

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：2021～2022

課題番号：21K16403

研究課題名（和文）DNAメチル化酵素の制御による神経芽腫の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for neuroblastoma by regulating DNA methyltransferase

研究代表者

青木 啓将（Aoki, Hiromasa）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・助教

研究者番号：70881845

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：臨床検体の解析より、DNMT3Bが高リスク群で高発現し、かつ発現量が予後と関連することが明らかとなった。また、DNMT3BのsiRNAや低分子化合物による阻害が神経芽腫に対して抗腫瘍効果を発揮することを明らかにすることができた。具体的には、DNMT3Bの阻害は神経芽腫におけるグローバルな脱メチル化を誘導し、アポトーシスを誘導することを明らかにできた。RNA-seqの結果、DNMT3Bの阻害はp53経路の遺伝子の発現を賦活化す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

神経芽腫の予後不良群に対しては未だ有効な治療法が確立されていないことから、有効性が高く副作用の少ない治療法を開発することが待ち望まれている。本研究により、DNMT3Bが神経芽腫の進行に関与すること、DNMT3Bの阻害が神経芽腫に対して抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。今後DNMT3Bに対してより詳細な検討（in vivo実験など）を行うことで、新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Analysis of clinical specimens demonstrated that DNMT3B exhibits high expression in high-risk groups, and its expression level is closely associated with prognosis. Additionally, we observed that suppressing DNMT3B through siRNA or small molecule compounds effectively exerts an antitumor effect on neuroblastoma. Specifically, DNMT3B inhibition induced global demethylation and apoptosis in neuroblastoma cells. Furthermore, RNA-seq analysis indicated that DNMT3B inhibition enhances the expression of genes within the p53 pathway.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：神経芽腫 DNAメチル化 DNAメチル化酵素 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は白血病、脳腫瘍、リンパ腫にらんで死亡率が高い小児がんであり、神経堤細胞を発生源として体幹の交感神経節や副腎髄質に形成される。その約4割が、自然治癒や長期生存が期待できる低-中間リスク群であるが、約6割は予後不良な高リスク群が占めている。特にMYCN遺伝子が増幅している症例は高リスク群に分類され、予後不良であることが知られている。予後不良群に対しては化学療法、手術、放射線治療などのさまざまな治療法を組み合わせた集学的治療が施行されるが、約半数しか奏功しない上、低年齢時に治療を行うため晩期合併症を患う可能性が高い。以上のことから、難治性小児がんである神経芽腫の有効性が高く副作用の少ない治療法を開発することが待ち望まれている。

近年、様々ながん種において遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドのメチル化などに代表されるエピジェネティックな変化ががんの発症や悪性化と密接に関わることが明らかとなってきた。がん細胞では増殖するために都合の悪い遺伝子、すなわちがん抑制遺伝子の発現が DNA のメチル化によって発現抑制されているケースが多い。実際に神経芽腫においてもがん抑制遺伝子や神経分化関連遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドが高頻度でメチル化されていることが明らかとなっている (Ram Kumar RM et al, 2018) (図 1)。DNA のメチル化を担っている DNMT ファミリーには、DNA 複製時にメチル化状態を娘 DNA に引き継ぐ維持メチル化酵素:DNMT1、および新たに DNA メチル化状態を付与する新規メチル化酵素:DNMT3a・DNMT3b が存在する。これら DNMT ファミリーの阻害剤である 5-アザシチジンは神経芽腫の臨床試験において一定の効果認められている。しかし、依然として決定的な治療効果は得られておらず、投与量を増やすと副作用が強くなってしまふことが問題となっている (Jubierre L et al, 2018)。そこで、神経芽腫細胞の生存や増殖に関与する特定の DNMT だけを阻害することでこれらの問題点を解決できるのではないかと考えた。

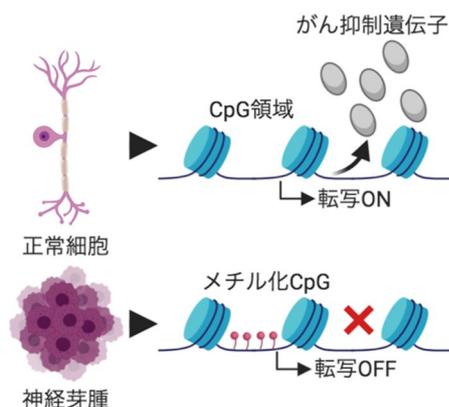


図 1: DNA メチル化と神経芽腫の関わり

DNMT ファミリーの阻害剤である 5-アザシチジンは神経芽腫の臨床試験において一定の効果認められている。しかし、依然として決定的な治療効果は得られておらず、投与量を増やすと副作用が強くなってしまふことが問題となっている (Jubierre L et al, 2018)。そこで、神経芽腫細胞の生存や増殖に関与する特定の DNMT だけを阻害することでこれらの問題点を解決できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では神経芽腫の進行に寄与する DNMT を特定し、阻害効果を検証する。有効かつ副作用の少ない新規治療法を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

各 DNMT ファミリーの siRNA、DNMT3B の選択的阻害剤である nanaomycin A を複数の神経芽腫細胞株に処理し、細胞生存率を WST-8 アッセイにより評価した。DNA の 5-メチルシトシン (5-mC) の割合は 5-mhMethylFlash Global DNA Methylation ELISA Easy Kit により測定した。アポトーシスの評価はウェスタンブロッティングにより行った。遺伝子発現解析は RT-qPCR 法または RNA-sequencing により行った。

4. 研究成果

① 各 DNMT ファミリーは神経芽腫の MYCN 増幅群、ステージ 4 で高発現する。

臨床検体のデータ解析により、神経芽腫のステージ 4 では DNMT1、DNMT3A、DNMT3B が高発現することを見出した。また、高リスク群に分類される MYCN の増幅群で DNMT ファミリーが高発現することも明らかとなった。さらに、これら DNMT ファミリーの高発現が予後不良因子となることも見出した。

② 各 DNMT ファミリーのノックダウンは神経芽腫細胞株の細胞生存率を減少させる。

代表的な神経芽腫細胞株である IMR-32 に対し、siRNA により DNMT1、DNMT3A もしくは DNMT3B をノックダウンしたところ、既に報告のある DNMT1 に加え、DNMT3A および DNMT3B のノックダウンによっても細胞生存率が低下した。DNMT1 と DNMT3A は正常組織にも一定量の発現が認められるが、DNMT3B は正常組織にはほとんど発現せず、炎症箇所や癌などで発現が上昇することが報告されている。治療の観点から正常組織での発現量が低い DNMT3B に着目して以降の研究を進めていくこととした。

③ DNMT3B 選択的阻害剤である nanaomycin A は神経芽腫細胞株の細胞生存率を減少させる。
複数の神経芽腫細胞株に対して nanaomycin A 処理によって DNMT3B の機能を阻害した結果、複数の神経芽腫細胞株 (IMR-32, TGW, GOTO) において細胞生存率を低下させた。IC₅₀ は IMR-32 が 4.6 μM、TGW が 2.4 μM、GOTO が 2.6 μM であった。

④ DNMT3B 選択的阻害剤である nanaomycin A はグローバルに DNA メチル化レベルを減少させる。
nanaomycin A が IMR-32 の 5-mC の割合を減少させるかどうかを検討した結果、容量依存的に 5-mC が減少することが確認できた

⑤ DNMT3B 選択的阻害剤である nanaomycin A は神経芽腫細胞株のアポトーシスを誘導する。
5 μM の nanaomycin A の処理によって cleaved caspase 3 および cleaved PARP が増加することをウェスタンブロッティングにより確認した。この結果より、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。

⑥ DNMT3B 選択的阻害剤である nanaomycin A は p53 経路関連遺伝子の発現を誘導する。
DNMT3B のノックダウン細胞 (IMR-32) の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析により、DNMT3B の阻害は p53 経路やアポトーシス関連遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。他にも様々な経路に関する遺伝子の発現変動が見られたので、それらも含めて詳細に検討中である。

⑦ 総括

臨床検体のマイクロアレイデータの解析より、DNMT3B が高リスク群で高発現し、かつ発現量が予後と相関することが明らかとなった。また、DNMT3B の siRNA や低分子化合物による阻害が神経芽腫に対して抗腫瘍効果を発揮することを明らかにすることができた。具体的には、DNMT3B の阻害は神経芽腫におけるグローバルな脱メチル化を誘導し、アポトーシスを誘導することも明らかにできた。RNA-seq の結果、DNMT3B のノックダウンによる阻害は p53 経路の遺伝子の発現を賦活化することが示唆された。以上より、DNMT3B が神経芽腫の進行に関わっていること、DNMT3B の阻害が神経芽腫に対して抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。現在は神経芽腫モデルマウスの腫瘍に対する DNMT3B の阻害効果を検証している段階である。また、MYCN と DNMT3B の関わりについても現在検討中である。今後 DNMT3B に対してより詳細な検討を行うことで、神経芽腫に対する新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Toriuchi Kohki, Kihara Toshie, Aoki Hiromasa, Kakita Hiroki, Takeshita Satoru, Ueda Hiroko, Inoue Yasumichi, Hayashi Hidetoshi, Shimono Yohei, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Monocyte-Derived miRNA-1914-5p Attenuates IL-1 Induced Monocyte Adhesion and Transmigration | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2829 ~ 2829 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24032829 | 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 Tozaki Yuri, Aoki Hiromasa, Kato Rina, Toriuchi Kohki, Arame Saki, Inoue Yasumichi, Hayashi Hidetoshi, Kubota Eiji, Kataoka Hiromi, Aoyama Mineyoshi | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 The Combination of ATM and Chk1 Inhibitors Induces Synthetic Lethality in Colorectal Cancer Cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 735 ~ 735 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15030735 | 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 Otsuka Yuto, Kondo Takao, Aoki Hiromasa, Goto Yoh, Kawaguchi Yohei, Waguri-Nagaya Yuko, Miyazawa Ken, Goto Shigemi, Aoyama Mineyoshi | 4. 巻 151 |
| 2. 論文標題 IL-1 promotes osteoclastogenesis by increasing the expression of IGF2 and chemokines in non-osteoclastic cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 8 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.10.007 | 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 Aoki Hiromasa, Yamashita Misaki, Hashita Tadahiro, Iwao Takahiro, Aoyama Mineyoshi, Matsunaga Tamihide | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Generation of Brain Microvascular Endothelial-like Cells from Human iPS Cell-Derived Endothelial Progenitor Cells Using TGF- Receptor Inhibitor, Laminin 511 Fragment, and Neuronal Cell Culture Supplements | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Pharmaceutics | 6. 最初と最後の頁 2697 ~ 2697 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics14122697 | 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 Takeshita Satoru, Kakita Hiroki, Asai Shimpei, Asai Takafumi, Mori Mari, Ueda Hiroko, Aoki Hiromasa, Aoyama Mineyoshi, Yamada Yasumasa | 4. 巻 93 |
| 2. 論文標題 Thrombocytopenia and insufficient thrombopoietin production in human small-for-gestational-age infants | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Pediatric Research | 6. 最初と最後の頁 619 ~ 624 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41390-022-02107-7 | 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 Kimura Yuka, Aoki Hiromasa, Soyama Tatsuki, Sakuragi Akira, Otsuka Yuto, Nomoto Akihiro, Yano Shigenobu, Nishie Hirota, Kataoka Hiromi, Aoyama Mineyoshi | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Photodynamic therapy using mannose-conjugated chlorin e6 increases cell surface calreticulin in cancer cells and promotes macrophage phagocytosis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Medical Oncology | 6. 最初と最後の頁 82 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12032-022-01674-3 | 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 Kondo Takao, Aoki Hiromasa, Otsuka Yuto, Kawaguchi Yohei, Waguri-Nagaya Yuko, Aoyama Mineyoshi | 4. 巻 149 |
| 2. 論文標題 Insulin-like growth factor 2 promotes osteoclastogenesis increasing inflammatory cytokine levels under hypoxia | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 93 ~ 99 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.03.007 | 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 Kihara Toshie, Toriuchi Kohki, Aoki Hiromasa, Kakita Hiroki, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Interleukin-1 enhances cell adhesion in human endothelial cells via microRNA-1914?5p suppression | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports | 6. 最初と最後の頁 101046 ~ 101046 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101046 | 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 Kondo Takao, Otsuka Yuto, Aoki Hiromasa, Goto Yoh, Kawaguchi Yohei, Waguri-Nagaya Yuko, Miyazawa Ken, Goto Shigemi, Aoyama Mineyoshi | 4. 巻 191 |
| 2. 論文標題 The Inducible Nitric Oxide Synthase Pathway Promotes Osteoclastogenesis under Hypoxic Culture Conditions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The American Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 2072 ~ 2079 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2021.08.014 | 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 Mizuguchi Ken, Aoki Hiromasa, Aoyama Mineyoshi, Kawaguchi Yohei, Waguri-Nagaya Yuko, Ohte Nobuyuki, Asai Kiyofumi | 4. 巻 404 |
| 2. 論文標題 Three-dimensional spheroid culture induces apical-basal polarity and the original characteristics of immortalized human renal proximal tubule epithelial cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Cell Research | 6. 最初と最後の頁 112630 ~ 112630 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112630 | 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 - |

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 鳥内暉暉、垣田博樹、青木啓将、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳 |
| 2. 発表標題 Hypothermic culture enhances secretion of astrocyte-derived neuroprotective erythropoietin. |
| 3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大塚勇斗、後藤洋、青木啓将、永谷裕子、宮澤健、後藤滋巳、青山峰芳 |
| 2. 発表標題 非破骨細胞でのケモカインとIGF2の発現上昇を介して、IL-1 は破骨細胞の形成を促進する |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大塚勇斗、後藤洋、青木啓将、永谷裕子、宮澤健、後藤滋巳、青山峰芳 |
| 2. 発表標題 IL-1 enhances osteoclastogenesis by upregulating the expressions of IGF2 and chemokines in non-osteoclastic cells |
| 3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鳥内暉暉、垣田博樹、青木啓将、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳 |
| 2. 発表標題 Neuroprotective effect of hypothermia by maintaining erythropoietin expression in astrocytes |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鳥内暉暉、垣田博樹、青木啓将、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳 |
| 2. 発表標題 低温培養によるアストロサイトのエリスロポエチン分泌亢進を介した神経保護効果 |
| 3. 学会等名 医療薬学フォーラム2021 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|