

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 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790317

研究課題名（和文）細胞周期関連因子を中心とした神経芽腫発がん機構の解析

研究課題名（英文）Investigation of neuroblastoma tumorigenesis focusing on cell cycle related genes

研究代表者

村上 優子 (Yuko Murakami-Tonami)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 特任助教

研究者番号：70405174

研究成果の概要（和文）：MYCN 増幅／過剰発現と合成致死表現型を示す遺伝子として Smc2、MYCN と Synthetic に老化の表現型を示す遺伝子として Sgo1 を同定した。どちらも MYCN 増幅タイプの神経芽腫細胞株でノックダウンすると DNA 損傷を誘導した。DNA 損傷を誘導する機構として、Smc2 では、DNA 修復に必要な遺伝子の転写制御をしていることが示唆された。また、Smc2 単独でなくコンデンシン複合体が転写制御に関わっている可能性が示唆された。一方、Sgo1 では PP2A やコヒーシンが表現型に関わっている可能性が示唆されている。これらの遺伝子の発現とヒト神経芽腫患者の予後にも相関があることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We identified Smc2 and Sgo1 as genes which show synthetic lethal or senescence phenotype with MYCN amplification/overexpression. MYCN amplified neuroblastoma cell lines in which these genes are knocked down showed the accumulation of DNA damage, but MYCN single copy cells did not. Our data indicated that Smc2 regulates various DNA repair genes transcription and Sgo1 is involved in DNA damage repair cooperation with PP2A and cohesin. Additionally, Smc2 works as condensin complex in DNA repair genes transcriptional regulation. Patients bearing neuroblastomas with amplified MYCN would be benefited from decreased Smc2 and Sgo1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：神経芽腫、発がん、細胞周期、DNA 損傷、老化、合成致死

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児頭蓋外腫瘍で最多の悪性腫瘍である。発生母地は神経堤細胞とされている。研究開始当初では、神経芽腫の発原因の一つは MYCN の増幅であり、MYCN 増幅タイプの神経芽腫患者の予後は極めて悪く、有効な治療法が確立されていない状況であった（現在も確立されていない）。神経芽腫モデルマウスとして MYCN トランスジェニックマウスが確立され、ヘミ接合体がよりヒト神経芽腫モデルに近いという報告があった。このモデルマウスは当研究室でも導入されていた。また、新たな神経芽腫の原因遺伝子として ALK が発見されていた。

2. 研究の目的

MYCN 増幅タイプの神経芽腫患者に対して有効な治療法を確立する手がかりを得るために、MYCN と合成致死表現型を示す遺伝子を探索する。

合成致死とは、その遺伝子単独の変異では細胞の生存に影響を与えないが、2つの遺伝子の変異が同時に起こった場合にのみ致死表現型となるものである。このような遺伝子を探索することにより、正常細胞を傷つけることなくがん細胞のみに作用する、副作用の少ない抗がん剤を開発できる可能性がある。

本研究の場合は、MYCN の増幅／過剰発現と合成致死となる遺伝子を探索することで、MYCN 増幅タイプの神経芽腫患者における新規の分子標的となる遺伝子候補を探索することとした。

3. 研究の方法

神経芽腫モデルマウスである MYCN トランスジェニックマウスの発現アレイにおいて、がんの進行に伴って発現が上昇する遺伝子のうち、ヒト神経芽腫細胞株でも MYCN 増幅タイプのもので発現が高く、且つ、MYCN 増幅タイプでのみその遺伝子をノックダウンすると細胞の増殖が抑えられるも

のを候補遺伝子とし解析を行った。

4. 研究成果

神経芽腫モデルマウスである MYCN トランスジェニックマウスの発現アレイにおいて、がんの進行に伴って発現が上昇する遺伝子のうち、ヒト神経芽腫細胞株でも MYCN 増幅タイプのもので発現が高く、且つ、MYCN 増幅タイプでのみその遺伝子をノックダウンすると細胞の増殖が抑えられるものとして Smc2 と Sgo1 を同定した。

Smc2 (Structural maintenance of chromosomes 2) はコンデンシン複合体のサブユニットの一つであり、分裂期の染色体凝縮に必要な因子であると知られている。Sgo1 (Shugoshin 1) は PP2A (Protein phosphatase type2A) とともに働き、セントロメア付近のコヒーシン複合体の分解を制御することにより、分裂期の正確な染色体分配に必要な因子であることが知られている。

MYCN の増幅しているヒト神経芽腫細胞株においてのみ、Smc2 をノックダウンするとアポトーシスが誘導され、Sgo1 をノックダウンすると細胞老化に関連する表現型が誘導された。MYCN を過剰発現した MYCN シングルコピーの細胞でもそれぞれの遺伝子をノックダウンすることで同様の結果が得られた。それらの表現型はどちらも DNA 損傷を誘導することを介して起こることが明らかとなった。すなわち、MYCN 増幅タイプの神経芽腫細胞株でそれら候補遺伝子をノックダウンすると DNA 損傷を示唆する γ -H2AX の foci が観察されたが、MYCN シングルコピーの神経芽腫細胞株では観察されなかった。

Smc2 が DNA 損傷を誘導する機構として、DNA 修復遺伝子の転写を制御しているということが明らかとなった。すなわち、Smc2 をノックダウンすると MYCN 増幅タイプの神経芽腫細胞株でのみ DNA 修復に関わることが報告されている複数の遺伝子の転写量

が顕著に低下した。現在、転写制御されている遺伝子群が DNA 修復経路によってグループ分けできるかどうかについて探索している。また、同じくコンデンシン複合体のサブユニットである Smc4 をノックダウンしてもそれらの遺伝子の転写量が低下することから、Smc2 単独ではなく、コンデンシン複合体として機能している可能性がある。そのため、他のサブユニットについても現在検討している。また、予備的なデータであるが、Smc2 は MYCN と免疫沈降できるため、MYCN と Smc2 (あるいはコンデンシン複合体) は協同して転写制御に関わっている可能性が示唆されている。Smc2 によって転写制御されている DNA 修復関連遺伝子について、MYCN の target でもあるのかも現在検討している。

Sgo1 に関しては、オカダ酸を用いた PP2A の阻害が Sgo1 のノックダウンと同じ表現型を示すという予備的なデータが得られたことから、PP2A も Sgo1 と協同して DNA 修復に関わっている可能性が示唆されている。

また、ヒト神経芽腫患者の発現アレイデータ及び予後データを再解析したところ、Smc2 およびコンデンシン I の複合体のサブユニットに関して、MYCN 増幅タイプの患者において、それらの遺伝子の高発現が患者の予後不良と有為に相関していることが明らかとなった。Sgo1 に関しては、直接の相関は観察されなかったが、コヒーシンサブユニットである Smc3 で同様の相関が見られた。

これらのことから、Smc2 と MYCN 増幅の合成致死に関しては、コンデンシン I 複合体として関わっていること、Sgo1 に関しては、PP2A やコヒーシンと協同して DNA 修復に関わっていることが示唆された。現在、コンデンシン I のサブユニットとコンデンシン II のサブユニットでノックダウンをしたときに表現型が異なるのかどうか、また、コヒーシンのノックダウンでも Sgo1 ノックダウンと同じ表現型が得られるかどうか検討中である。

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 4 件)

1: Akai Y, Kurokawa Y, Nakazawa N, Tonami-Murakami Y, Suzuki Y, Yoshimura SH, Iwasaki H, Shirowa Y, Nakamura T, Shibata E and Yanagida M. Opposing role of condensing hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing.

Open Biol. **1**: 110023, 2011 (査読あり)

2: Huang P, Kishida S, Cao D, Murakami-Tonami Y, Mu P, Nakaguro M, Koide N, Takeuchi I, Onishi A, Kadomatsu K.

The neuronal differentiation factor NeuroD1 downregulates the neuronal repellent factor Slit2 expression and promotes cell motility and tumor formation of neuroblastoma.

Cancer Res. **71**: 2938-48, 2011 (査読あり)

3: Murakami H, Aiba H, Nakanishi M and Murakami-Tonami Y.

Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and Polo-like kinases.

Cell cycle. **9**, 3233-3242, 2010. (査読あり)

4: Shimada M, Yamamoto A, Murakami-Tonami Y, Nakanishi M, Yoshida T, Aiba H, Murakami H.

Casein kinase II is required for the spindle assembly checkpoint by regulating

Mad2p in fission yeast.

Biochem Biophys Res Commun **388**,
529-32,2009(査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

①村上(渡並)優子: 'Inactivation of hSgo1 showed synthetic phenotype to MYCN amplified cancer cells', (20111003) 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場

②村上(渡並)優子: A role of human Sgo1 on the growth of human neuroblastoma cells ' (20101208), BMB2010, 神戸ポートアイランド

③Yuko Murakami-Tonami: 'A role of human Sgo1 on the growth of human neuroblastoma cells 'ANR2010 (20100622), Stockholm City Conference Centre, Stockholm, Sweden.

〔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

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1639/1642/bunshiseibutsugaku_seitaikoubu_nshigaku.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上(渡並)優子 (Yuko Murakami-Tonami)
名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 特任
助教

研究者番号: 70405174

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし