

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17331

研究課題名(和文) 神経芽腫がん幹細胞マーカーALDH1A2によるがん微小環境の制御の解明

研究課題名(英文) The clarification of tumor microenvironment in neuroblastoma focused on aldehyde dehydrogenase 1A2

研究代表者

植村 優 (Uemura, Suguru)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40814348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに申請者らは、神経芽腫再発の起源であるがん幹細胞(CSC)に注目し、そのマーカーであるアルデヒド脱水素酵素(ALDH)の神経芽腫における働きを検討した。ALDH1A2アイソフォームは、神経芽腫CSCで高発現しており、神経芽腫細胞の増殖・分化を制御すると共に、その発現は患者予後と有意に相関することを明らかにした。本研究では、ALDH1A2によって分泌を制御される分子の同定を試みた。その結果、核酸代謝に関わる酵素nucleoside diphosphate kinase 1 (NME1)がALDH1A2を高発現した神経芽腫細胞からの分泌が著しく亢進していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫の再発はがん幹細胞(CSC)に由来すると考えられている。CSCマーカーであるアルデヒド脱水素酵素(ALDH)は、ヒトでは19のアイソフォームを有するが、その中でもALDH1A2は神経芽腫CSCにおいて発現が亢進し、その予後と関連する。本研究では、ALDH1A2を高発現した神経芽腫細胞からNME1という核酸代謝に関わる蛋白の分泌が亢進していることを明らかにした。血清NME1濃度は、MYC-N増幅神経芽腫患者で高く、患者予後と相関することが報告されており、神経芽腫再発のメカニズムに関わっていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that an isoform of aldehyde dehydrogenase (ALDH), ALDH1A2, was highly expressed in cancer stem cells (CSC) of neuroblastoma (NB), regulated their proliferation and differentiation, and its high expression was associated with the poor prognosis of NB patients. In the present study, we tried to identify the secreted molecules from ALDH1A2 overexpressed NB cells. Accordingly, the secretion of nucleoside diphosphate kinase 1 (NME1) was highly elevated in ALDH1A2 overexpressed NB cells.

研究分野：小児がん

キーワード：神経芽腫 ALDH がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高リスク神経芽腫はその半数以上が再発し、予後不良の転帰を辿る疾患である。全がん細胞のうち極少数を占める自己複製能および分化能を持つがん幹細胞(CSC)と分化度が異なり分裂能力の高い非がん幹細胞(non-CSC)で構成させる。がんの多様性は、CSC および分化度の異なる non-CSC によって形成されるが、がん細胞周囲の微小環境や治療ストレスも、がんの多様性獲得に寄与している。神経芽腫の再発は、治療に耐性を示して残存した CSC の活性化に由来すると考えられるが、それには CSC を取り巻く微小環境との相互作用が必須だと考えられる。

これまでに申請者らは、高リスク神経芽腫患者の予後改善を目指して、神経芽腫 CSC を単離し、肺がん、大腸がん、前立腺がんといった多くのがんにおける CSC マーカーであるアルデヒド脱水素酵素 ALDH の神経芽腫における働きを検討した。19 のヒト ALDH アイソフォーム中、ALDH1A2、ALDH1L1、ALDH3B2 の発現は、神経芽腫のスフェアおよびコロニー形成能と関連し、中でも ALDH1A2 の発現量は神経芽腫患者の予後およびヌードマウスでの腫瘍形成能と有意に相関した(Int J Oncol 46: 1089-1098, 2015)。そこで本研究では、ALDH1A2 によって分泌を制御される分子を同定し、ALDH1A2 によるがん微小環境の制御機構の解明を試みた。

2. 研究の目的

主に成人領域のがん種において ALDH アイソフォームが分子標的マーカーとなることが報告されているが、神経芽腫での報告はほとんどされていない。申請者らが誌上で報告して以降、1 誌(BMC Cancer 16:781.2016)に神経芽腫と ALDH アイソフォームの関連性に関する報告がなされている。

神経芽腫 CSC における ALDH1A2 の機能についてはこれまで解明されていない。本研究では ALDH1A2 の発現量が多い神経芽腫 CSC から微小環境、non-CSC および CSC に分泌されている物質の同定を試みる。ALDH1A2 および同定分子の機能解析を行うことで、神経芽腫 CSC の残存、治療抵抗性を獲得する機序の解明に繋がる。

3. 研究の方法

これまでに ALDH1A2 をノックダウンおよび過剰発現した神経芽腫 BE(2)-C 細胞を樹立し、ALDH1A2 が神経芽腫の CSC 形質を制御することを申請者らは示してきた (Int J Oncol 46: 1089-1098, 2015)。これらの細胞株を用いて、ALDH1A2 によって分泌を制御される分子の同定には、ALDH1A2 をノックダウンおよび過剰発現した神経芽腫 BE(2)-C 細胞の培養上清を用いた。具体的には、SDS-PAGE 上、両者において分泌が亢進する分子群を質量分析 (Mass Spectrometry) で同定を試みた。

培養した神経芽腫細胞から RNA を抽出して、リアルタイム PCR によって同定した分子の発現について解析を行った。次に同定した分子の細胞内局在を、間接蛍光免疫法を用いて形態学的について解析を行った。

4 . 研究成果

まずは ALDH1A2 をノックダウンおよび過剰発現した神経芽腫 BE(2)-C 細胞を樹立した。次に、それらの培養上清から発現量が著しく変化するタンパク質を同定するために、ALDH1A2 をノックダウンおよび過剰発現した BE(2)-C 細胞を 72 時間培養した後に、上清を回収し、限外濾過フィルターを用いて濃縮した。SDS-PAGE、銀染色したゲル上で、ALDH1A2 を過剰発現した BE(2)-C 細胞では濃く染色され、ALDH1A2 をノックダウンした BE(2)-C 細胞では殆ど染色されないバンドを同定した (図 1)。

次にこのバンドの切り出し質量分析を行い、蛋白の同定を試みた。核酸代謝に関わる酵素 nucleoside diphosphate kinase 1 (NME1) がバンドをコード

することが判明した(図 1)。NME1 は、その高発現が神経芽腫患者の予後不良と相関することが示されている。

実際に ALDH1A2 過剰発現した BE(2)-C 細胞とノックダウンした BE(2)-C 細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 及び western blotting 法を用いて、NME1 の発現を検討したが、両者においては発現量に差は認めなかった(図 2)。つまりは細胞内レベルでは ALDH1A2 過剰発現した BE(2)-C 細胞とノックダウンした BE(2)-C において発現量に差は

図1 銀染色

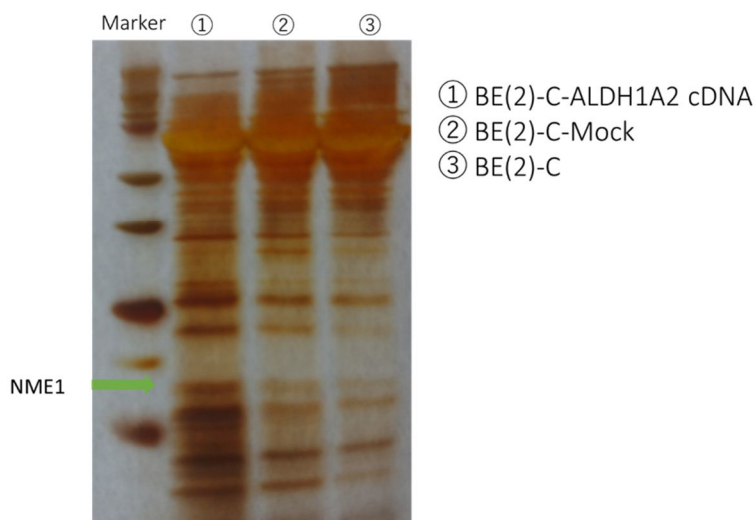
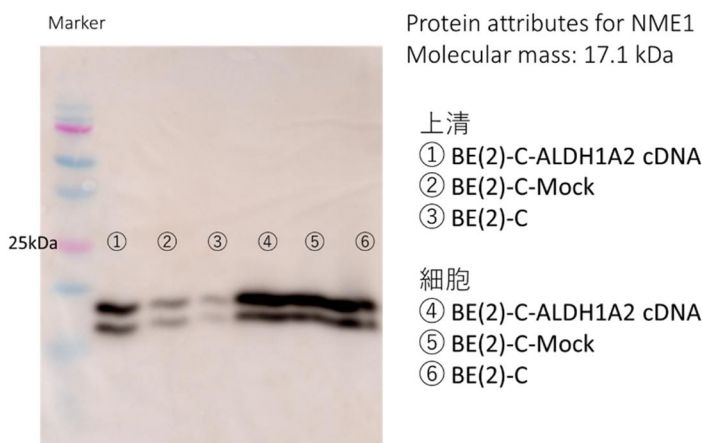


図2 Western blotting



認めなかった。一方で ALDH1A2 をノックダウンおよび過剰発現した BE(2)-C 細胞を 72 時間培養した後に、上清を回収し、限外濾過フィルターを用いて濃縮液を作成し、これを用いて Western blotting 法を行い、発現量の解析を行ったところ、(図 1)銀染色の結果と同様に ALDH1A2 過剰発現した BE(2)-C 細胞において NME-1 の発現が亢進していた。

培養液に NME-1 を添加、非添加の BE(2)-C 細胞を 72 時間培養した後に、BE(2)-C の細胞増殖能について検討を MTS assay を用いて評価したところ、BE(2)-C 細胞の培養液に NME1 タンパク質を添加すると細胞増殖が亢進することが分かった。以上より、ALDH1A2 を高発現している神経芽腫 CSC から分泌される NME1 は、神経芽腫 CSC の機能発現に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kyaw San Lin	4. 巻 14
2. 論文標題 Minimal residual disease in high-risk neuroblastoma shows a dynamic and disease burden-dependent correlation between bone marrow and peripheral blood	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Oncol	6. 最初と最後の頁 101019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2021.101019.	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 -

1. 著者名 Suguru Uemura	4. 巻 9
2. 論文標題 Dynamics of Minimal Residual Disease in Neuroblastoma Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Oncol	6. 最初と最後の頁 455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2019.00455.	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 -

1. 著者名 Khin K M Thwin	4. 巻 22
2. 論文標題 Level of Seven Neuroblastoma-Associated mRNAs Detected by Droplet Digital PCR Is Associated With Tumor Relapse/Regrowth of High-Risk Neuroblastoma Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Mol Diagn .	6. 最初と最後の頁 236-246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmoldx.2019.10.012.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植村優
2. 発表標題 Prognostic values of tumor markers and minimal residual disease detected by 7NB-mRNAs ddPCR assay for high-risk neuroblastoma patients
3. 学会等名 日本小児血液がん学会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------