

**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 6 月 21 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：22791017

研究課題名（和文）ハイスループット探索を用いた難治性神経芽腫のがん幹細胞標的療法の開発

研究課題名（英文）Identification of tumor stem-specific transcription factor in neuroblastoma sphere

研究代表者

竹信 尚典 (TAKENOBU HISANORI)

千葉県がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・研究員

研究者番号：60392247

研究成果の概要（和文）：

神経芽腫に発現している幹細胞マーカーCD133は、細胞の分化の抑制、造腫瘍能を更新させる機能を持つとともに、神経芽腫幹細胞を多く含むスフェアで発現が上昇する事が明らかになった(ONCOGENE, 2011)。そこで、神経芽腫スフェア特異的に発現する転写因子の網羅的な探索を行った結果、転写因子 TFX の発現がスフェア特異的に上昇することを明らかにした。TFX は CD133 のプロモーターに直接結合して発現誘導するだけでなく、細胞の増殖および造腫瘍性の亢進、神経芽腫スフェア形成の効率の上昇に寄与した。これらの結果から、TFX が神経芽腫のがん幹細胞性の維持に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We reported that CD133 suppressed differentiation in NB cells and CD133 was up-regulated in NB sphere (ONCOGENE, 2011). To identify the sphere specific transcription factors, we examined expression of several transcription factors in NB spheres. The expression pattern of the TFX transcription factor was correlated with that of CD133 during NB tumor sphere formation. Furthermore, TFX directly bound to CD133 promoter region and up-regulated CD133 expression, cell proliferation and NB sphere forming efficiency. These results suggest that tumor sphere specific transcription factor TFX may contribute to maintenance of tumor initiating cells and their characteristics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：幹細胞, 発がん, 分化

## 1. 研究開始当初の背景

正常組織の発生および再生組織幹細胞によるものであるように、がんにおいても発がんや再発、転移には、"がん幹細胞"が必要である証拠が、近年多数報告された。がん幹細胞の持つ性質は、1) 少数の細胞でがんを形成する発がん能力を持つこと、2) 性質の異なった細胞への分化する能力を持つこと、3) 薬剤に対して他の細胞よりも高い耐性能力を持つことなどから、Stemness を獲得した特殊な細胞といえる。悪性のがんが、しばしば再発や転移を引き起こす原因は、がん幹細胞が治療後も残存していることによるものであると考えられている。このことから、がん幹細胞の分離しその性質を明らかにし、それに対する新規の治療法を開発することは、難治性がんの克服には必須である

## 2. 研究の目的

がんの幹細胞性に関わる分子は、発がんやがんの未分化性を制御し、がんの悪性化に関わっている可能性が高い。神経芽腫のスフェアには神経芽腫幹細胞が多く含まれることが知られており、この研究に用いることが非常に有用であると考えられる。そこで、(1) 神経芽腫スフェアにおける CD133 の発現様式を明らかにする (2) 神経芽腫スフェアで特異的に働いている遺伝子を同定する。 (3) スフェア特異的な遺伝子ががん幹細胞におよぼす機能を明らかにすることで、がん幹細胞特異的分子を標的とした新規治療法の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 神経芽腫スフェアで上昇する CD133 の発現誘導機構を探索するため、スフェア形成前と形成後の細胞から RNA を回収する。CD133 の転写調節に関わるプロモーターおよび、exon 1 は複数報告されているため、いずれのプロモーター・exon が使用されているのかを明らかにする。

(2) スフェア特異的な CD133 のプロモーター領域について、部分的欠失変異体を作成し、転写活性化能を検討して、CD133 の発現に重要な領域を絞り込む。

(3) スフェア特異的な CD133 のプロモーター領域に結合する転写因子について、データベースを用いて選択する。結合しうる転写因子の発現を、神経芽腫スフェア形成前後で調べ、スフェア特異的な転写因子を同定する。

(4) 神経芽腫スフェア特異的な遺伝子をクローニングし、神経芽腫細胞に導入して細胞増殖、造腫瘍能、スフェア形成能への影響を検討する。また、shRNA の導入によって、遺伝子の発現量を低下させ、スフェア形成能への影響を確認する。

## 4. 研究成果

CD133 等への発現誘導に関わるメカニズムについて検討する。

### 4. 研究成果

(1) スフェアを形成した神経芽腫では、CD133 の報告されている 5 つの exon 1A~E のうち exon 1A から特異的に転写され、その上流領域のプロモーターP1 が使用されていることを見出した。

(2) プロモーターP1 の 5' 側または 3' 側を欠損した変異体のうち、5' 側を欠損した 1.1kbp は神経芽腫細胞において転写活性が確認した。

(3) プロモーターP1 の 1.1kb のフラグメントの配列特異的に結合する転写因子をデータベースから 15 種選択し、それぞれのプライマーを作成した。それらを用いて、スフェア形成前後の神経芽腫細胞の発現解析を行ったところ、転写因子 TFX の発現が特異的に上昇していることが明らかになった。

(4) TFX の cDNA をクローニングし、レンチウイルスで神経芽腫細胞へ安定導入を行ったところ、平板、軟寒天中および、ヌードマウス中において細胞増殖・造腫瘍能の亢進が見られた。また、shRNA の導入によって、神経芽腫スフェアの形成効率の低下が occur することから、TFX はスフェア形成のキー分子の一つであることが予想された。さらに、TFX の高発現は神経芽腫の悪性の予後が相関することから、TFX は悪性の神経芽腫におけるがん幹細胞特異的遺伝子であることが予想された。

(5) CD133 のプロモーターP1 に TFX が結合して転写促進をしていることを確認するため、TFX の cDNA の導入による転写活性化の検討を行った。TFX の導入によって、CD133 の発現量は RNA およびタンパク質で増加し、CD133 プロモーターP1 を用いた in vitro の転写活性化も確認された。さらに TFX による ChIP アッセイの結果、CD133 プロモーターP1 への直接結合も確認され、TFX が CD133 を介して神経芽腫の幹細胞性に関わっていることが明らかになった。これらのことから、神経芽腫幹細胞において TFX による CD133 発現制御機構が悪性化に関わっており、新たな治療のターゲットとなりうることが示唆された。

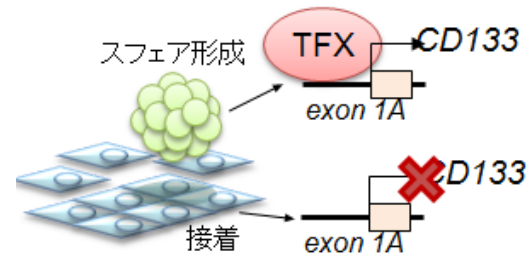


図. 本研究のまとめ

(5) 神経芽腫スフェア特異的な遺伝子が、

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. Iwata S, Takenobu H, Kageyama H, Koseki H, Ishii T, Nakazawa A, Tatezaki S, Nakagawara A, Kamijo T. Polycomb group molecule PHC3 regulates polycomb complex composition and prognosis of osteosarcoma. *Cancer Sci.* 101(7):1646-1652

2. Shi Y, Takenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Jiang LL, Kamijo T. HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 46(12):2324-2334.

3. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamijo T. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene* 2011, 6:30(1):97-105.

4. Kimura M, Takenobu H, Akita N, Nakazawa A, Ochiai H, Shimozato O, Fujimura Y, Koseki H, Yoshino I, Kimura H, Nakagawara A, Kamijo T. Bmi1 regulates cell fate via tumor suppressor WWOX repression in small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 102(5):983-990

[学会発表] (計 10 件)

1. 竹信尚典, 下里修, 落合秀匡, 山口陽子, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, CD133 regulates signal transduction pathways and prevents differentiation via RET suppression in neuroblastoma cells. *Advances of Neuroblastoma Research* 2010, 2010年6月, ストックホルム

2. 竹信尚典, 下里修, 落合秀匡, 山口陽子, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, CD133 regulates neuroblastoma stemness via p38MAPK and PI3K/Akt activation. 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月, 大阪

3. 竹信尚典, 下里修, 山口陽子, 秋田直洋, 吉田早哉香, 落合秀匡, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, CD133 はシグナル経路依存的に受容体 RET の転写抑制を引き起こし、神経芽腫の増殖と分化を制御する, 2010年12月, 大阪

4. 竹信尚典, 上條岳彦, 幹細胞マーカー CD133 は細胞内シグナル活性化を介して神経芽腫の増殖と分化を制御する, 第116回小児血液腫瘍懇話会, 2011年5月, 東京

5. 竹信尚典, 下里修, 秋田直洋, 山口陽子,

吉田早哉香, 中川原章, 上條岳彦, CD133 plays roles in keeping the undifferentiated status of human colon cancer cells via PI3K/AKT activation, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月, 名古屋

6. 竹信尚典, 下里修, 秋田直洋, 山口陽子, 吉田早哉香, 落合秀匡, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, 神経芽腫/脳腫瘍スフェア特異的な CD133 発現調節機構, 第53回日本小児血液・がん学会, 2011年11月, 前橋

7. 竹信尚典, 下里修, 秋田直洋, 山口陽子, 上原悠, 藁谷美雪, 吉田早哉香, 落合秀匡, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, Tumor sphere specific CD133 regulation in neuroblastoma, *Advances of Neuroblastoma Research* 2012, 2012年6月, トロント

8. 竹信尚典, 下里修, 秋田直洋, 山口陽子, 上原悠, 藁谷美雪, 吉田早哉香, 落合秀匡, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, Tumor sphere specific CD133 regulation in neuroblastoma, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月, 札幌

9. 竹信尚典, 下里修, 秋田直洋, 山口陽子, 上原悠, 藁谷美雪, 吉田早哉香, 落合秀匡, 大平美紀, 中川原章, 上條岳彦, Identification of key molecules that regulate neuroblastoma sphere formation, 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年11月, 横浜

10. 竹信尚典, CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification, 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年11月, 横浜

[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.chiba-cc.jp/inst/jp/organizatio>

n/005.html

<http://kamijo-labo.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

( )

研究者番号：

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：