

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08174

研究課題名（和文）神経芽腫発がんにおける網羅的遺伝子破壊を用いたセカンドヒット遺伝子領域の探索

研究課題名（英文）Discover for the second-hit gene regions using comprehensive gene destruction in neuroblastoma carcinogenesis

研究代表者

竹信 尚典（Takenobu, Hisanori）

地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター（臨床腫瘍研究所）・臨床腫瘍研究所・研究員

研究者番号：60392247

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：発がんや、がんの治療薬剤耐性に対する脆弱性は、何らかの遺伝子発現異常に依存して生じていると考えられる。今回我々は、網羅的な遺伝子破壊を用いて正常細胞またはがん細胞の遺伝子操作を行い、発がんや薬剤耐性に関わる生物学的な特性の変化を観察する基盤研究を行った。また、自然に発生した遺伝子変異を持つ細胞を用いた実験によって発がん能力や薬剤感受性を獲得することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発がんのメカニズムは、がん種によって様々である。神経芽腫は、神経堤細胞から発生するが、細胞が分化する途中でMYCNの高発現を伴って発がんする。しかし、MYCNが増幅している神経芽腫は発生する全体の30%以下であり、残りはそのメカニズムが不明である。また、近年注目されるPRC2複合体を標的とした阻害剤は、単剤ではごく一部のがんにのみ奏効性を発揮する。そこで、網羅的に遺伝子を破壊することで、発がんした正常細胞内での破壊された遺伝子や、エピジェネティック薬に抵抗性の細胞で網羅的に遺伝子破壊を行い、薬剤感受性に関わる遺伝子を特定することは、エピジェネティック薬の効きやすいがんの層別化に役立つ。

研究成果の概要（英文）：Tumorigenesis and vulnerability of cancer cells to therapeutic drug resistance are thought to be dependent on some kind of gene expression abnormality. In this study, we performed basic research to genetically manipulate normal or cancer cells using comprehensive gene disruption and observed changes in biological characteristics related to carcinogenesis and drug resistance. We also confirmed that cells with naturally occurring genetic mutations acquire tumor formation ability and drug sensitivity through experiments using cells with mutations.

研究分野：医歯薬学

キーワード：発がん 細胞分化 分子標的

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児の固形腫瘍であり、悪性のものの一部は MYCN の増幅やテロメア調節機構の破綻が生じていることが知られている。また、神経芽腫は神経堤細胞から各組織の細胞への分化の途中で発現する。しかし、神経堤細胞の分化過程は細胞の移動を伴うことや細胞数が少ないことから、詳細はほとんど解明されていない。実際に MYCN を神経堤細胞の分化途中で高発現するモデルマウスにおいても発症は 100% ではないため、分子メカニズムの解明は困難である。そこで我々は過去の知見を参考にして、in vitro での iPS 細胞由来の神経堤細胞の分化モデルを導入した(Mukae K et al., 2022, Cancer Sci)。また、我々の研究で、神経芽腫細胞株には PRC2 阻害剤の IC50 が数百倍高い細胞が存在することを見出した(Endo Y et al., 投稿中)。これらの細胞において、感受性の細胞との遺伝子レベルでの違いを見出すことは、将来の神経芽腫の治療選択に大いに役立つものと考えられた。また、研究開始当初においては、分化して得られた神経堤細胞から腫瘍を作成することは報告がなかった。さらに PRC2 阻害剤の感受性を決める遺伝子変異として、SMARCA4、ARID1A などが報告されていたが、続報ではそれらの変異を持つ細胞においても、PRC2 阻害剤への抵抗性を持つものが複数存在しており、他の変異の重要性も示唆された。

2. 研究の目的

試験管内において、正常神経堤細胞または PRC2 阻害剤に耐性の神経芽腫の遺伝子を網羅的に破壊し、新たな発がん性の獲得にかかわる遺伝子または PRC2 阻害剤への感受性を獲得する遺伝子を網羅的な解析から同定する。これらによって、未知のがん抑制遺伝子を発見し、発がんメカニズムの解明および、新規治療法の開発につなげる。また、正常細胞の持ち得ないがん特有の変異を網羅的に作成することで、がん細胞の PRC2 阻害に対する脆弱性を促進し、PRC2 阻害剤が単剤で効果を発揮するがんを層別化する。ゆくゆくは脆弱性にかかわる遺伝子を標的とした、複数薬剤の併用をともなった新しい治療法の開発につなげる。

3. 研究の方法

1) sgRNA ライブラリーの導入

本実験を開始するにあたり、2 種類のレンチウイルスベースの sgRNA ライブラリーを Addgene から入手した。Activity-optimized genome-wide library (Sabatini, 1 vector) および、(Wang et al Science. 2015 Oct 15. pii: aac7041.) は Human CRISPR Knockout pooled library (Brunello, 2 vector) (Doench et al Nat Biotechnol. 2016 Jan 18. doi: 10.1038/nbt.3437.) である。1 vector type は Cas9 がベクターに搭載されているため、一度の感染で遺伝子をノックアウトすることができるが、2 vector type は Cas9 だけでなく、mRNA を標的とする Cas (Cas13 など) や、薬剤誘導型の Cas9 との組み合わせによって、1 vector type で同定しきれなかった遺伝子の絞り込みを可能とするものである。

2) sgRNA ライブラリーの調製と発現の確認

sgRNA ライブラリーについては、ライブラリー添付文書に指定された大腸菌を用い、エレクトロポレーション法で導入を行った。導入条件を何度か調整し、最終的に効率が 6×10^7 程度のライブラリーを作成した。ライブラリーは PRC2 阻害剤への感受性で層別化を行うため、PRC2 阻害剤に耐性の細胞と感受性の細胞にレンチウイルスを用いて導入し、薬剤処理後に残存する sgRNA の差を検討する。

3) iPS 細胞由来神経堤細胞の形成する腫瘍の解析

変異を持たないヒト線維芽細胞または p53 変異型の背景を持つ正常細胞から作成した iPS 細胞は、iPS 細胞研究所から入手した。それらの iPS 細胞を Fukuta らの方法(Plos One 2014, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112291>) を用いて神経堤細胞に分化させる。神経堤細胞は p75NGFR などのマーカーによって未分化細胞を除く。調製された神経堤細胞には、レンチウイルスを用いて sgRNA ライブラリーまたは、神経芽腫のがん遺伝子である MYCN を導入する。また、変異を持たない背景または p53 変異を背景に持つ細胞でのがん化への影響を確認するため、足場非依存的な軟寒天での培養および免疫不全マウスでの発がん実験を行う。

4) PRC2 阻害と併用することで抗癌効果をもつ化合物の探索

PRC2 阻害剤は、PRC2 の発現が高い傾向のあるがんに対して効果が期待されている。しかし単剤での効果は限定的であり、報告されている変異と PRC2 阻害剤の効果も、がん種が異なることで再現性に乏しい。そこで、PRC2 分子のノックダウン等と複数のエピジェネティック関連阻害剤を組み合わせることで、より強い細胞増殖抑制効果のある阻害剤を探索する。

4 . 研究成果

1)および 2) sgRNA ライブラリーはプラスミド調製キットを用いてプラスミド溶液として保存した。Sabatini ライブラリー(3 プール、puromycin 耐性)については、神経芽腫細胞株で、PRC2 阻害剤に強耐性である IMR32 および PRC2 阻害剤感受性である SK-N-BE 細胞へ導入し、puromycin 耐性細胞を選択して分取、保存した。それらの細胞において、Cas9 遺伝子が発現しており、タンパク質として検出できることを確認した。一つの細胞には複数の Cas9 が導入されるため、細胞の生存に必要な遺伝子が破壊される細胞が存在すると予想されたが、実際には空ベクターを導入した細胞と同程度に生存が見られた。また、今回は濃縮したウイルス液を導入に用いたが、一つの細胞あたりに導入される sgRNA の数がある程度少なくすることで、特異的な表現形を引き出す必要があると考えられた。また、それらの解析方法についても検討の必要があると考えられた。

3) 作成した p75 陽性の神経堤細胞は、その他の変異を必要とせず、軟寒天中で足場非依存的な増殖をすることが可能であった。また、免疫不全なヌードマウスの皮下へ注入することで、腫瘍を形成することが明らかになった。P53 の変異を持たない iPS 細胞を同様に神経堤細胞へ分化させ、がん遺伝子である MYCN を導入したところ、p53 変異の細胞よりも低い確率で腫瘍を形成した。それらの腫瘍の組織型およびマーカー遺伝子を解析したところ、p53 変異または MYCN 導入細胞とも軟骨腫瘍に似た組織型を示し、神経芽腫らしい組織像は検出されなかった。これらの成果は Cancer Science 誌に掲載された(Mukae et al., 2022)。これらの結果から、p53 遺伝子の破壊が非常に強い腫瘍化のトリガーとなることが明らかになったが、神経堤細胞の分化が軟骨腫瘍への運命決定をなすと考えられた。参考にした Fukuta らの神経堤細胞は、頭部型の神経堤細胞と考えられ、近年では TH や DBH を発現する尾部型の神経堤細胞が神経芽腫の原基となっていると予想されている。そこで Huang ら(Huang et al., 2016)の方法取り入れ、尾部型の神経堤細胞の調製を試みた。iPS 細胞からの尾部型神経堤細胞への分化には、レチノイン酸等の強力な分化刺激を必要とするため、研究期間内には遺伝子導入や腫瘍形成を行うに足る十分な細胞数が得られていないため、現在も研究を遂行中である。

4) PRC2 複合体の核をなす、EZH2 および EED の阻害剤は、使用した神経芽腫細胞においては、多くの細胞が増殖に対しては耐性を持ち、少なくとも 10 μ M という濃度でしか増殖抑制効果が見ら

れなかった。一方で EZH1, EZH2 のいずれとも複合体を作る EED の発現を shRNA で抑制すると、p53 の下流の遺伝子の発現が促進されるとともに CDK2 などの増殖関連遺伝子の発現が抑制された。EZH2 または EED の阻害剤を加えた状態で、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤や DNA メチル化 (DNMT) 阻害剤を併用すると、in vitro および in vivo において、細胞増殖の阻害が見られた。それらの結果および PRC2 で酵素活性を担う EZH1 の阻害が神経芽腫の増殖を阻害する内容については、論文掲載 (Shaliman et al., 2022, Shinno et al., 2022) または投稿中 (Endo et al. 投稿中) である。さらに、膀胱がんの細胞株において、EZH2 の活性低下型の変異体が見つかり、H3K27me1~3 が低いことが明らかになった。この細胞と野生型 EZH2 の比較によって、HDAC 阻害剤や DNMT 阻害剤は、変異型 EZH2 を持つ細胞で増殖を抑制した。抗腫瘍効果のある、他のエピジェネティック阻害剤については、変異型 EZH2 を持つ細胞を使用して、絞り込みを進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akter Jesmin, Katai Yutaka, Sultana Parvin, Takenobu Hisanori, Haruta Masayuki, Sugino Ryuichi P., Mukae Kyosuke, Satoh Shunpei, Wada Tomoko, Ohira Miki, Ando Kiyohiro, Kamijo Takehiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Loss of p53 suppresses replication stress-induced DNA damage in ATRX-deficient neuroblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-021-00363-6	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 該当する
1. 著者名 Shaliman Dilibaerguli, Takenobu Hisanori, Sugino Ryuichi P., Ohira Miki, Kamijo Takehiko	4. 巻 101
2. 論文標題 The PRC2 molecule EED is a target of epigenetic therapy for neuroblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 151238 ~ 151238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2022.151238	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 KURASHINA RYO, ANDO KIYOHRO, INOUE MASAHARU, IZUMI KEITA, MARUYAMA RIKO, MITANI KOUKI, TAKENOBU HISANORI, HARUTA MASAYUKI, IIZUKA TOSHIHIKO, KAMIJO TAKEHIKO, KAGEYAMA YUKIO	4. 巻 42
2. 論文標題 Platelet-to-Lymphocyte Ratio Predicts the Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Urothelial Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1131 ~ 1136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15576	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinno Yoshitaka, Takenobu Hisanori, Sugino Ryuichi P., Endo Yuki, Okada Ryu, Haruta Masayuki, Satoh Shunpei, Mukae Kyosuke, Shaliman Dilibaerguli, Wada Tomoko, Akter Jesmin, Ando Kiyohiro, Nakazawa Atsuko, Yoshida Hideo, Ohira Miki, Hishiki Tomoro, Kamijo Takehiko	4. 巻 113
2. 論文標題 Polycomb <sc>EZH1</sc> regulates cell cycle/5 fluorouracil sensitivity of neuroblastoma cells in concert with <i>MYCN</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4193 ~ 4206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15555	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akita Nobuhiro, Okada Ryu, Mukae Kyosuke, Sugino Ryuichi P., Takenobu Hisanori, Chikaraishi Koji, Ochiai Hidemasa, Yamaguchi Yohko, Ohira Miki, Koseki Haruhiko, Kamijo Takehiko	4. 巻 422
2. 論文標題 Polycomb group protein BMI1 protects neuroblastoma cells against DNA damage-induced apoptotic cell death	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113412 ~ 113412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2022.113412	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Parvin Sultana, Akter Jesmin, Takenobu Hisanori, Katai Yutaka, Satoh Shunpei, Okada Ryu, Haruta Masayuki, Mukae Kyosuke, Wada Tomoko, Ohira Miki, Ando Kiyohiro, Kamijo Takehiko	4. 巻 23
2. 論文標題 ATM depletion induces proteasomal degradation of FANCD2 and sensitizes neuroblastoma cells to PARP inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 313-313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-023-10772-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mukae Kyosuke, Takenobu Hisanori, Endo Yuki, Haruta Masayuki, Shi Tianyuan, Satoh Shunpei, Ohira Miki, Funato Michinori, Toguchida Junya, Osafune Kenji, Nakahata Tatsutoshi, Kanda Hiroaki, Kamijo Takehiko	4. 巻 114
2. 論文標題 Development of an osteosarcoma model with <i>MYCN</i> amplification and <i>TP53</i> mutation in hiPS cell derived neural crest cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1898 ~ 1911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15730	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹信尚典、杉野隆一、大平美紀、春田雅之、迎恭輔、和田朋子、力石浩志、遠藤悠紀、秋田直洋、岡田龍、ディルバーサルマン、上條岳彦
2. 発表標題 パイオニア転写因子CDX1は神経芽腫細胞における発生関連遺伝子の発現を制御する
3. 学会等名 第80回 日本がん学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hisanori Takenobu, Miki Ohira, Ryuichi Sugino, Dilibaerguli Shaliman, Koji Chikaraishi, Ryu Okada, Kyosuke Mukae, Tomoko Wada, Yuki Endo, Nobuhiro Akita, Masayuki Haruta, Takehiko Kamijo
2. 発表標題 Tumor sphere specific gene CDX1 binds to OCT4 and MAX promoters to regulates stemness
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jesmin Akter, Parvin Sultana, Hisanori Takenobu, Miki Ohira, Ryuichi Sugino, Masayuki Haruta, Takehiko Kamijo
2. 発表標題 p53 deficiency limits ATRX loss induced replication stress and genome instability in neuroblastoma cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kyosuke Mukae, Hisanori Takenobu, Hiroaki Kanda, Miki Ohira, Yuki Endo, Masayuki Haruta, Junya Toguchida, Kenji Osafune, Tatsutoshi Nakahata, Takehiko Kamijo
2. 発表標題 iPS細胞由来神経堤細胞からの人工的発がんモデル開発
3. 学会等名 第62回日本小児血液・癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hisanori Takenobu, Zhenghao Li, Ryuichi P. Sugino, Kyosuke Mukae, Miki Ohira, Masayuki Haruta, Yuki Endo, Ryu Okada, Dilibaerguli Shaliman, Sultana Parvin, Takehiko Kamijo
2. 発表標題 神経芽腫における分化関連遺伝子のエピジェネティックな発現抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 第14回 日本エピジェネティック研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takenobu H, Sugino RP, Haruta M, Ohira M, Satoh S, Kamiyo T
2. 発表標題 スフェア特異的転写因子CDX1はヒストン修飾変化をともなって幹細胞特異的な遺伝子発現を制御する
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takenobu H, Endo Y, Shaliman D, Shinno Y, Ohira M, Sugino RP, Haruta M, Satoh S, Mukae K, Akter J, Wada T, Nakazawa A, Kamiyo T
2. 発表標題 PRC2阻害とエピジェネティック阻害剤を組み合わせた神経芽腫の効果的な治療法の開発
3. 学会等名 第81回日本がん学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mukae K, Takenobu H, Kanda H, Ohira M, Endo Y, Haruta M, Shi T, Satoh S, Toguchida J, Osafune K, Nakahata T, Kamiyo T
2. 発表標題 軟寒天を用いた形質転換はhiPS細胞由来神経堤細胞からのhigh-gradeな軟骨芽細胞型骨肉腫モデルを発生させる
3. 学会等名 第81回日本がん学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takenobu H, Sugino PR, Ohira M, Haruta M, Satoh S, Mukae K, Wada T, Okada R, Shaliman D, Kamiyo T
2. 発表標題 CDX1は遺伝子発現制御を介して神経芽腫細胞における幹細胞性および増殖の制御をする
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	迎 恭輔 (Kyosuke Mukae) (60793974)	地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター (臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・主任 (82402)	

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
---------	---------