

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08199

研究課題名（和文）神経芽腫の自然退縮におけるミトコンドリア恒常性の意義とその破綻による悪性化機構

研究課題名（英文）The significance of mitochondrial homeostasis in spontaneous regression and malignant transformation of neuroblastoma

研究代表者

巽 康年（Tatsumi, Yasutoshi）

千葉県がんセンター（研究所）・発がん研究グループ 発がん制御研究部・上席研究員

研究者番号：00450578

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）：本研究では、神経芽腫の難治性病態を解明する目的で、予後良好因子として当研究所において同定されたBMCC1の分子基盤とミトコンドリア異常との関連について着目し、これらの理解を目指した。その研究成果として、ミトコンドリアDNA（mtDNA）の塩基配列を次世代シーケンサーにて網羅的に解析する手法を独自に確立し、18種類の神経芽腫細胞株が保有するmtDNA内に、病因性が予想される一塩基多型を含む変異を複数同定することに成功した。さらに、BMCC1ノックダウン細胞株およびBMCC1ノックアウトマウス副腎について網羅的な遺伝子発現解析を行い、BMCC1の発現低下がもたらす遺伝子発現変化の特徴を捉えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアDNA（mtDNA）はミトコンドリア内で活性酸素に暴露される為、核ゲノムよりも高率に遺伝子変異を生じやすい可能性があるが、NBのmtDNA変異を解析した研究報告はほとんどない。したがって本研究成果は、NB研究において解明が先行する核ゲノムの異常に関する情報に加えて、ミトコンドリア異常に関する情報を提供することにつながり、今後NBの難治性病態の全貌を理解するための重要な足掛かりとなる。さらに、本研究で確立したmtDNA変異解析技術を活用して、これまで見逃されてきた既存試料中のmtDNAの再解析が可能となることが期待され、既存試料を再活用したNB研究の新局面を拓く潜在性を秘める。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the relationship between the molecular basis of BMCC1, which is a favorable prognostic factor for neuroblastoma (NB), and mitochondrial abnormalities in NB cells to elucidate the intractable pathology of NB. As a result of this research, we succeeded in identifying multiple mutations, including single nucleotide polymorphisms predicted to be pathogenic, in the 13 mitochondria genes encoded in the mitochondrial DNA from 18 types of NB cell lines tested. Furthermore, we performed comprehensive gene expression analysis of BMCC1-knockdown cell lines and BMCC1-knockout mouse adrenal glands, and captured the characteristics of gene expression changes caused by decreased expression of BMCC1.

研究分野：腫瘍学

キーワード：神経芽腫 ミトコンドリア BMCC1 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、副腎・交感神経節から発生する小児固形腫瘍で、国内で年間 150-200 人が発症する。新生児から乳幼児期に最も多く発症が見られ、発症リスクはその後 10 歳にかけて減少する。進行症例は抗癌剤耐性となり、また再発を繰り返し『難治性』を示す。一方で、1.5 歳未満に発症した神経芽腫の中には、たとえ遠隔転移を起こしていたとしても腫瘍が自然に退縮して治癒する、いわゆる『自然退縮』という神経芽腫特有の現象が知られる。

神経芽腫の発症に関して多くの研究が進められ、*MYCN* 遺伝子の増幅および *ALK* 遺伝子の活性化型変異や増幅がドライバーとして働くことが示された。これらの遺伝子異常に加えて、次世代型シーケンサーを用いたゲノム解析から、癌抑制遺伝子の *ARID1A/B* (文献 1) および *ATRX* の変異 (文献 2)、また *TERT* 遺伝子の増幅及び発現亢進 (文献 3) などが悪性化に寄与することが報告された。我々のグループも、先行研究として「次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム・創薬コンセプトに基づく戦略的治療デザインの確立」の下で、*MYCN* 非増幅でありながら 11q loss と 17q gain を有し再発を繰り返す難治性サブタイプ (中間予後群: P2s および P3s) (文献 4) 症例について、全エクソンシーケンス・RNA シーケンス・メチローム解析などを行った。

一方で、神経増殖因子 (NGF) 受容体の TrkA を高発現する『予後良好な神経芽腫』は、腫瘍の退縮に繋がるプログラムされた神経細胞死を誘導する、あるいは良性の神経節腫へと分化する能力を持つと考えられている。実際、正常な交感神経と同様に神経芽腫細胞も、部分的ではあるが、シュワン細胞や繊維芽細胞から供給された NGF に依存して、細胞の分化およびプログラムされた細胞死が制御されている (文献 5)。このように、『自然退縮』において、NGF-TrkA シグナルが重要であることが判明した。当研究所において、NGF-TrkA の下流シグナル経路の解明を含む神経芽腫の自然退縮メカニズムの探索が先行研究として行われ、*SHF* (*Src homology 2 domain containing F*) と *BMCC1* (*BNIP2 and Cdc42GAP homology motif-containing molecule at the carboxyl terminal region 1*) を含む候補遺伝子が同定された (文献 6)。我々はその結果、*SHF* が *ALK* 受容体と結合するアダプター分子であること、リン酸化による *ALK* の活性化を阻害して予後良好性に寄与することを報告した (文献 7)。

本研究で着目した *BMCC1* は、340-kDa の巨大蛋白質で、C-末側に *BNIP2* および *Cdc42GAP* と相同性の高い BCH ドメイン構造を持つ。BCH ドメインは『多機能性の足場』として様々な細胞内シグナルを仲介する (文献 8)。先行研究より、*BMCC1* は神経芽腫において独立した予後良好因子であること、*BMCC1* は神経細胞において、NGF 枯渇によって TrkA 依存的なミトコンドリア経路の細胞死が誘導されると発現上昇し、これを促進することが示された (文献 9)。我々は、神経芽腫を含むヒト培養細胞において、*BMCC1* が BCH ドメインを含む *BNIP2* 相同領域を介して *AKT*-生存シグナルを抑制し、同時に細胞死抑制因子の *Bcl-2* と結合することによって *Caspase-9* の活性化を伴ったミトコンドリア経路の細胞死を惹起することを報告した (文献 10)。実際に、*BMCC1* を発現抑制した神経芽腫細胞は、シスプラチンおよびアドリアマイシン (抗癌剤) に対する感受性の低下が観察された (文献 10)。さらに、*BMCC1* は神経系のみならず正常な上皮や骨格筋など多くの組織で広く発現すること、種々の癌組織において正常組織と比較して *BMCC1* が発現低下することを報告した (文献 10)。*BMCC1* の発現制御メカニズムを調べたところ、細胞周期が G1 期から S 期にある細胞および細胞死を誘導した神経芽腫細胞において、*BMCC1* は転写因子の *E2F1* 依存的に発現誘導されることを見出した (文献 11, 文献 12)。また、神経芽腫細胞において、ミトコンドリア経路の細胞死の初期に *E2F1* 依存的に発現上昇した *BMCC1* は、

細胞死の後期には活性化された Caspase-9 によって切断され、分解制御を受けることを報告した（文献 12）。以上、我々はこれまでに、BMCC1 が NGF-TrkA 依存的・非依存的なミトコンドリア経路の細胞死誘導刺激の下流において、自然退縮への関与が知られる E2F1 依存的に発現誘導され、細胞生存シグナルを抑制してミトコンドリア細胞死を促進することにより、神経芽腫の悪性化防止と自然退縮に貢献する分子基盤の一端を解明した。

2．研究の目的

本研究課題は、我々がこれまでに当研究所で蓄積してきた神経芽腫研究に関する知的財産および研究室が確立しているゲノム解析技術を活用し、神経芽腫細胞株におけるミトコンドリアの異常の同定と、これらが『自然退縮』につながる BMCC1 依存的なミトコンドリア経路の細胞死に与える影響の理解と、BMCC1 発現低下と協調した神経芽腫悪性化機構の解明を目的とした。

3．研究の方法

神経芽腫細胞株のミトコンドリア異常の検索

我々はこれまでに、BMCC1 がミトコンドリア経路の細胞死を促進するメカニズムを解明した。さらに、予備的な研究から神経芽腫細胞株において BMCC1 の発現低下は、ROS を抑制する因子の発現低下、ハイポキシアを誘導する因子の発現亢進およびミトコンドリアを介さない ATP 合成経路（解糖系）の活性化を示す遺伝子の発現上昇に繋がることを突き止めた。すなわち、BMCC1 が低発現となった細胞は、ミトコンドリア経路の細胞死の抑制と癌の悪性化につながる異常がミトコンドリアに生じると考えられる。さらに、BMCC1 は ROS によって生成した 8-oxo-GTP のセンサーとして働く可能性も提唱されている（文献 13）。従って BMCC1 が低発現の細胞株は、過剰に産生された ROS によりミトコンドリア DNA (mtDNA) に変異が起きやすくなっていることが予想される。特に、mtDNA は、核ゲノムよりも ROS に曝露されやすく 8-oxo-Guanine などによる DNA 損傷を受けやすいこと、生じた mtDNA 変異は塩基除去修復によってのみ修復されることから、核ゲノムよりも遺伝子変異が蓄積しやすいと予想される。そこで、神経芽腫細胞株を、BMCC1 が高発現する細胞株 (SK-N-AS、SK-N-BE など) と低発現の細胞株 (SH-SY5Y、CHP134 など) に分類した上で mtDNA 変異の同定を行い、ミトコンドリア異常の有無を網羅的に検索する。細胞株に生じた mtDNA の変異は、次世代シーケンサー等を用いて解析し、その全体像を明らかにする。

BMCC1 の発現抑制が神経芽腫細胞のミトコンドリア異常に及ぼす影響

神経芽腫症例において、BMCC1 の高発現は『自然退縮』を含む予後良好となる。一方、BMCC1 の発現低下は、予後不良となる。本項目では、BMCC1 の発現低下後の細胞に生じる神経芽腫の悪性化メカニズムについてミトコンドリアに注目して検証を行う。

ヒト神経芽腫細胞株を用いて BMCC1 のノックダウン実験を行い、BMCC1 の発現低下によってミトコンドリアに異常 (mtDNA 変異および呼吸鎖の不全を含むミトコンドリアの機能異常) が生じることを検証する。さらに、これらミトコンドリア異常が、BMCC1 の発現低下によって生じる、腫瘍の悪性化シグナルの亢進 (AKT やソニック・ヘッジホッグシグナルの活性化など) と協調して、ミトコンドリア経路の細胞死の抑制と悪性化につながる分子基盤を解明する。以上、神経芽腫細胞株の解析から得た結果については、先行研究で樹立した BMCC1 ノックアウトマウスを用いて個体レベルで検証する。

4．研究成果

神経芽腫細胞株のミトコンドリア異常の検索

神経芽腫は核ゲノム DNA に変異が少ないがん種である。一方で、ミトコンドリア DNA (mtDNA) はミトコンドリア内で活性酸素に暴露される為、核ゲノム DNA よりも高率に遺伝子変異を生じやすい可能性があるが、神経芽腫の mtDNA 変異に着目した病態解明研究は、ほぼ皆無であった。ミトコンドリアは生命活動に必要なエネルギーの ATP を産生するとともに細胞死にも関わること、その破綻が腫瘍の悪性化や転移に寄与することが種々のがんで報告されつつある。そこで神経芽腫のミトコンドリア異常を解明する手始めとして、神経芽腫細胞株が保有する mtDNA 変異の網羅的検索を行った。mtDNA は、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体を構成する 13 遺伝子をコードしており、これら遺伝子の変異がミトコンドリアの機能異常に繋がることが知られている。まず、18 種類の神経芽腫細胞株が保有するミトコンドリア異常に結びつく mtDNA 変異の全貌を明らかにするため、全長が約 16 キロ塩基対ある mtDNA の塩基配列を次世代シーケンサーにて網羅的に解析する手法を独自に確立した。次に、本技術を用いて各細胞株の mtDNA の塩基配列を網羅的に解読した。その結果、ミトコンドリア遺伝子内に病因性が予想される一塩基多型を含む複数の変異を同定することに成功した。本研究成果は学術論文として投稿中であるとともに、実際の神経芽腫症例における mtDNA の網羅的な変異解析研究を計画する足掛かりとなった。

BMCC1 の発現抑制が神経芽腫細胞のミトコンドリア異常に及ぼす影響

神経芽腫の予後良好性に関わる因子として機能解析を進めている BMCC1 が、ミトコンドリアの恒常性維持に関わる分子メカニズムの探索を行った。BMCC1 をノックダウンした神経芽腫細胞株の網羅的な遺伝子発現解析データの解析を進め、コントロール細胞と比較して有意に発現変化を認めた遺伝子群を絞り込み、その検証を行った。さらに、BMCC1 ノックアウトマウスと野生型マウスについて網羅的な遺伝子発現解析を進めた。BMCC1 をノックダウンした神経芽腫細胞株の網羅的な遺伝子発現解析より取得したデータの分析を進め、神経芽腫悪性化における BMCC1 の機能解明を進めた。さらに、BMCC1 ノックアウトマウスの副腎について網羅的な遺伝子発現解析を行い、BMCC1 の発現低下がもたらす遺伝子発現変化の特徴を捉えた。以上の解析を統合し、神経芽腫悪性化との関連が想定されるパウウェイを絞り込んだ。

< 引用文献 >

1. Sausen *et al.*, *Nat Genet*, 2013
2. Pugh *et al.*, *Nat Genet*, 2013
3. Valentijn *et al.*, *Nat Genet*, 2015
4. Ohira *et al.*, *Cancer Sci*, 2010
5. Nakagawara and Brodeur, *Eur J Cancer*, 1997
6. Ohira *et al.*, *Oncogene*, 2003
7. Takagi and Tatsumi (2/9) *et al.*, *Cancer Sci*, 2013
8. Pan and Low, *FEBS Lett*, 2012
9. Machida *et al.*, *Oncogene*, 2006
10. Tatsumi (1/7) *et al.*, *Cell Death Dis*, 2015
11. Islam and Tatsumi (2/9) *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2016
12. Islam and Tatsumi (7/7) *et al.*, *BMC Cancer*, 2019
13. Iwama *et al.*, *J Mol Neurosci*, 2011

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Iwata Shintaro, Tatsumi Yasutoshi, Yonemoto Tsukasa, Araki Akinobu, Itami Makiko, Kamoda Hiroto, Tsukanishi Toshinori, Hagiwara Yoko, Kinoshita Hideyuki, Ishii Takeshi, Nagase Hiroki, Ohira Miki	4. 巻 46
2. 論文標題 CDK4 overexpression is a predictive biomarker for resistance to conventional chemotherapy in patients with osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2021.8086	査読の有無 有
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 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Tatsumi Yasutoshi, Nakamura Yuki, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Kras activation in endometrial organoids drives cellular transformation and epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-021-00337-8	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 Maru Yoshiaki, Tanaka Naotake, Tatsumi Yasutoshi, Nakamura Yuki, Yao Ryoji, Noda Tetsuo, Itami Makiko, Hippo Yoshitaka	4. 巻 255
2. 論文標題 Probing the tumorigenic potential of genetic interactions reconstituted in murine fallopian tube organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 177 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5752	査読の有無 有
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 Takenaga Keizo, Koshikawa Nobuko, Akimoto Miho, Tatsumi Yasutoshi, Lin Jason, Itami Makiko, Nagase Hiroki	4. 巻 11
2. 論文標題 MCT4 is induced by metastasis-enhancing pathogenic mitochondrial NADH dehydrogenase gene mutations and can be a therapeutic target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92772-1	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 Hoshino Isamu, Yokota Hajime, Iwatate Yosuke, Mori Yasukuni, Kuwayama Naoki, Ishige Fumitaka, Itami Makiko, Uno Takashi, Nakamura Yuki, Tatsumi Yasutoshi, Shimozato Osamu, Nagase Hiroki	4. 巻 113
2. 論文標題 Prediction of the differences in tumor mutation burden between primary and metastatic lesions by radiogenomics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 229 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15173	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 Iwatate Yosuke, Yokota Hajime, Hoshino Isamu, Ishige Fumitaka, Kuwayama Naoki, Itami Makiko, Mori Yasukuni, Chiba Satoshi, Arimitsu Hidehito, Yanagibashi Hiroo, Takayama Wataru, Uno Takashi, Lin Jason, Nakamura Yuki, Tatsumi Yasutoshi, Shimozato Osamu, Nagase Hiroki	4. 巻 60
2. 論文標題 Machine learning with imaging features to predict the expression of ITGAV, which is a poor prognostic factor derived from transcriptome analysis in pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2022.5350	査読の有無 有
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 Iwatate Yosuke, Yokota Hajime, Hoshino Isamu, Ishige Fumitaka, Kuwayama Naoki, Itami Makiko, Mori Yasukuni, Chiba Satoshi, Arimitsu Hidehito, Yanagibashi Hiroo, Takayama Wataru, Uno Takashi, Lin Jason, Nakamura Yuki, Tatsumi Yasutoshi, Shimozato Osamu, Nagase Hiroki	4. 巻 17
2. 論文標題 Transcriptomic analysis reveals high ITGB1 expression as a predictor for poor prognosis of pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0268630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0268630	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 Hoshi Daisuke, Kita Emiri, Maru Yoshiaki, Kogashi Hiroyuki, Nakamura Yuki, Tatsumi Yasutoshi, Shimozato Osamu, Nakamura Kazuyoshi, Sudo Kentaro, Tsujimoto Akiko, Yokoyama Ryo, Kato Atsushi, Ushiku Tetsuo, Fukayama Masashi, Itami Makiko, Yamaguchi Taketo, Hippo Yoshitaka	4. 巻 114
2. 論文標題 Derivation of pancreatic acinar cell carcinoma cell line 1 as a patient derived tumor organoid <scp>HS</scp>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1165 ~ 1179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15656	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮川 絢伍、森祐輔、中村友紀、巽康年、下里修
2. 発表標題 CD133 prevents serum deprivation-induced colon cancer cell death through the activation of mTORC1 and Bad by AKT.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Takeuchi, X. Zhang, Y. Tatsumi, H. Nagase, O. Shimozato
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素KDM2Bによる大腸がん細胞のFOLFFOX療法耐性獲得
3. 学会等名 第29回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Takeuchi, X. Zhang, Y. Tatsumi, H. Nagase, O. Shimozato
2. 発表標題 新規 KDM2B-AKR1B1経路は大腸がん細胞の多剤耐性獲得に寄与する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A. Takeuchi, X. Zhang, Y. Tatsumi, H. Nagase, O. Shimozato
2. 発表標題 Histone demethylase KDM2B epigenetically counteracts multidrug resistance in colon cancer 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 巽康年、大平美紀、米本司、岩田慎太郎
2. 発表標題 ゲノム異常を指標とした日本人の小児骨肉腫の予後を予測するバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田達哉、巽康年、渡部隆義、筆宝義隆、上久保靖彦
2. 発表標題 骨肉腫におけるHAT -HIFメカニズムの解明と新規治療薬の開発
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会2022年度学術集会
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

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