

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21591378

研究課題名(和文)新規依存性受容体 UNC5D による神経芽腫細胞死制御機構の解析

研究課題名(英文)Functional role of the dependence receptor UNC5D in regulation of cell death in neuroblastoma

研究代表者

李 元元 (LI YUANYUAN)

千葉県がんセンター(研究所)・研究局・研究員

研究者番号：00392259

研究成果の概要(和文): 予後良好な神経芽腫では、しばしば臨床経過中に腫瘍の分化や細胞死が起こり自然退縮という現象が観察されます。同様の現象は正常の神経発生の過程においても起っています。神経成長因子(NGF)の相対的に欠乏によると知られていますが、その制御機構の詳細は不明です。本研究では、NGFの除去に応じて、依存性受容体 UNC5D の細胞内部分がアポトーシス機構の重要な因子であるカスパーゼ 2/3 による切断後に細胞核内に移行し、細胞死を誘導することを明らかにしました。本研究の成果は予後不良な神経芽腫の治療法の開発に新たな切り口を提供すると期待されます。

研究成果の概要(英文): Nerve growth factor (NGF) dependency is responsible for developmentally programmed cell death (PCD) of normal peripheral neurons as well as spontaneous regression of neuroblastoma (NB), a childhood solid tumor arising from sympathoadrenal lineage. However the molecular mechanism remains elusive. In this study, we found that the dependence receptor UNC5D was involved in NGF deprivation-induced cell death in neuroblastoma through the nuclear translocation of its intracellular fragment released by caspase 2/3. Our findings indicate that UNC5D may play a critical role in accelerating cell death during regression of neuroblastoma, which could be a tool to develop new therapeutic strategies against high-risk tumors.

交付決定額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：神経芽腫、依存性受容体、アポトーシス、分化

1. 研究開始当初の背景

従来の受容体の認識と異なり、依存性受容体

はリガンド存在下で細胞の成長、分化および移動を促進するポジティブな情報伝達経路を活性化するが、非存在下では細胞死を誘導するという二面性をもつことが知られている。近年、代表的な依存性受容体である DCC および UNC5 ファミリーは存在する遺伝子座の LOH および発現低下がさまざまな腫瘍に検出され、がん抑制遺伝子として働く可能性が示唆された。最近、我々は当研究室で独自に作成した神経芽腫 cDNA ライブラリーから、神経系組織に高発現する UNC ファミリーに属する新規遺伝子として UNC5D を同定した。さらに、細胞株を用いた実験において UNC5D は、がん抑制蛋白質 p53 との相互作用を介してアポトーシスを誘導することが明らかになった (Biochem Biophys Res Commun. 370(4):594-8, 2008)。また、これまでの神経芽腫 100 例における発現解析の結果から、UNC5D の高発現は神経芽腫の良好な予後と有意に相関することが判明しており、これらの研究結果から UNC5D が神経芽腫の自然退縮や正常の神経発生過程におけるアポトーシスに密接に関連している可能性が推察された。

一方、UNC5D を含むこれまでに同定されている多くの依存性受容体の細胞内アミノ酸配列には、カスパーゼ 3 の認識サイトが存在している。そのため、カスパーゼ 3 による細胞内ドメインの切断は、依存性受容体が引き起こすアポトーシス誘導に共通の機構であることが推測される (Physiol Rev. 84(2):411-30, 2004)。しかしながら、その制御機構の詳細は不明である。

これらの研究背景から、申請者は UNC5D の細胞内ドメインがカスパーゼの切断後に細胞核内に移行して細胞死を誘導する仮説に立て、この仮説を検証することにした。

2. 研究の目的

本研究では、神経芽腫細胞死における UNC5D の役割を解明することを目的に、神経成長因子 (NGF) の欠乏による細胞死への UNC5D の関与およびその制御機構について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) UNC5D がカスパーゼによって切断されるかどうかを検討するため、UNC5D の推測されたカスパーゼの認識サイトに変異を含んだ変異体発現ベクターを作製した。それと野生型発現ベクターを用いてそれぞれ試験管内で UNC5D タンパク質を合成し、インビトロカスパーゼクリベージアッセイを行った。

(2) 切断された UNC5D の細胞内ドメインの細胞内局在を細胞分画法および免疫染色法を用いて観察した。さらに、TUNNEL 法、FACS 法およびウェスタン法を用いたアポトーシス解析により、UNC5D 細胞内ドメインがアポトーシス誘導能を有するかどうかを検討した。

(3) 細胞死における UNC5D の生理的な役割を調べるため、野性型及び UNC5D のノックアウトマウス由来の MEF 細胞を用いて、DNA 損傷応答における反応性を MTT アッセイおよびウェスタン法によって検討した。

(4) カスパーゼによる放出された UNC5D の細胞内ドメイン UnICD が転写制御能を持つかどうかを検討するため、UnICD を酵母転写活性化因子 GAL4 の DNA 結合ドメインと融合させ、GAL4-UnICD 融合タンパク質を発現するベクターを作出し、ルシフェラーゼリポーターアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) UNC5D は細胞死誘導能を持つことを見出した。

(2) NGF の除去、DNA 損傷及び TNF 等様々な処理に応じて細胞死を引き起こした場合

に、UNC5D が誘導され、切断されたことを見出した。

(3) UNC5D はカスパーゼ2と3のターゲットであることを見出した。その切断部位がD416であることを同定した。

(4) カスパーゼによる放出された UNC5D の細胞内ドメインが細胞質から核内に移行することを見出した。

(5) 細胞核内に入っていた UNC5D が転写制御能を持ち、転写因子 E2F1 と結合することで、その細胞死に関与するターゲット遺伝子の転写を促進することを見出した。

(6) 以上の結果から、UNC5D の細胞死誘導能が活性化したカスパーゼによる切断後に核内に入っていた細胞内ドメインを介して発揮すること考えられる。

本研究は、初めて神経芽腫細胞死における依存性受容体 UNC5D の関与を明らかにした。

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 2 件)

Li Y, Ohira M and Nakagawara A. 神経芽腫の遺伝学: 家族性神経芽腫と association 解析. *Pharma Medica* 2011; 29(5): 39-44 (査読無)

Yu M, Ohira M, Li Y, Niizuma H, Oo ML, Zhu Y, Ozaki T, Isogai E, Nakamura Y, Koda T, Oba S, Yu B, Nakagawara A. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Int J Oncol* 2009; 34(4): 931-938 (査読有)

DOI: 10.3892/ijco_00000219

[学会発表](計 6 件)

Yuanyuan Li et al., Functional role of dependence receptor UNC5D in the induction of spontaneous regression in

neuroblastoma. 第70回日本癌学会総会、2011年10月3日、名古屋国際会議場

Yuanyuan Li et al., Functional Role of Dependence Receptor UNC5D in Regulating Programmed Cell Death and Survival in Neuroblastoma. The 4th Cross Strait Symposium on Pediatric Oncology. 2010年11月6日、Cheung Kung Hai Conference Centre, the University of Hong Kong

Yuanyuan Li et al., Dependence receptor UNC5D and p53 are involved in the induction of spontaneous regression in neuroblastoma. 第69回日本癌学会総会、2010年9月22日、大阪国際会議場

Yuanyuan Li et al., Role of a novel inducible dependence receptor UNC5D in spontaneous regression of neuroblastoma: Its functional cooperation with p53 and E2F1 for inducing programmed cell death. *Advances in Neuroblastoma Research* 2010, 2010年6月22日、City Conference Centre, Stockholm, Sweden

Yuanyuan Li et al., Functional Role of Dependence Receptor UNC5D in Regulating Programmed Cell Death and Survival in Neuroblastoma. 第68回日本癌学会総会、2009年10月1日、パシフィコ横浜

Yuanyuan Li et al., UNC5D, a dependence receptor for netrin-1, induces apoptosis in neuroblastoma through nuclear translocation of its cleaved intracellular fragment. 第25回日本小児がん学会総会、2009年11月27日、東京ベイホテル東急

[図書](計 0 件)

[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

6．研究組織

(1)研究代表者

李 元元 (LI YUANYUAN)
千葉県がんセンター (研究所)・研究員
研究者番号：00392259

(2)研究分担者

中村 洋子 (NAKAMURA YOHKO)
千葉県がんセンター (研究所)・主席研究員
研究者番号：60260254

(3)連携研究者

中川原 章 (NAKAGAWARA AKIRA)
千葉県がんセンター (研究所)・センター長
研究者番号：50117181
原口 清輝 (HARAGUCHI SEIKI)
千葉県がんセンター (研究所)・研究員
研究者番号：10324576