

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 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591165

研究課題名（和文）ヒト神経幹細胞を用いた神経芽細胞腫発生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Carcinogenesis of human neuroblastoma from human neural stem cell

研究代表者

青山 峰芳 (AOYAMA MINEYOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70363918

研究成果の概要（和文）：

ヒト iPS 細胞から神経幹細胞を作成し、小児の神経系腫瘍である神経芽腫に関連した癌遺伝子 N-myc を発現させることで、神経幹細胞が腫瘍化するか検討した。ヒトおよびマウス神経幹細胞から神経発生過程に一致した様々な段階の神経幹細胞の作成を試みた。さらに、N-myc 遺伝子を神経幹細胞へ遺伝子導入し、細胞増殖の変化を観察した。この成果は、正常細胞が腫瘍化するモデルを細胞レベルで再現することとなり、腫瘍発生メカニズムを解明する知見となると考える。

研究成果の概要（英文）：

We have made human neural stem cell from human iPS cell and investigated whether the induction of exogenous oncogene N-myc could transform the cell or not. We would prepare human or mouse neural stem cells at various step of the development. And N-myc genes were induced in the cells. The effect on cell proliferation was observed. These studies may reflect the cellular transformation from the normal cells to the cancer cells to clarify the mechanism of the carcinogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：神経芽細胞腫、ヒト神経幹細胞、ヒト iPS 細胞、N-myc 遺伝子、腫瘍発生

1. 研究開始当初の背景

神経芽細胞腫は小児期に発生する最多の固形腫瘍で、胎生期の神経堤細胞由来の腫瘍と考えられている。1歳以前に発症する予後良好な腫瘍と1歳以降に発症する難治

性の腫瘍が存在する。申請者はこれまでに、難治性の神経芽細胞腫において、いくつかの癌関連遺伝子を明らかにした (Aoyama et al. *Cancer Res* 2005, Ohira and Aoyama et al. *Cancer Lett* 2003,

Aoyama et al. *Cancer Lett* 2001)。がん研究振興財団リサーチレジデント在職中に神経の発生に関与するヒト新規転写制御因子 LM03 の高発現が神経芽細胞腫の悪性度の指標であり、LM03 の高発現によってヌードマウスにおいて腫瘍形成能を亢進することを明らかにした (Aoyama et al. *Cancer Res.* 65:4587-97, 2005)。同時に申請者は名古屋市立大学大学院医学研究科在学中に神経栄養因子の一つである BDNF (脳由来神経栄養因子) の高発現が予後不良因子 (Aoyama et al. *Cancer Lett* 164:51-60, 2001) と報告し、予後に関わる既知、未知の遺伝子の同定を行ってきた (Ohira et al. *Cancer Lett* 197:63-8, 2003)。さらに、名古屋市立大学大学院医学研究科助手在職中において、神経芽細胞腫における ES 細胞特異的新規 Ras ファミリー遺伝子 ERas の発現解析を行い、ERas が神経芽細胞腫に発現していることを確認し恒常活性型である ERas が PI3K/Akt シグナルを刺激し、薬剤耐性を亢進するメカニズムを明らかにした (Aoyama et al. *Oncogene* 投稿中)。さらに現在、マウス神経芽腫細胞株から腫瘍幹細胞を単離し、胎生マウスおよび成体マウスの脳から単離した神経幹細胞との共通点および相違点について解析を行っている。

多くの神経芽細胞腫に発現する癌関連遺伝子の中で、癌遺伝子 N-myc の遺伝子レベルでの増幅が多く症例で認められ、注目されている。神経芽細胞腫は治療方法の改善により全体として予後は改善してきた。一方で、N-myc 増幅例についてはなお治療に抵抗性であり、N-myc 増幅と難治性との因果関係を明らかにすることは極めて重要である。胎生期において神経発生の一時期に N-myc が発現することは細胞増殖において必須である一方、Weiss らの報告では N-myc transgenic mouse において腹腔神経節に神経芽細胞腫様の腫瘍形成が観察された (Weiss et al. *EMBO J* 1997)。このことは N-myc の持続的な発現が腫瘍形成に関与することを示唆している。現在のところ、ヒト神経芽腫細胞株に N-myc 遺伝子導入を行い、下流遺伝子の制御について解析した論文は多数存在する。一方で、正常神経系細胞から腫瘍化する段階での N-myc の関与についての報告はなく、この解析にはヒト神経幹細胞を用いた研究が必要である。連携研究者の岡田らは、マウス ES 細胞および iPS 細胞由来神経幹細胞における継代培養による細胞分化能の変化について報告した。継代培養によって生体内の発生のプログラミングと同様な *in vitro* で発生過程が再現し

ていることを明らかにした (Okada et al. *Stem Cells* 2008)。ヒト iPS 細胞においても同様に *in vitro* で胎生期のヒト神経幹細胞と成体におけるヒト神経幹細胞を再現した培養細胞を観察できると思われる。この実験系を用いることで、*in vitro* でヒト神経幹細胞から神経芽細胞腫を形成させる解析が可能になるとと思われる。

2. 研究の目的

(1) ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の継代培養による分化能の変化

ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を作製し、継代培養を繰り返し、*in vitro* で神経発生過程を再現する。すでにマウス iPS 細胞で報告にあるように、継代を重ねるごとに、神経細胞およびグリア細胞への分化能の違いを解析し、神経発生過程に一致した神経幹細胞が作製されたことを確認する。

(2) ヒト神経幹細胞への N-myc 遺伝子の導入による感受性の違い

発生初期・後期および出生後の発生段階を反映した神経幹細胞に癌遺伝子 N-myc をレトロウイルスベクターによって導入し、腫瘍様変化を観察する。*in vitro* の実験系を用いて、細胞増殖能の亢進、神経分化誘導の抵抗性、足場非依存性細胞増殖の亢進を観察する。これまでに、報告された神経芽細胞腫の腫瘍関連遺伝子の発現変化についても観察する。

(3) N-myc 遺伝子により腫瘍化した神経幹細胞の生体内での腫瘍形成能

N-myc を恒常的に発現するようになったヒト神経幹細胞を免疫不全マウス SCID mouse の皮下および腹腔内に投与して、腫瘍形成能の有無を3ヶ月にわたって観察する。生体内で腫瘍形成の有無について観察する。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の作製

申請者は再生医療実現化プロジェクトに参加し、連携研究者の岡野らが確立したヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を作製する技術を習得し、本学において培養系を確立した。本研究では、得られた神経幹細胞をニューロスフェアと呼ばれる浮遊細胞の塊として培養を維持する。継代培養を繰り返し、*in vitro* で神経発生過程を再現する。細胞分化能の解析について

は、ニューロスフェアをマトリゲルコートによって接着性を獲得したカバーガラス上に移し培養を開始する。特定の栄養因子(塩基性線維芽細胞増殖因子 FGF2 および白血病抑制因子 LIF) を除去することによって1週間かけて分化誘導を行う。その後、神経細胞およびグリア細胞に対する特定の細胞マーカーを認識する抗体を用いて細胞染色を行い、蛍光顕微鏡によって観察する。継代数による神経細胞およびグリア細胞への分化能の違いを解析し、神経のみに分化する段階(発生初期)、グリア細胞を含むようになる(発生後期)、その後の細胞(出生後)の神経幹細胞が順次作製できていることを確認する。

(2) レトロウイルスを用いた N-myc 遺伝子の導入

癌遺伝子 N-myc を直接ヒト細胞に感染させることを避けるため、高橋らがヒト iPS 細胞を作製する際に用いた方法と同様に N-myc 遺伝子を導入することを試みる(Takahashi et al. *Cell* 2007)。すなわち、レトロウイルスに感染する際に必須なマウス受容体 Slc7a1 遺伝子が発現ベクターにより発現している高橋らと同一の細胞を用いる。マウスとラットのみに感染する ecotropic なレトロウイルスを用いて N-myc 遺伝子を様々な継代数の神経幹細胞に感染させる。同時に導入細胞であることを示すために EGFP 遺伝子も導入する。この技術については連携研究者の澤本らがすでに実験系を確立している。得られた N-myc 遺伝子を導入された様々な発生段階を反映した神経幹細胞の *in vitro* での腫瘍化を観察する。1、細胞増殖能の亢進については MTT アッセイを用いて観察する。2、神経分化誘導の抵抗性については細胞染色によって観察する。3、足場非依存性細胞増殖の亢進については soft agar アッセイを用いて観察する。これまでに、報告された神経芽細胞腫の腫瘍関連遺伝子の発現変化についても定量的 RT-PCR によって観察する。

4. 研究成果

申請者はヒト iPS 細胞からヒト神経幹細胞を作成し、神経幹細胞に癌遺伝子である N-myc を恒常的に発現させることで、正常細胞である神経幹細胞が腫瘍化し、神経芽細胞腫様に変化する可能性の有無について検討した。この成果は、正常細胞が腫瘍化するモデルを *in vitro* で再現することとなり、腫瘍発生メカニズムを解明する知見となると考えている。2010 年度において、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を作製する技術を習得し、本培養系を確立した。得られた神経幹細胞をニューロスフェアと呼ばれる浮遊細胞の塊

として培養を維持した。継代培養を繰り返して、神経幹細胞の分化能の変化について、細胞染色を用いて解析した。ニューロスフェアをマトリゲルコートによって接着性を獲得したカバーガラス上に移し培養を開始した。特定の未分化維持因子(塩基性線維芽細胞増殖因子 FGF2 および白血病抑制因子 LIF) を除去することによって1週間かけて分化誘導を行った。10 世代以上の継代培養ののちも、神経幹細胞の分化能は神経のみに分化する状態であった。マウス神経幹細胞では2世代目の神経幹細胞がすでにグリア細胞への分化能を獲得しているのと比べ、ヒト神経幹細胞では分化能の変化に長期間必要とすることが明らかになった。2011 年度からは、様々な発生段階の *in vitro* モデルとなる神経幹細胞を準備するため、特定の未分化維持因子(FGF2 および LIF) を除去するタイミングを工夫する事で神経細胞のみでなく、グリア細胞へも分化誘導させることを試みた。しかし、ヒト神経幹細胞では10 世代以上を重ねても依然として神経細胞のみに分化した。現状では、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞ではなく、マウス神経幹細胞を用いた実験から基礎的データを蓄積する方針とした。また、N-myc 遺伝子を神経幹細胞へ遺伝子導入するためのベクターを packaging 細胞に導入し、レトロウイルスベクターの作製に成功した。ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞に感染させたところ神経幹細胞内での発現誘導は確認できなかった。この点についても、マウス神経幹細胞を用いた実験から基礎的データを蓄積する方針とした。2012 年度からは、マウス神経幹細胞を用いた実験を中心に行った。マウス神経幹細胞は継代を重ねるとグリア細胞への分化能が亢進した。N-myc 遺伝子を神経幹細胞へ遺伝子導入するためのレトロウイルスベクターの作製し、発現誘導を試みた。コントロールベクターを用いて発現誘導を確認することができたが、N-myc タンパクの発現誘導は確認できなかった。おそらく、N-myc タンパクの細胞内での不安定性が関与したと思われる。細胞の増殖能についてもコントロール群と有意なちがいは観察されなかった。現在、比較的安定的な変異型 N-myc の遺伝子導入するためのレトロウイルスベクターの作成を試みている。

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 11 件)

- ① Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Asai H, Hussein MH, Suzuki M, Kato S, Saitoh S, Asai K. Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced phagocytosis of cultured microglia via nitric oxide production. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;268:99-105. doi: 10.1016/j.taap.2013.01.024. (査読有)
- ② Asai H, Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Saitoh S, Asai K. Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced aquaporin-4 expression in cultured astrocyte. *Cell Mol Neurobiol.* 2013;33:393-400. doi:10.1007/s10571-013-9905-z. (査読有)
- ③ Aoyama M, Kakita H, Kato S, Tomita M, Asai K. Region-specific expression of a water channel protein, aquaporin 4, on brain astrocytes. *J Neurosci Res.* 2012;90:2272-80. doi: 10.1002/jnr.23117. (査読有)
- ④ Kako E, Kaneko N, Aoyama M, Hida H, Takebayashi H, Ikenaka K, Asai K, Togari H, Sobue K, Sawamoto K. Subventricular zone-derived oligodendrogenesis in injured neonatal white matter in mice enhanced by a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *Stem Cells.* 2012;30:2234-47. doi: 10.1002/stem.1202. (査読有)
- ⑤ Ikuta K, Waguri-Nagaya Y, Kikuchi K, Yamagami T, Nozaki M, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. The Spl transcription factor is essential for the expression of

gliostatin/thymidine phosphorylase in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R87. doi: 10.1186/ar3811. (査読有)

⑥ Kubota E, Kataoka H, Tanaka M, Okamoto Y, Ebi M, Hirata Y, Murakami K, Mizoshita T, Shimura T, Mori Y, Tanida S, Kamiya T, Aoyama M, Asai K, Joh T. Eras enhances resistance to CPT-11 in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2011;31:3353-60.

URL:<http://ar.iijournals.org/content/31/10/3353.abstract?sid=e5d47b05-cd31-42a5-bde8-b06e203b8a8f>. (査読有)

⑦ Kato S, Aoyama M, Kakita H, Hida H, Kato I, Ito T, Goto T, Hussein MH, Sawamoto K, Togari H, Asai K. Endogenous erythropoietin from astrocyte protects the oligodendrocyte precursor cell against hypoxic and reoxygenation injury. *J Neurosci Res.* 2011 Oct;89(10):1566-74. doi: 10.1002/jnr.22702. (査読有)

⑧ Aoyama M, Kataoka H, Kubota E, Tada T, Asai K. Resistance to chemotherapeutic agents and promotion of transforming activity mediated by embryonic stem cell-expressed Ras (ERas) signal in neuroblastoma cells. *Int J Oncol.* 2010;37:1011-6.

URL:<http://www.spandidos-publications.com/ijo/37/4/1011> (査読有)

⑨ Yamagami T, Waguri-Nagaya Y, Ikuta K, Aoyama M, Asai K, Otsuka T. FK506 inhibition of gliostatin/thymidine phosphorylase production induced by tumor necrosis factor- α in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol Int.* 2011;31:903-9. doi:10.1007/s00296-010-1411-8. (査読有)

⑩ Kubota E, Kataoka H, Aoyama M, Mizoshita T, Mori Y, Shimura T, Tanaka M, Sasaki M, Takahashi S, Asai K, Joh T. Role of ES cell-expressed Ras (ERas) in tumorigenicity of gastric cancer. *Am J Pathol.* 2010;177:955-63.

doi:10.2353/ajpath.2010.091056. (査読有)

⑪ Nagahara M, Waguri-Nagaya Y, Yamagami T, Aoyama M, Tada T, Inoue K, Asai K, Otsuka T. TNF-alpha-induced aquaporin 9 in synoviocytes from patients with OA and RA. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49:898-906. doi:10.1093/rheumatology/keq028. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

① 青山峰芳、垣田博樹、加藤晋、富田愛美、浅井隼人、長屋嘉顕、浅井清文. 脳内部位により異なるアストロサイトでのアクアポリン4の発現. 第17回グリア研究会 2012.10.2 神戸

② Asai H, Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Asai K. Diclofenac enhances aquaporin4 expression in cultured astrocyte with proinflammatory cytokine treatment. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry 2012.9.30 Kobe, Japan

③ 青山峰芳、垣田博樹、長屋嘉顕、鈴木美恵子、浅井清文. アストロサイト由来エリスロポエチンのオリゴデンドロサイト前駆細胞への細胞障害抑制効果. 第35回日本神経科学大会 2012.9.20 名古屋

④ 後藤洋、福岡逸人、中尾公久、青山峰芳、野村隆之、宮澤健、浅井清文、後藤滋巳. 低酸素刺激は insulin-like growth factor 2 (IGF2) 発現を誘導し、微小環境を調整することで破骨細胞形成を促進する. 第30回日

本骨代謝学会学術集会 2012.7.21 東京

⑤ 垣田博樹、青山峰芳、加藤晋、浅井隼人、長屋嘉顕、齋藤伸治、浅井清文. ジクロフェナックがミクログリアの iNOS/NOx 産生と活性化に及ぼす影響について. 第115回日本小児科学会学術集会

2012.4.22 福岡

⑥ Masuda T, Aoyama M, Misumi S, Nishigaki R, Sawamoto K, Asai K, Hida H. Extensive neuronal fibers in the white matter were detected after neural stem cell transplantation to periventricular leukomalacia model rat. *Neuroscience 2011, the Society for Neuroscience 41st Annual Meeting 2011.11.14 Washington, DC, U.S.A.*

⑦ 青山峰芳、垣田博樹、長屋嘉顕、浅井隼人、鈴木美恵子、浅井清文. ジクロフェナックナトリウムがミクログリアの食能に及ぼす影響-インフルエンザ感染に伴う脳症悪化のメカニズム-. 第16回グリア研究会 2011.10.22 名古屋

⑧ 飛田秀樹、増田 匡、青山峰芳、三角吉代、澤本和延、浅井清文. 脳室周囲白質軟化症モデルラットへのマウス ES 細胞由来神経幹細胞移植による APC 陽性細胞数の回復. 第16回グリア研究会 2011.10.22 名古屋

⑨ 片岡洋望、久保田英嗣、田中守、森義徳、志村貴也、青山峰芳、高橋智、浅井清文、城卓志. ES 細胞特異的 Ras, ERas は Epithelial-Mesenchymal transition を介して胃癌の肝転移を促進する. 第70回日本癌学会学術総会 2011.10.3 名古屋

⑩ 青山峰芳、片岡洋望、久保田英嗣、浅井清文. ES 細胞特異的 Ras (ERas) シグナルと神経芽細胞腫における薬剤耐性獲得

の関与. 第 70 回日本癌学会学術総会

2011.10.3 名古屋

⑪ 青山峰芳、加藤晋、垣田博樹、浅井隼人、長屋嘉顕、浅井清文. 内在性エリスロポエチンのオリゴデンドロサイト前駆細胞への細胞保護効果. 第 54 回日本神経化学学会大会 2011.9.23 加賀

⑫ 中口加奈子、金子奈穂子、青山峰芳、岡田洋平、浅井清文、岡野栄之、澤本和延. ヒト iPS 細胞由来新生ニューロンの虚血性傷害脳における挙動の解析. 第 34 回日本神経科学大会 2011.9.17 横浜

⑬ 増田匡、青山峰芳、三角吉代、西垣瑠里子、澤本和延、浅井清文、飛田秀樹. 脳室周囲白質軟化症モデルラットにおける移植神経幹細胞の細胞分化. 第 34 回日本神経科学大会 2011.9.17 横浜

⑭ 三角吉代、上田佳朋、増田匡、藤田政隆、青山峰芳、浅井清文、澤本和延、飛田秀樹. マウス iPS 細胞からのオリゴデンドロサイト分化誘導. 第 34 回日本神経科学大会 2011.9.17 横浜

⑮ 加古英介、金子奈穂子、増田浩、青山峰芳、戸苅創、藤田義人、祖父江和哉、澤本和延. 脳低酸素虚血における白質傷害と再生医療の可能性. 第 15 回日本神経麻酔・集中治療研究会 2011.8.6 名古屋

⑯ 野村隆之、福岡逸人、青山峰芳、中尾公久、後藤洋、宮澤健、浅井清文、後藤滋巳. 低酸素刺激による IGF2 産生増加を介した破骨細胞分化促進効果. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 2011.7.28 大阪

⑰ 増田匡、青山峰芳、三角吉代、澤本和延、浅井清文、飛田秀樹. 脳室周囲白質軟化症モデルにおける幹細胞由来神経幹細胞の生着と神経分化. 神経組織の成長・再生・移植研究会 第 26 回学術集会 2011.6.25 東京

⑱ 青山峰芳、加藤晋、垣田博樹、戸苅創、

浅井清文. アストロサイト由来エリスロポエチンがオリゴデンドロサイト前駆細胞に与える影響. 第 15 回グリア研究会 2010.10.23 福岡

⑲ Aoyama M, Kakita H, Kato S, Harry GJ, Asai K. Region-specific expression of a water channel protein, aquaporin 4, on astrocyte in the central nervous system. Glia World 29th Naito Conference 2010.10.6 Shonan, Kanagawa

⑳ 青山峰芳、大原健太郎、藤田政隆、垣田博樹、加藤晋、浅井清文. 培養アストロサイトへの長期アンモニア刺激による細胞外グルタミン酸の上昇. Neuro2010 2010.9.2 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 峰芳 (AOYAMA MINEYOSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 70363918

(2) 研究分担者

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 70212462