

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成 21 年度～平成 23 年度

課題番号：21591377

研究課題名(和文) 神経芽腫がん幹細胞標的治療法の開発に向けたポリコム蛋白 Bmi1 のターゲット検索

研究課題名(英文) Screening of polycomb Bmi1 targets for development of Cancer Stem Cell-targeted therapy for neuroblastoma

研究代表者 上條 岳彦 (Takehiko Kami jo)

千葉県がんセンター(研究所) 発がん研究グループ・部長

研究者番号：90262708

研究成果の概要(和文)：

ChIP アッセイによって MYCN が直接 Bmi1 プロモーターに結合することを見出し、MYCN が Bmi1 の転写を活性化することをルシフェラーゼアッセイで明らかにした。MYCN の発現誘導株 Tet21/N を用いて、MYCN 誘導が転写レベルで Bmi1 を誘導することを見出した。

さらに、Bmi1 が神経芽腫細胞の増殖を調節する重要な因子の一つであることを、Bmi1 過剰発現株で神経芽腫細胞株の増殖が促進されることで確認した。Bmi1 をノックダウンした細胞では、これらの WST-8 アッセイおよび軟寒天培地中でのコロニー形成アッセイで増殖能・コロニー形成能が低下することも示された。Bmi1 の転写抑制の標的として、がん抑制遺伝子 KIF1Bb と TSLC1 が重要であることを発現遺伝子のチップアッセイによる網羅的解析で見出した。Bmi1 の過剰発現株とノックダウン株を用いて、Bmi1 が KIF1Bb と TSLC1 の転写を阻害していることを複数の神経芽腫細胞株を用いて明らかにした (Ochiai H et al., ONCOGENE, 2010)。

網羅的スクリーニングの結果、重要ながん抑制遺伝子 RUNX3 が BMI1 の新たなターゲットである可能性が示唆された。BMI1 ノックダウンで RUNX3 転写再活性化 (de-repression) が起きるかを検討したところ、複数の細胞株で RUNX3 転写再活性化が認められた。BMI1 によるエピジェネティックな RUNX3 転写抑制が、発がん重要な現象であることが示唆された。

BMI1 ノックダウン由来アポトーシスのメカニズムを詳細に検討したところ、RUNX3 の占める役割よりも BMI1 ノックダウンによる DNA ダメージ誘導が重要な役割を行っていることを見出した。このアポトーシスは p53/p73 依存性であり、活性酸素産生が関与していた。さらに、この BMI1 ノックダウン由来アポトーシスについては、BMI1 のポリコムタンパクとしての機能が重要化が明らかにされていなかった。そこで BMI1 ノックダウンに先立ってポリコムタンパク PRC2 群の Key 分子 EZH2 または PRC1 群の Key 分子 Ring1b (ヒストン H2 ユビキチンリガーゼ) をレンチウイルスで発現し、このアポトーシスをキャンセルできるかを検討したが、部分的なものであった。BMI1 のポリコムに関連しない機能が、このアポトーシス誘導に重要である可能性が示唆された。難治性神経芽腫の分子標的療法開発に重要な知見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：

We clarified the direct binding of MYCN to Bmi1 promoter and upregulation of Bmi1 transcription by MYCN. A correlation between MYCN and polycomb protein Bmi1 expression was observed in primary NB tumors. Expression of Bmi1 resulted in the acceleration of proliferation and colony formation in NB cells. Bmi1-related inhibition of NB cell differentiation was confirmed by neurite extension assay and analysis of differentiation marker molecules. Intriguingly, the above-mentioned Bmi1-related regulation of the NB cell phenotype seems not to be mediated only by p14ARF/p16INK4a in NB cells. Expression profiling analysis using a tumor-specific cDNA microarray addressed the Bmi1-dependent repression of KIF1Bb and TSLC1,

which have important roles in predicting the prognosis of NB. Chromatin immunoprecipitation assay showed that KIF1Bb and TSLC1 are direct targets of Bmi1 in NB cells.

Further comprehensive molecular analysis indicated that RUNX3 appears to be a target of Bmi1 and its transcription was suppressed by Bmi1 in several malignancies, including neuroblastoma.

Analysis of the molecular mechanism of Bmi1-knockdown-induced apoptosis clarified that DNA damage induced by Bmi1 knockdown has an important role. This apoptosis is dependent on p53 and/or p73 and accompanied by production of reactive oxygen species. Furthermore, we studied the role of the other polycomb group molecules in the Bmi1-knockdown-induced apoptotic cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H21 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
H22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
H23 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学:内科系臨床医学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：Bmi1;小児腫瘍;ポリコーム;がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児固形悪性腫瘍では、頭蓋外では最も頻度の高い固形悪性腫瘍であり、わが国の年間発症者数は 200~250 人程度と推測されている。早期例の予後は良好な結果であるが、進行例の予後は IV 期で 40%程度と改善の余地がある。神経芽腫進行例の臨床的特徴の一つとして、初期の化学療法への反応性は良好~中等度良好な症例が多いが、化学療法施行中または終了後に再発する例が多いことが挙げられる。また、進行例では progressive disease (PD)となる例も化学療法施行中に認められ、難治化例として大きな問題となる。このように神経芽腫進行例では、難治化例および再発例に対する治療法を改善することが、臨床的に大きな課題として長年にわたって存在し続けているのが現状である。

近年、がんの難治化および再発の原因として注目されているのが“がん幹細胞”という概念である。

がん幹細胞の性質を列挙すると、1. 自己複製能を持つ、2. 分化能を持つ、3. 薬剤耐性能が高い、4. 造腫瘍能が高い、5. 通常は静止期に属しているなどのがん幹細胞によるがんの難治化、再発に関与する性質が挙げられる。このがん幹細胞を特異的にターゲットとする治療法：がん幹細胞特異的療法が開

発できれば再発がん、難治がんに対する画期的治療法となることが想定される。がん幹細胞特異的療法の開発には、がん幹細胞の特徴を把握する必要がある。このようながん幹細胞の幹細胞性を規定する分子の中で、ポリコーム遺伝子群に属する Bmi1 が注目されている。

ポリコーム蛋白質は当初ショウジョウバエの奇形 extra sex combs (esc) と Polycomb (Pc)から同定された蛋白質である。がんではポリコームは高発現し、p14ARF/p16INK4aなどのがん抑制遺伝子の転写を抑制することが知られている。

Bmi1 はポリコーム遺伝子群の中の PRC1 複合体に含まれる。PRC1 複合体の Bmi1、PRC2 複合体の EZH2, SUZ12 などのポリコームは、様々ながん腫で高発現することが報告されている。我々は神経芽腫における Bmi1 の発がん機序への役割を解明するために、この研究に 2006 年に着手した。この結果、神経芽腫細胞における Bmi1 ノックダウンが顕著な増殖抑制と腫瘍コロニー形成阻害をきたすことを見出した。さらに Bmi1 過剰発現は神経芽腫細胞の増殖促進、コロニー形成促進をもたらした。

2. 研究の目的

我々はこれまでの研究によって Bmi1 が

MYCN によってダイレクトに転写活性化され、神経芽腫細胞の増殖を調節する重要な因子の一つであることを明らかにしてきた。さらに、この増殖・造腫瘍調節に Bmi1 を含むポリコーム複合体によるクロマチン修飾の制御が重要であるという基礎的データを得ている。

そこで今回の研究では、Bmi1 を含むポリコーム複合体によるクロマチン修飾の制御がどのような遺伝子に及び、神経芽腫細胞の発がん制御にどのような影響を及ぼしているかを明らかにしたい。

Bmi1 ノックダウン神経芽腫細胞株とコントロール株の比較によって

- ①. Bmi1 ノックダウンで転写活性化 (de-repression) を受ける遺伝子及び Bmi1 過剰発現で転写抑制される遺伝子を DNA チップによって網羅的に解析する
- ②. この Bmi1 による転写制御遺伝子群を ChIP-on-chip 法または ChIP 法によって検証する。
- ③. 上記 1, 2 によって判明した候補遺伝子を RT-PCR 法、ウエスタンブロット法によって検証する。
- ④. 候補遺伝子の神経芽腫細胞における機能解析を行う。

3. 研究の方法

Lentivirus (Sigma-Aldrich) による shRNA を用いて定常 Bmi1 ノックダウン神経芽腫細胞株、または cDNA による Bmi1 過剰発現株 SK-N-BE をすでに作成してある。これらの株とコントロール株 (mock virus 感染株) の比較によって以下の実験を行う。

- ①. Bmi1 発現で転写抑制または Bmi1 ノックダウンで転写活性化 (de-repression) を受ける遺伝子を DNA チップによって網羅的に解析する。
- ②. この Bmi1 による転写制御遺伝子群を ChIP 法または ChIP-on-chip 法によって検証する。
- ③. 上記 1, 2 によって判明した候補遺伝子を、上記定常 Bmi1 ノックダウン神経芽腫細胞株を用いた RT-PCR 法、ウエスタンブロット法によって検証する。Bmi1 ノックダウンによって転写活性化 (de-repression) を受け、なおかつプロモーター領域に Bmi1 が結合する遺伝子群を同定する。この候補遺伝子群の転写レベルでの活性化を RT-PCR 法、必要に応じて Real-time RT-PCR 法で検索する。さらに蛋白レベルでの検索はウエスタンブロット法で行う。
- ④. 候補遺伝子の神経芽腫細胞における機能解析を行う。

④-1. 候補遺伝子の発現解析

まず候補遺伝子の発現を神経芽腫細胞株 (MYCN single5 株、MYCN amplified 21 株) で検討する。さらに Favorable NBs (Stage 1, age < 1, MYCN single, TrkA high) 16 腫瘍検体、Unfavorable NBs (Stage 3, 4, age > 1, MYCN amplify, TrkA low) 16 腫瘍検体で RT-PCR 法、または Real-time RT-PCR 法による発現解析を行う。

④-2. 候補遺伝子の過剰発現による機能解析

候補遺伝子を Lentivirus vector: CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd に導入する。CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd は Blasticidin による選択が可能になるので、定常発現株が容易に作成可能となる。

定常発現株で増殖測定 (WST 法、コロニー形成法、軟寒天コロニー形成法)、腫瘍形成 (免疫不全マウス) を行う。そのほか候補遺伝子独自の機能を適切な実験系で検討する。

④-3. 候補遺伝子のノックダウンによる解析

候補遺伝子に対して、Lentivirus vector による shRNA を用いたノックダウンを神経芽腫細胞株で行う。MISSIONR shRNA plasmid vector にて作成された shRNA vector 5 種の中から最適な vector を選択する。

ノックダウン株で増殖測定 (WST 法、コロニー形成法、軟寒天コロニー形成法)、腫瘍形成 (免疫不全マウス) を行う。そのほか候補遺伝子独自の機能を適切な実験系で検討する。

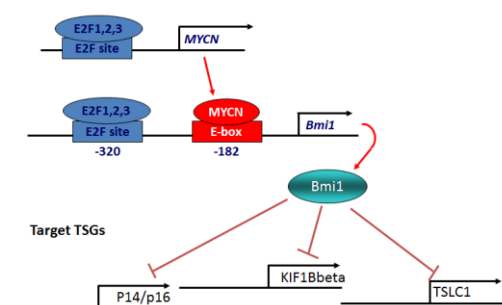
4. 研究成果

我々は、ChIP アッセイによって MYCN が直接 Bmi1 プロモーターに結合することを見出し、MYCN が Bmi1 の転写を活性化することをルシフェラーゼアッセイで明らかにした。ルシフェラーゼアッセイでは MYCN が結合する E box 配列に変異を導入して、転写活性が低下することを確認した。また、テトラサイクリンによる MYCN の発現誘導株 Tet21/N を用いて、MYCN 誘導が転写レベルで Bmi1 を誘導すること、Bmi1 の蛋白レベルでの増加に伴い同じ Polycomb 複合体 PRC1 に含まれる Ring1b が蛋白レベルで増加することを見出した。

さらに、Bmi1 が神経芽腫細胞の増殖を調節する重要な因子の一つであることを、Bmi1 過剰発現株で神経芽腫細胞株の増殖が促進されることを WST-8 アッセイおよび軟寒天培地中でのコロニー形成アッセイで確認した。Bmi1 をノックダウンした細胞では、これらの WST-8 アッセイおよび軟寒天培地中でのコロニー形成アッセイで増殖能・コロニー形成能が低下することも示された。この増殖・造腫瘍調節に Bmi1 を含むポリコーム複合体によるクロマチン修飾の制御が重要であるとい

うデータを得、Bmi1 を含むポリコーム複合体によるクロマチン修飾の制御がどのような遺伝子に及び、神経芽腫細胞の発がん制御にどのような影響を及ぼしているかを明らかにするかを検討した。その結果、Bmi1 の転写抑制の標的として、がん抑制遺伝子 KIF1Bb と TSLC1 が重要であることを発現遺伝子のチップアッセイによる網羅的解析で見出した。Bmi1 の過剰発現株とノックダウン株を用いて、Bmi1 が KIF1Bb と TSLC1 の転写を阻害していることを複数の神経芽腫細胞株を用いて明らかにした (Ochiai H et al., ONCOGENE, 2010)。

Epigenetic TSG suppression model in NB tumorigenesis



異なる Bmi1 のターゲット検索を、Lentivirus (Sigma-Aldrich) によって産生された shRNA を用いて Bmi1 ノックダウンした神経芽腫細胞株でおこなった。また Lentivirus によって BMI1 を過剰発現し、この神経芽腫細胞を用いて ChIP on chip アッセイを行った。この網羅的スクリーニングの結果、重要ながん抑制遺伝子 RUNX3 が BMI1 の新たなターゲットである可能性が示唆された。

神経芽腫細胞において、BMI1 ノックダウンで RUNX3 転写再活性化 (de-repression) が起きるかを qPCR および semi-quantitative RT-PCR で検討したところ、複数の細胞株 (神経芽腫 SH-SY5Y, NB69) で RUNX3 転写再活性化が認められた。さらに小細胞肺癌細胞株 SBC-3, QG90 でも RUNX3 転写再活性化が認められ、BMI1 によるエピジェネティックな RUNX3 転写抑制が、組織を超えた普遍的な現象であることが示唆された。

BMI1 ノックダウンによって様々な神経芽腫細胞で細胞死を誘導できることを見出している。この細胞死はアポトーシスであり、現在そのメカニズムを解析している。この BMI1 ノックダウン由来アポトーシスのメカニズムを詳細に検討したところ、RUNX3 の占める役割よりも BMI1 ノックダウンによる DNA ダメージ誘導が重要な役割を行っていることを見出した。BMI1 ノックダウンによって、まずヌードマウス移植腫瘍の顕著な増殖抑制とアポトーシス誘導を TUNEL 法で明らかにした。さらに細胞レベルの実験において BMI1

ノックダウン誘導アポトーシスに先立って、DNA ダメージの際に認められる γ -H2X の増加と、ATMSer1981 リン酸化の増加が認められることを見出した。これは神経芽腫における BMI1 ノックダウン由来アポトーシスのメカニズムとしてきわめて重要と考えられる。

上記の BMI1 ノックダウン由来アポトーシスについては、BMI1 のポリコームタンパクとしての機能が重要化が明らかにされていなかった。そこで BMI1 ノックダウンに先立ってポリコームタンパク PRC2 群の Key 分子 EZH2 または PRC1 群の Key 分子 Ring1b (ヒストン H2 ユビキチンリガーゼ) をレンチウイルスで発現し、このアポトーシスをキャンセルできるかを検討したが、部分的なものであった。BMI1 のポリコームに関連しない機能が、このアポトーシス誘導に重要である可能性が示唆された。難治性神経芽腫の分子標的療法開発に重要な知見と考えられた。

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 10 件)

1. Komatsu S, Takenobu H, Ozaki T, Ando K, Koida N, Suenaga Y, Ichikawa T, Hishiki T, Chiba T, Iwama A, Yoshida H, Ohnuma N, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author).

Ptk1 regulates liver tumor cell death by phosphorylation of Tap63.

Oncogene. 2009 Oct 15;28(41):3631-41. PMID:19668228

2. Suenaga Y, Ozaki T, Tanaka Y, Bu Y, Kamijo T, Tokuhisa T, Nakagawara A, Tamura TA.

TBP (TATA-binding Protein)-like Protein (TLP) Is Engaged in Etoposide-induced Apoptosis Through Transcriptional Activation of Human Tap63 Gene.

J Biol Chem. 2009 Dec 18;284(51):35433-40. PMID:19858204

3. Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A, Yamaguchi Y, Kimura K, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author).

Bmi1 is a MYCN target gene and regulates tumorigenesis via repression of KIF1B and TSLC1 in neuroblastoma. ONCOGENE, 2010 May 6;29(18):2681-90. Epub 2010 Mar 1. PMID:20190806

4. Iwata S, Takenobu H, Kageyama H, Koseki H, Ishii T, Nakazawa A, Tatezaki SI,

Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author).

Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma.

Cancer Sci. 2010 Jul;101(7):1646-52. PMID:20491773

5. Shi Y, Taenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Jiang LL, Kamijo T (corresponding author).

HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma
European J of Cancer, 2010 Aug;46(12):2324-34. Epub 2010 Jun 28. PMID:20591651

6. Hishiki T, Saito T, Terui K, Sato Y, Takenouchi A, Yahata E, Ono S, Nakagawara A, Kamijo T, Nakamura Y, Matsunaga T, Yoshida H.

Reevaluation of trkA expression as a biological marker of neuroblastoma by high-sensitivity expression analysis—a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute.

J Pediatr Surg. 2010 Dec;45(12):2293-8. PMID:21129533

7. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author).

CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway-modification

ONCOGENE, 2011 Jan 6;30(1):97-105. PMID:20818439

8. Li X, Isono K, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Koseki YM, Otte AP, Casanova M, Kitamura M, Kamijo T, Sharif J, Ohara O, Toyada T, Bernstein BE, Brockdorff N and Koseki H

Mammalian Polycomblike Pc12/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes.

Mol Cell Biol. 2011 Jan;31(2):351-64. PMID:21059868

9. Kimura M, Takenobu H, Akita N, Nakazawa A, Ochiai H, Shimozato O, Fujimura YI, Koseki H, Yoshino I, Kimura H, Nakagawara A, Kamijo T (corresponding author).

Bmi1 regulates cell fate via tumor

suppressor WWOX repression in small cell lung cancer cells.

Cancer Sci. 2011 May;102(5):983-990. PMID:21276135

10. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, Kamijo T, Zhang Y, Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Tomohiko Maehama T, Mori M, and Suzuki A. Regulation of the MDM2-P53 Pathway and Tumor Growth by PICT1/GLTSCR2 via Nucleolar RPL11

Nat Med. 2011 Jul 31;17(8):944-51. PMID:21804542

〔学会発表〕(計 38 件)

日本癌学会、日本小児がん学会、日本小児血液がん学会、アメリカがん学会、国際神経芽腫学会など

〔図書〕(計 2 件)

1. 上條岳彦 「血液・腫瘍性疾患 神経芽腫」、小児内科・小児外科編集委員会共編、小児内科 41 巻増刊号小児疾患診療のための病態生理 2、東京医学社
1220-1224 頁、2009

2. 上條岳彦、中村洋子、大平美紀、中川原章 「がん組織バンクとその応用研究」千葉県がんセンター/監修、癌診療ハンドブック改訂第 2 版、永井書店、
130-132 頁、2010

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chiba-cc.jp/inst/jp/organization/005.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 上條 岳彦
(Takehiko Kamijo)

研究者番号：90262708

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：