

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591540

研究課題名(和文) Rabファミリー低分子量G蛋白質の神経芽腫がん幹細胞の発生・分化における機能解明

研究課題名(英文) Role of Rab family small G proteins in the development of neuroblastoma cancer stem cells

研究代表者

西村 範行(Nishimura, Noriyuki)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00322719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：半数以上が再発する高リスク神経芽腫患者の長期生存率は未だ40%に達しておらず、その予後改善には、再発の起源と考えられる神経芽腫がん幹細胞の発生・分化機構の理解が不可欠である。本研究では、細胞内小胞輸送の中心的な制御因子であるRabファミリー低分子量G蛋白質(Rab)に注目して、神経芽腫がん幹細胞において発現が誘導され、その発生・分化を制御するRabのメンバーを同定した。

研究成果の概要(英文)：More than 50% of high-risk neuroblastoma patients have experienced tumor relapses caused by chemoresistant cancer stem cells (CSCs). Consequently, their overall survival rates remain less than 40%. To improve their prognosis, it is essential to understand the molecular mechanism of how CSCs are generated and maintained in neuroblastoma. In the present study, we have focused on the key regulators of membrane traffic, Rab family small G proteins (Rabs), and identified a member of Rabs controlling the development of neuroblastoma CSCs.

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 がん幹細胞 MRD Rab

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、小児がん死亡の約 1/6 を占める代表的な小児難治性固形がんであり、特に 50%以上が再発する高リスク群患者の予後改善は、現在の小児がん医療における緊急の課題である。がん細胞集団の中の少数の自己複製能と多分化能を持つがん幹細胞が、その他多くのがん細胞を産み出すことが明らかになり、実際、神経芽腫細胞株および患者検体から神経芽腫がん幹細胞が単離された。その結果、神経芽腫の再発は、治療によっても残存し潜んでいたがん幹細胞の再活性化によるものと考えられるようになった。

治療抵抗性のがん幹細胞は、臨床的には微小残存病変(MRD)として捉えられており、この MRD を正しく評価することが、がん患者の予後改善に必須だと考えられる。腫瘍細胞特異的な遺伝子の同定されていない神経芽腫では、正常細胞に比して腫瘍細胞で高発現する遺伝子をマーカーとした MRD 評価法が報告されてきた。最初に、tyrosine hydroxylase (TH) 遺伝子が、神経芽腫 MRD マーカーとして報告されたが、TH 陰性症例が少なからず存在することが明らかになった。次に、paired-like homeobox 2b (PHOX2B) がより高感度な MRD マーカーとして報告されたが、PHOX2B にも、極少数ながら陰性症例の存在が指摘された。そこで、複数のマーカーを組み合わせたより偽陰性の少ない MRD 評価法が、多くのグループから報告された。しかし、報告するグループ毎に、組み合わせるマーカー遺伝子自体が異なっており、臨床的な MRD 評価法は確立されていなかった。

神経芽腫がん幹細胞の正確な起源は未だ明らかになっていないが、ホルモンや神経伝達物質の分泌を司り、接着分子/軸索ガイダンス分子の移動や膜成分の再配置を制御する細胞内小胞輸送は、神経芽腫がん幹細胞の発生・分化に必須の役割を果たすと予想される。細胞内小胞輸送の中心的な制御系である Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rab) は、特定の膜ドメインに局在する 60 以上のメンバーから構成され、細胞内小胞輸送の特異性・選択性を制御している。各 Rab のメンバーは、GTP と結合した活性型または GDP と結合した不活性型として存在する分子スイッチであり、GTP 結合型 Rab が標的蛋白質 (複合体) と特異的に結合することによって、その作用を発揮している。Rab の活性化・不活性化は、GDP/GTP 交換因子 (Rab GEF)、GTPase 活性化蛋白質 (Rab GAP)、GDP 解離抑制因子 (Rab GDI) によって時空間的に制御されている。Rab の活性制御の破綻は、多数のヒト疾患の原因となり、がんの発症・進展に関与する例も明らかになってきた。

研究代表者らは、これまでに Rab GDI の神経特異的に発現するアイソフォームを同定し、神経芽腫患者検体における発現を報告してきた。また、小胞体からゴルジ体への小胞輸送における輸送シグナルを同定し、その作

用機構を解明してきた。さらに、上皮細胞の極性・接着の制御機構に注目して、タイトジャンクションを構成する接着分子の細胞内小胞輸送を制御する Rab13 およびその新規標的蛋白質 JRAB を同定し、Rab によるがん細胞の浸潤・転移の制御機構の一端を明らかにしてきた。そこで本研究では、Rab に注目して、神経芽腫がん幹細胞の発生・分化機構の解明を試みた。

2. 研究の目的

高リスク神経芽腫における再発の起源と考えられるがん幹細胞の発生・分化機構の理解を目指して、細胞内小胞輸送の中心的な制御系である Rab の機能解析を行なった。

3. 研究の方法

(1) 神経芽腫患者検体の採取・収集

神戸大学病院、兵庫県立子ども病院および神戸大学小児科関連病院から神経芽腫症例を広く集める体制を構築し、患者・家族の同意を得て生検腫瘍組織、骨髄穿刺液、末梢血、末梢血幹細胞を収集した。

(2) 神経芽腫がん幹細胞の単離

神経芽腫細胞株は、神経系の形質を示す N-type、基質接着性を示す S-type、両者の中間の形質を示す I-type に分けられている。神経芽腫がん幹細胞に最も近いと考えられる I-type 神経芽腫細胞株 BE(2)-C 細胞、および患者検体から樹立した神経芽腫細胞をスフェアとして培養することによって、ヌードマウスに移植すると神経芽腫を形成する神経芽腫がん幹細胞を単離した。

(3) Rab の発現解析

通常培養した神経芽腫細胞およびスフェアとして培養した神経芽腫がん幹細胞から RNA を抽出し、Rab の全メンバーの発現をリアルタイム RT-PCR によって定量した。

(4) Rab の機能解析

Rab を過剰発現、およびノックダウンした BE(2)-C 細胞を樹立して、スフェア形成能を解析した。さらに、軟寒天培地コロニー形成能、免疫不全マウスでの腫瘍形成能を解析した。

(5) 神経芽腫 MRD の評価

スフェアとして培養した BE(2)-C 細胞 (がん幹細胞) における MRD マーカー遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で検証し、MRD マーカー遺伝子発現の基準値を設定した。骨髄、末梢血、末梢血幹細胞における 11 の MRD マーカー遺伝子 (CHRNA3, CRMP1, DBH, DCX, DDC, GABRB3, GAP43, ISL1, KIF1A, PHOX2B, TH) 発現を定量し、いずれかのマーカーが基準値以上の発現を示すとき MRD 陽性と判定し

た。

4. 研究成果

(1) 神経芽腫がん幹細胞の発生・分化に関わる Rab の同定

神経芽腫がん幹細胞において発現が誘導され、スフェア形成、コロニー形成、および免疫不全マウスに移植した際の腫瘍形成を制御する Rab のメンバーを同定した。

(2) 神経芽腫患者の MRD モニタリング

兵庫県立子ども病院で診断・治療された神経芽腫患者 14 名から採取した 93 検体（骨髄 73 検体、末梢血 12 検体、末梢血幹細胞 8 検体）の MRD を評価した。

患者背景

Age	< 18 months	2
	> 18 months	12
Sex	Male	9
	Female	5
Risk	High-risk	12
	Intermediate-risk	1
	Low-risk	1
Diagnosis	Primary tumor	9
	Relapsed tumor	5
Origin	Adrenal gland	8
	Others	6

各MRDマーカーの感度

	BM (n = 73)	PBSC (n = 12)	PB (n = 8)
CHRNA3	10	0	0
CRMP1	14	0	1
DBH	22	0	0
DCX	9	0	2
DDC	14	0	0
GABRB3	3	0	1
GAP43	9	0	0
ISL1	14	0	0
KIF1A	11	2	1
PHOX2B	33	0	0
TH	12	0	0

クリニカルテストとの相関

		MRD Positive	MRD Negative
BM cytology	Positive	10 (100%)	0
	Negative	30 (48%)	33 (52%)
Urinary VMA	>15µg/mgCre	25 (56%)	20 (44%)
	≤15µg/mgCre	20 (45%)	24 (55%)
Urinary HVA	>30µg/mgCre	24 (56%)	19 (44%)
	≤30µg/mgCre	21 (46%)	25 (54%)
Serum NSE	>20ng/ml	28 (57%)	21 (43%)
	≤20ng/ml	17 (42%)	23 (58%)

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) Hartomo TB, Kozaki A, Hasegawa D, Pham TVH, Yamamoto N, Saitoh A, Ishida T, Kawasaki K, Kosaka Y, Ohashi H, Yamamoto T, Morikawa S, Hirase S, Kubokawa I, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Iijima K, Matsuo M, Nishio H, and Nishimura N. Minimal residual disease monitoring in neuroblastoma patients based on the expression of a set of real-time RT-PCR markers in tumor-initiating cells. *Oncol. Rep.* (2013) 29: 1629-1636. (査読有) DOI: 10.3892/or.2013.2286.

(2) Pham TVH, Hartomo TB, Lee MJ, Hasegawa D, Ishida T, Kawasaki K, Kosaka Y, Yamamoto T, Morikawa S, Yamamoto N, Kubokawa I, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Iijima K, Matsuo M, Nishio H, and Nishimura N. Rab15 alternative splicing is altered in spheres of neuroblastoma cells. *Oncol. Rep.* (2012) 27: 2045-2049. (査読有) DOI: 10.3892/or.2012.1731.

(3) Nishimura N, Hartomo TB, Pham TVH, Lee MJ, Yamamoto T, Morikawa S, Hasegawa D, Takeda H, Kawasaki K, Kosaka Y, Yamamoto N, Kubokawa I, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Iijima K, Matsuo M, and Nishio H. Epigallocatechin gallate inhibits sphere formation of neuroblastoma BE(2)-C cells. *Environ. Health Prev. Med.* (2012) 17: 246-251. (査読有) DOI: 10.1007/s12199-011-0239-5

(4) Nishimura N, Pham TVH, Hartomo TB, Lee MJ, Hasegawa D, Takeda H, Kawasaki K, Kosaka Y, Yamamoto T, Morikawa S, Yamamoto N, Kubokawa I, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Nishio H, and Matsuo M. Rab15 expression correlates with retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Oncol. Rep.* (2011) 26: 145-151. (査読有) DOI: 10.3892/or.2011.1255

〔学会発表〕(計4件)

(1) Nishimura N, Hartomo TB, Pham TVH, Yamamoto N, Hirase S, Hayakawa A, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Takeshima Y, Iijima K, and Nishio H. Induction of ALDH1A2 expression is critical for cancer stem cell properties in neuroblastoma. *AACR Annual Meeting 2014*. San Diego, CA, USA, April 5-9, 2014

(2) Hartomo TB, Pham TVH, Yamamoto N, Hirase S, Hayakawa A, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Takeshima Y, Iijima K, Nishio H, and Nishimura N. Identification of ALDH1A2 as a critical ALDH isoform in neuroblastoma cells with cancer stem cell phenotype. *AACR Special Conference: Pediatric Cancer at the Crossroads*. San Diego, CA, USA, November 3-6, 2013

(3) 田中愛子, 長谷川大一郎, Tri Budi Hartomo, 山本暢之, 宮田憲二, 越智聡史, 斎藤敦郎, 山下達也, 石田敏章, 川崎圭一郎, 松尾雅文, Thi Van Huyen Pham, 大橋浩基, 森健, 矢内友子, 早川晶, 竹島泰弘, 小阪嘉之, 飯島一誠, 西尾久英, 西村範行. 神経芽腫症例における multiple real-time RT-PCR marker を用いた微小残存病変 (MRD) 解析 **第54回日本小児血液・がん学会学術集会** (口演) 横浜, 2012年11月30日-12月2日

(4) 西村範行, Tri Budi Hartomo, 李明鎮, 長谷川大一郎, 小阪嘉之, 早川晶, 竹島泰弘, 飯島一誠, 松尾雅文, 西尾久英. 茶カテキンの神経芽腫がん幹細胞に対する抗がん作用の検討 **第82回日本衛生学会学術総会** (口演) 京都, 2012年3月24-26日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 範行 (Nishimura Noriyuki)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 00322719

(2) 研究分担者

早川 晶 (Hayakawa Akira)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 40379376

(3) 連携研究者

西尾 久英 (Nishio Hisahide)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 80189258