 神経芽腫幹細胞の同定と Bcl-2 阻害剤および RA 誘導体による
 新規治療法の開発
 研究課題名 (英文) Identification of the cancer stem cells of neuroblastoma for
 development of a novel combination therapy against neuroblastoma with retinoic acids
 and Bcl-2 inhibitors
 研究代表者
 新妻 秀剛 (NIIZUMA HIDETAKA)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：30392252

研究成果の概要： 難治性小児固形腫瘍である神経芽腫に対する低毒性治療薬としてのレチノイン酸は、神経分化誘導・細胞増殖抑制・アポトーシス誘導といった作用を示す。この治療効果を増強する新規治療法を開発すべく各作用の分子機序を解析した。抗アポトーシス蛋白 Bcl-2 を阻害するとアポトーシスは増強し、分化誘導には PI3K-Akt 経路の活性化が重要である事が明らかとなった。またレチノイン酸による PI3K-Akt の活性化には細胞膜上の神経栄養因子受容体 Trk-B の誘導が関与している事が示唆され、分子標的療法の重要な標的分子の一つと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	500,000	0	500,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,100,000	180,000	1,280,000

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：神経芽腫、レチノイン酸、アポトーシス、分化誘導、Bcl-2、Akt、Trk-B

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経芽腫は頻度の高い小児悪性固形腫瘍である。年長児に発症する予後不良な一群は神経芽腫の約半数を占め、強力な集学的治療を行っても 5 年生存率はわずかに 20-30% 程度である。治療合併症や治療関連死も多く、新規治療法の開発が望まれている。

(2) 従来の抗癌剤に替わる毒性の低い神経芽腫治療薬の試みとしてレチノイン酸 (RA) がある。これまでに RA は多くの神経芽腫細胞に分化誘導・細胞増殖抑制作用を示す事が

報告されてきた。その分子機序はまだ十分に解析されておらず、これを解明する事はより有効な治療法の開発に重要と考えられた。

(3) RA が一部の神経芽腫にはアポトーシスを誘導する報告がある。我々はこの機序を解析し、抗アポトーシス蛋白 Bcl-2 の発現レベルが低い神経芽腫細胞でのみ RA によってアポトーシスが誘導される事を見出した。また、アポトーシスが起きない Bcl-2 高発現の細胞株でも、Bcl-2 阻害剤である HA14-1 と RA の共処理によってアポトーシスを誘導する事

ができた(Niizuma H et al. Oncogene 2006; 25:5046-55)。HA14-1 は毒性が強く生体への投与は難しいと考えられたが、2005年に新規 Bcl-2 阻害剤 ABT-737 が報告され、動物実験にてその安全性が確認された。この ABT-737 のヒト腫瘍への応用が期待されている。

(4) 一方、神経芽腫における再発の原因として Cancer Stem Cell (CSC) の存在が仮定されている。治療抵抗性の CSC が残存して再発するという説である。乳癌などでは CSC に Bcl-2 が高発現との報告があり、CSC の不死性を司る分子の一つが Bcl-2 である可能性がある。

2. 研究の目的

RA によるアポトーシス誘導の詳細な分子機序、ならびに RA のアポトーシス以外の抗腫瘍効果である分化誘導、細胞増殖抑制作用の分子機序を解析する

3. 研究の方法

Bcl-2 高発現の神経芽腫細胞株 RTBM1 ならびに Bcl-2 低発現で RA によりアポトーシスが誘導されやすい神経芽腫細胞株 CHP-134、NB-39-nu を用い、all-trans-retinoic acid (ATRA) 単独処理によるアポトーシス誘導、分化誘導、細胞増殖抑制効果を評価するとともに、細胞内シグナル伝達経路の阻害剤等を用いて、その分子機序をウエスタンブロット法、RT-PCR 法などにより解析する。

4. 研究成果

(1) ATRA による抗腫瘍効果の詳細な分子機序解析のため、以下の如く分子生物学的解析を進めてきた。

アポトーシス誘導作用に関しては、抗アポトーシス蛋白 Bcl-2 の過剰な発現がアポトーシスを抑制している (ブレーキの役割) という事は明らかとなっていたが、ATRA 投与後にどのようなシグナルが活性化してアポトーシスを促進するのか (アクセルの役割) については全く解っておらず、これを明らかにすべく様々な細胞内シグナル伝達経路を解析する実験を行った。このようなシグナル伝達経路の候補として PI3K-Akt 経路や、3 種の MAP キナーゼ経路 (ERK, JNK, p38MAPK) がある。

4 種類の神経芽腫細胞株 (Bcl-2 高発現の RTBM1、ならびに Bcl-2 低発現の CHP134 と NB-39-nu) を ATRA で処理すると、RTBM1 では神経突起を伸ばし分化する反応が見られ、CHP134・NB-39-nu ではアポトーシス反応が誘導された (図 1)。これらの ATRA 処理後の細胞より蛋白質を抽出した。

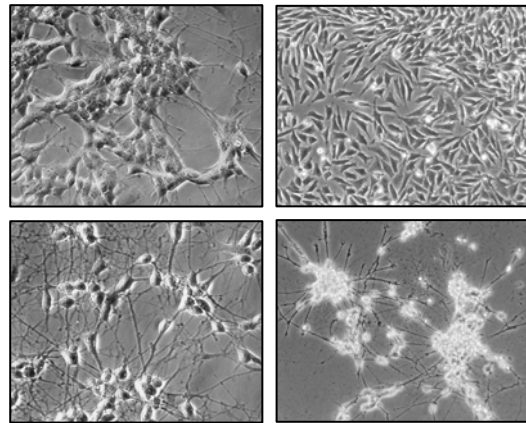


図 1 ATRA 処理の有無による RTBM1 細胞、CHP134 細胞の形態変化。(左上) RTBM1、ATRA 無し、(左下) RTBM1、ATRA 有り、(右上) CHP134、ATRA 無し、(右下) CHP134、ATRA 無し。RTBM1 細胞では ATRA による神経突起伸長反応が見られ、分化誘導を示唆する。CHP134 細胞では著明な細胞数減少と細胞浮遊が見られ、アポトーシス誘導を示唆する。いずれも培養 8 日目

(2) これらの ATRA 処理後の神経芽腫細胞から抽出した蛋白質サンプルを用い、上記 4 種類のシグナル伝達経路のリン酸化による活性化を、ウエスタンブロット法で解析した。すると、PI3K-Akt 経路の活性化を示唆するリン酸化 Akt が、RTBM1 のみで ATRA 処理により経時的に誘導されている事が明らかとなった。ERK は全ての細胞でリン酸化が誘導され、JNK は特に強くアポトーシスする CHP134 でリン酸化誘導が強かった。また p38MAPK はいずれの細胞でもリン酸化が検出されなかった (図 2)。

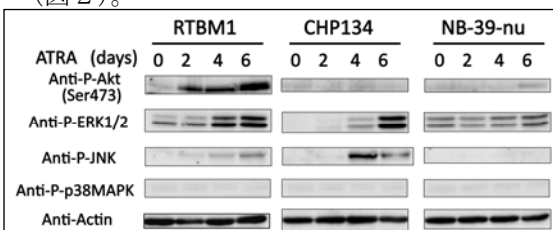
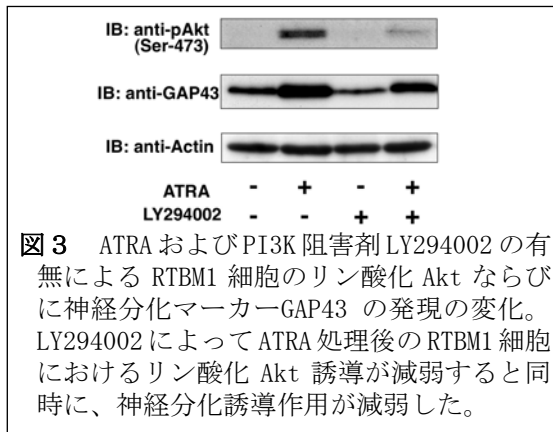


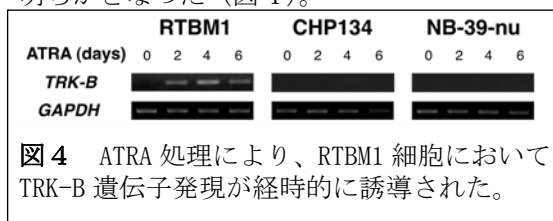
図 2 経時的な ATRA 処理後の各種シグナル伝達経路の活性化。各種シグナル経路のリン酸化蛋白に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により、各シグナルの活性化を解析した。

(3) この結果を受け、Akt、ERK、JNK 各種シグナル伝達経路のリン酸化阻害剤を用いて、ATRA 処理時に各シグナルを止めてその変化を解析する実験を行った。ERK 経路阻害剤 (U0126) ならびに JNK 経路阻害剤 (SP600125)

は ATRA によるアポトーシス誘導や分化誘導の有無に影響を及ぼさなかった。しかし PI3K-Akt 経路の阻害剤である LY294002 を ATRA 処理と同時に添加すると、本来 ATRA により分化誘導される RTBM1 細胞においてその分化反応が減弱する事が見出された。この事は、形態学的な神経突起伸長の減弱のみならず、ウエスタンブロットにより神経分化マーカーである GAP43 蛋白の発現が減弱している事でも確認された (図 3)。



(4) ATRA 処理によって経時的に PI3K-Akt 経路の活性化が起こる現象が観察されたが、この経路の活性化のスタート地点の候補として、細胞膜表面の様々なチロシンキナーゼ受容体 (RTK) 遺伝子の誘導が考えられた。このため、上記細胞株を ATRA 処理した後に mRNA を抽出し、RT-PCR 法によって様々な RTK 遺伝子の発現の変化を解析した。すると、予後不良な神経芽腫に発現が高い事で知られる TRK-B 遺伝子の発現が、分化する細胞株 RTBM1 のみで、分化に先行して誘導されている事が明らかとなった (図 4)。



(考察) 以上の結果から、神経芽腫細胞において RA が起こす抗腫瘍効果のうち、神経分化誘導作用には PI3K-Akt 経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、この際に PI3K-Akt 経路の活性化のスタート地点として、神経栄養因子受容体である TRK-B の発現誘導が関与する可能性が示唆された。TRK-B は神経細胞特異的な RTK であり、その高発現は神経芽腫における予後不良因子として確立している遺伝子である。またこの遺伝子産物は細胞膜表面に発現する受容

体蛋白であり、分子標的療法のターゲットとしても魅力的であると考えられた。

また、RA によるアポトーシス誘導作用に関しては、神経芽腫細胞内における抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 の発現量が、アポトーシス誘導の有無を規定する重要な要素である事を、我々は以前に明らかにした (Niizuma *et al.* *Oncogene* 2006;25:5046-55)。また、Bcl-2 が高発現でアポトーシス耐性の神経芽腫細胞においても、Bcl-2 阻害剤である HA14-1 を併用する事によって RA によるアポトーシスを誘導できる事を示した。この事は、低毒性である RA によって神経芽腫を治療する際に、Bcl-2 阻害療法を併用する事でその治療効果を飛躍的に高める事ができる可能性を秘めている。HA14-1 は生体に対する毒性が強く臨床応用が難しいと考えられたが、近年、新規の Bcl-2 阻害剤 ABT-737 が報告され、動物実験における安全性が示された。今後 ABT-737 が入手可能となったら、RA との併用によって Bcl-2 高発現の神経芽腫にアポトーシスを誘導できるか、また動物実験で高い腫瘍治療効果を示すかどうか、検討を重ねて行く計画である。

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 5 件)

① Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, 他 9 名
High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma.

International Journal of Oncology 2009; 34:931-938. 査読有

② Ogawa E, Okuyama R, Niizuma H, 他 3 名
Eosinophilic pustular folliculitis occurring after bone marrow transplantation in a child with aplastic anemia.

ActaDermato-Venereologica 2009;89:200-201. 査読有

③ Arai H, Ozaki T, Niizuma H, 他 5 名,
ERAP140/Nbl1a10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma and induced in response to retinoic acid.

Oncology Reports 2008;19:1381-1388. 査読有

④ Niizuma H, 他 5 名,

PTHrP-independent hypercalcemia with increased proinflammatory cytokines and bone resorption in two children with

CD19-negative precursor B acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer* 2007;49:990-993. 査読有

⑤ Nakamura Y, Ozaki T, Niizuma H, 他3名, Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;354:892-898. 査読有

[学会発表] (計2件)

① 新妻 秀剛 他, 22q11.2 領域のGermline deletionをベースに発症した乳児悪性ラビドイド腫瘍.
第24回日本小児がん学会 2008.11.15 千葉

② Niizuma H, 他, A Large-scale Analysis of *TRK-A* Expression and Neurotrophin Responsiveness in Primary Neuroblastomas. *13th Conference of Advances in Neuroblastoma Research* 2008.5.22 Chiba, Japan.

[図書] (計1件)

① Niizuma H and Nakagawara A. Jaypee Brothers Medical Publishers (New Delhi) Genetic and Molecular Biology of Pediatric Tumors. In: Gupta DK, Carachi R, editors. *Pediatric Oncology (Surgical and Medical Aspects.)* 2007. p.10-22.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新妻 秀剛 (NIIZUMA HIDETAKA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：30392252