

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16364

研究課題名（和文）神経芽腫におけるアダプター蛋白質ShfとTrkBとの機能相関解析および臨床応用

研究課題名（英文）The interaction analysis and clinical application between the adapter protein Shf and TrkB in neuroblastoma

研究代表者

高木 大輔（Takagi, Daisuke）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：60611580

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）：難治性神経芽腫に対する治療薬開発を最終目標として、予後良好な神経芽腫に高発現するアダプター蛋白質であるShfと、予後不良な神経芽腫に高発現する神経成長因子受容体TrkBとの機能相関について研究を行った。神経芽腫細胞株SH-SY5Y細胞を用いて近接ライゲーションアッセイ（PLA）を行い、Shf-TrkB PLAシグナルが検出された。以上のことから、SH-SY5Y細胞においてShfとTrkBは相互作用をする蛋白質であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫は小児期における代表的な悪性固形腫瘍の一つであるが、しばしば非常に治療抵抗性であり、現在も新たな治療薬の開発を求められている。ShfがTrkBのシグナル伝達を修飾することによって神経芽腫の進行を抑制するという仮説を立て、ShfとTrkBとの機能相関についての研究を行った。近接ライゲーションアッセイにより、神経芽腫細胞株SH-SY5Yにおいて、ShfとTrkBが相互作用をする蛋白質であることが示唆されたが、その機能や意義については不明であり、解明には研究の継続が必要である。

研究成果の概要（英文）：With the final goal of developing therapeutic agents for refractory neuroblastoma, the interaction between the adapter protein Shf, which is highly expressed in neuroblastoma with good prognosis, and the nerve growth factor receptor TrkB, which is highly expressed in neuroblastoma with poor prognosis, was analyzed. We performed proximity ligation assay (PLA) using the neuroblastoma cell line SH-SY5Y and detected the Shf-TrkB PLA signals. From the above, it was suggested that Shf and TrkB are interacting proteins in SH-SY5Y cells.

研究分野：小児がん

キーワード：神経芽腫 Shf TrkB

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は胎生期の神経堤由来の腫瘍であり、小児固形腫瘍の中では脳腫瘍に次いで頻度が高い。現在の集学的治療の進歩にも関わらず、進行神経芽腫の治療成績は依然として極めて不良である。神経芽腫には、しばしば自然に退縮する予後の良いサブセットや、悪性度の高い予後不良なサブセットが存在し、臨床的に多彩な像を示すことから、その発症や進展には多彩な分子病態が存在すると考えられている。

Src homology 2 domain containing F (Shf) は4個のリン酸化チロシン残基と1個のSH2ドメインを持つアダプター蛋白質であり、Src homology 2 domain protein of beta cells (Shb) と非常に高い相同性を示す。2000年に発表された論文でPDGF α 受容体と結合してアポトーシスを抑制することが報告されたが、それ以外の性質や機能はほとんど知られていなかった。近年、千葉県がんセンター研究所における神経芽腫 cDNA プロジェクトにより、予後良好な神経芽腫に高発現する遺伝子の一つとして同定された。その後の研究において、神経成長因子 NGF 受容体 TrkA と結合し、NGF 依存的に神経分化を促進することが明らかとなった。

Trk ファミリー受容体は受容体型チロシンキナーゼであり、TrkA (NTRK1)、TrkB (NTRK2)、TrkC (NTRK3) が同定されている。神経組織の発現や神経機能の発達に不可欠な役割を果たしていると考えられている。種々の癌腫において Trk の発現異常や遺伝子変異が報告されている。これまでの研究から、TrkA は神経芽腫の予後と強く関連しており、自然退縮傾向の強い1歳未満の神経芽腫において高発現し、1歳以上の悪性増殖する神経芽腫においては著しく発現が抑制されている。一方、TrkB は予後不良な神経芽腫、特に MYCN が増幅した腫瘍において発現が高く、リガンドである BDNF、NT-4/5 も共に高く発現し、いわゆるオートクリン/パラクリン様式で腫瘍細胞の生存促進、浸潤・転移の促進に貢献している。したがって神経芽腫組織内では TrkA と TrkB のシグナルが相反する形で腫瘍のバイオロジーを制御していることになる。

我々は Shf が anaplastic lymphoma kinase (ALK) との結合を介して、神経芽腫における ALK 下流シグナルを抑制すること、すなわち細胞増殖能および遊走・浸潤能を低下させることを発見した。

2. 研究の目的

進行神経芽腫の治療成績は依然として不良であり、現在も新しい治療法の開発が求められている。Trk ファミリー受容体は予後良好群と予後不良群とにおいて発現の傾向が異なり、神経芽腫の発症や進展に関与する分子であると考えられている。そこで予後良好群で高発現する TrkB のシグナル伝達を修飾することによって神経芽腫の進行を抑制できないだろうかと考え、我々の同定したアダプター蛋白質 Shf との機能相関についての研究を着想した。

これまで Shf はほとんど未知の分子であったが、近年、その特徴が少しずつ明らかになりつつある。複数の受容体、すなわち ALK、TrkA および PDGF α 受容体と結合して働きがそれぞれ異なること、またこれらの分子がいずれも神経細胞に関連するものであることは非常に興味深い。これまでの研究を活かし、さらに発展させるものとして Shf と TrkB との相互作用に着目した。これまで Shf と TrkB との機能相関についての報告はなく、独創的な研究であるといえる。Shf が TrkB の細胞増殖、浸潤・転移のシグナルに影響を与えるという仮説の証明は、神経芽腫の新規治療薬開発および病態メカニズムの解明に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

神経芽腫細胞株 SH-SY5Y を用いて、Shf と TrkB 蛋白質相互作用を近接ライゲーションアッセイ (Proximity Ligation Assay; PLA) により検証した。

細胞は、増殖培地を用いて T-45 flask に起眠し、CO₂ インキュベーター (5%CO₂、37℃、湿潤) 内で培養した。翌日、増殖培地で培地交換し、80%コンフルエントになるまで、1~2日おきに培地交換を行った。80%コンフルエントに到達して時点で細胞を回収し、その後の試験に用いた。

未分化細胞および分化誘導した細胞について、Shf と TrkB に対する抗体を用いた近接ライゲーションアッセイ (PLA) を行った。PLA は、各抗体の Host に応じた PLA プロープを用い、Sigma-Aldrich 社で公開されているプロトコールに従って実施した。検出は、Operetta CLS で蛍光写真撮影により行った。画像データの解析は Harmony Software を用いて行った。抗体非添加条件をバックグラウンドとし、さらに PLA シグナル量を各ウェルの細胞当たりの Spot 数・Spot 面積・Spot 蛍光強度として算出した。有意差検定は Student's T-test (両側検定、対応なし) にて行い、未分化 SH-SY5Y 細胞群と RA 分化 SH-SY5Y 細胞群との比較において、p 値が 0.05 未満のものを有意と判定した。

4. 研究成果

遺伝子発現情報データベース NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) に登録されている SH-SY5Y マイクロアレイデータ (GSE9169) の再解析を行い、RA 処理による TrkB および Shf

遺伝子発現量の変化を調べた。RA 処理による Shf 発現量変化は認められなかった。一方、TrkB 発現量は、RA 処理期間に応じて増加していた。以上のことから、RA により分化処理を行った SH-SY5Y では、TrkB の発現量の増加に伴い、TrkB と Shf の相互作用がより多く観察されると推測した。そこで、予備試験では、Shf-TrkB PLA に使用する抗体条件を評価するとともに、未分化 SH-SY5Y と RA 分化 SH-SY5Y の比較を行うことで、Shf-SY5Y PLA 実験が機能しているかを評価した。

予備試験では、未分化 SH-SY5Y、RA 分化 SH-SY5Y のいずれの細胞においても、すべての抗体条件において、陰性対照よりも高い Shf-SY5Y PLA シグナルが検出された。特に高感度に PLA シグナルを検出されている条件においては、細胞あたりの PLA シグナルの Spot 数・面積・蛍光強度が、RA 分化 SH-SY5Y 細胞で高い傾向にあった。

本試験では、予備試験により決定した条件で、未分化 SH-SY5Y と RA 分化 SH-SY5Y を Shf-TrkB PLA により比較した。予備試験同様、いずれの細胞においても、一次抗体非添加条件よりも高い Shf-TrkB PLA シグナルが検出された。さらに、細胞あたりの Spot 数・面積・蛍光強度のいずれの評価指標についても、未分化 SH-SY5Y に比べ、RA 分化 SH-SY5Y において、Shf-TrkB PLA シグナルが有意に高かった。以上のことから、SH-SY5Y 細胞において、Shf と TrkB は相互作用をする蛋白質であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------