

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590376

研究課題名(和文) MYCNがん遺伝子と協調的表現型を示す遺伝子の探索～新規神経芽腫治療法をめざして

研究課題名(英文) Screening for the genes which shows synergistic phenotype with MYCN-With the aim of new molecular target of neuroblastoma

研究代表者

村上 優子(渡並優子)(Murakami-Tonami, Yuko)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・主任研究員

研究者番号：70405174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：MYCNと合成致死表現型を示す遺伝子として、染色体の凝集に関わるSMC2を同定し、SMC2がMYCNと協同しDNA修復因子の転写制御をしているという新規機能を明らかとした(Cell Cycle, 13(7)：1115-31, 2014)。MYCNの過剰発現と合成致死表現型を示す遺伝子をshRNAライブラリーを用いてスクリーニングした。また、スクリーニングで得られた候補遺伝子群から確実に表現型を示す遺伝子を選り出すための手法の開発の一端を担った(Bioinformatics, 29(23)：3053-59, 2013)。

研究成果の概要(英文)：We identified SMC2, a subunit of condensin complex, as a candidate gene which shows synergistic lethal phenotype with MYCN amplification/overexpression. In addition, we found SMC2 regulates expression of DNA repair genes cooperation with MYCN (Cell Cycle, 13(7)：1115-31, 2014). To find further candidate genes, we screened for the genes which showed synthetic lethal phenotype with MYCN overexpression using shRNA library in neuroblastoma cells. We also improved the method of discovering combinatorial interactions using survival data (Bioinformatics, 29(23)：3053-59, 2013).

研究分野：細胞周期

キーワード：神経芽腫 合成致死 DNA損傷修復 MYCN

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は乳幼児で一番多くみられる頭蓋外固形腫瘍であり、外科的治療及び化学療法や放射線治療を施してもその半数近くは死に至る難治性疾患である。神経芽腫では myc 遺伝子ファミリーの一つ MYCN の遺伝子増幅をはじめとした種々の遺伝子の変化が報告され、MYCN の増幅は神経芽腫の予後の悪さと密接な関係があると考えられている。

2. 研究の目的

従来の抗がん剤や放射線治療法の問題点の一つは、がん細胞を死滅させる以外に分裂している正常細胞も死滅させることで種々の副作用がでることである。がん細胞を特異的に死滅・老化させることができる方法が開発できたら副作用が少なくなると考えられる。そこで、MYCN と合成致死(あるいは synergistic な)表現型を示す遺伝子を探索するスクリーニングを行い、MYCN が増幅した細胞だけを選択的に死滅・老化させることができる遺伝子を同定し、その分子機構を解明するとともに治療法への応用を目指す。

3. 研究の方法

MYCN を過剰発現させた神経芽腫細胞株とコントロール細胞にゲノムワイドの shRNA library を感染させ、MYCN 過剰発現細胞でのみ増殖が悪くなる遺伝子を同定する。その結果をもとに、個別に遺伝子をノックダウンし表現型を確認する。次に、公開されている遺伝子発現プロファイルと予後データを再解析し、候補遺伝子が MYCN 増幅タイプの神経芽腫患者の予後にも影響を与えていることを確認する。また、候補遺伝子が MYCN と synthetic な表現型を示す機構を生化学的・分子生物学的に解析する。

4. 研究成果

MYCN の増幅と合成致死表現型を示す遺伝子を神経芽腫細胞株を用いてゲノムワイドの shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。

準備として最初に使用する細胞株を作成

した。具体的には、MYCN が single copy の神経芽腫細胞株 SH-EP にコントロールベクター及び MYCN 過剰発現用のプラスミドをレンチウィルスを用いて導入し、セルソーターで導入された細胞だけを選別した。次にこれらの細胞へのライブラリーウィルスの感染効率を測定し、実際に感染させるウィルス量を決定した。それらの準備を終えた上で shRNA ライブラリーを感染させ、ゲノムを回収し、shRNA に対応するバーコード配列を PCR で増幅した後アレイ解析を行い候補遺伝子の抽出を行った。これらの行程は計画通り北海道システムサイエンス(株)及び名古屋工業大学の竹内博士の協力を得た。

スクリーニングで得られた候補遺伝子群から確実に表現型を示す遺伝子を確率よく選び出すための手段の開発の一端を担った。具体的には、予後データを用いて、全遺伝子の中から合成致死表現型を示す二つの遺伝子の組み合わせを予測するアルゴリズムの開発に加わった。この成果をまとめたものは *Bioinformatics* 誌に掲載された (*Bioinformatics*, **29** (23): 3053-9, 2013)。

MYCN と synergistic な表現型を示す候補遺伝子として、染色体の凝集に関わるコンデンシンのサブユニット SMC2 (Structural Maintenance of Chromosome 2) の機能解析を行った。具体的には、1) SMC2 をノックダウンすると MYCN を過剰発現させた神経芽腫細胞のみアポトーシスを起こした、2) MYCN を過剰発現させると SMC2 の発現が上昇し、また、SMC2 遺伝子の中にある E-box に MYCN が結合したことから、SMC2 が MYCN の新規標的遺伝子であることが示唆された、3) SMC2 をノックダウンすると MYCN 過剰発現細胞のみが DNA 損傷を起こしており、その原因は 4) SMC2 が MYCN とともに DNA 損傷修復因子の幾つかの転写制御をしているためであった。また、実際の神経芽腫患者予後についても MYCN 増幅と SMC2 の低発現は合成致死表現型を示唆する結果が得られたことから、予後判定のマーカー及び分子標的候補になると考え、特許出願を行った(出願特許、2012-104857)。また、これらの成果をまとめて論文発表も行った

(Cell Cycle, 13 (7) : 1115-31, 2014)

さらに、MYCN と synergistic な表現型を示すもう一つの候補遺伝子として SGO1 を同定しており、その分子機構の解析に取り組んだ。具体的には、1) SGO1 をノックダウンすると MYCN を過剰発現させた神経芽腫細胞のみ細胞増殖を停止した、2) MYCN を過剰発現させると SGO1 の発現が上昇し、また、SGO1 遺伝子のプロモーター中にある E-box に MYCN が結合したことから、SGO1 が MYCN の新規標的遺伝子であることが示唆された、3) SGO1 をノックダウンすると MYCN 過剰発現細胞のみが DNA 損傷を起こしていた。また、実際の神経芽腫患者およびその他のがんについて TCGA を用いて調べたところ、神経芽腫においては MYCN の発現と SGO1 の発現は正の相関にあり、その他のがん種においても、MYC が過剰発現しているものに関して SGO1 の発現が高い傾向にあった。これに関しては現在論文投稿の準備を進めている。

本研究課題に関連する、細胞周期の制御因子 wee1 の減数分裂時の転写制御について筆頭著者として (Cell Cycle, 13 (18) : 2853-2858, 2014) 神経芽腫の予後因子及び分化制御因子 PES1 の機能解析について共著者として論文報告を行った (Cancer Science, 106 (3) 237-43, 2015)

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)

Nakaguro M, Kiyonari S, Kishida S, Cao D, Murakami-Tonami Y, Ichikawa H, Takeuchi I, Nakamura S, Kadomatsu K., The nucleolar protein PES1 is a marker of neuroblastoma outcome and is associated with neuroblastoma differentiation., *Cancer Science*, 査読有、**106** 巻、2015 年、p237-43. doi: 10.1111/cas.12598.

Murakami-Tonami Y, Ohtsuka H, Aiba H, Murakami H., Regulation of wee1+

expression during meiosis in fission yeast., *Cell Cycle*, 査読有、**13** 巻、2014 年、p2853-2858. doi: 10.4161/15384101.

Murakami-Tonami Y, Kishida S, Takeuchi I, Katou Y, Maris JM, Ichikawa H, Kondo Y, Sekido Y, Shirahige K, Murakami H, Kadomatsu K., Inactivation of SMC2 shows a synergistic lethal response in MYCN-amplified neuroblastoma cells., *Cell Cycle*, 査読有、**13** 巻、2014 年、p1115-31. doi: 10.4161/cc.27983.

Duverle D, Takeuchi I, Murakami-Tonami Y, Kadomatsu K, Tsuda K., Discovering Combinatorial Interactions in Survival Data., *Bioinformatics*, 査読有、**29** 巻、2013 年、p3053-59. doi:10.1093/bioinformatics/btt532.

[学会発表] (計 6 件)

村上 (渡並) 優子、SGO1 は MYCN がん遺伝子増幅細胞において DNA 損傷応答を制御する、第 36 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Yuko Murakami-Tonami, Inactivation of SMC2 shows a synergistic lethal response in MYCN-amplified neuroblastoma cells, *Advances in Neuroblastoma Research Congress 2014*, 2014 年 5 月 15 日、ケルン (ドイツ)

Yuko Murakami-Tonami, Inactivation of Smc2 shows synergistic lethal response to MYCN amplification by regulating DNA damage response genes transcription in neuroblastoma cells, *EMBO conference: The DNA damage response in cell physiology and disease*, 2013 年 10 月 9 日、アテネ (ギリシア)

村上 (渡並) 優子、SMC2 は DNA 損傷修復に関連する遺伝子の転写を制御し、

神経芽腫において MYCN と合成致死性を示す、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

Yuko Murakami-Tonami, Inactivation of hSgo1 showed synthetic phenotype to MYCN amplified cancer cells , Advances in Neuroblastoma Research Congress 2012、2012 年 6 月 20 日、トロント（カナダ）

村上(渡並)優子, Smc2 shows synthetic phenotype with MYCN through transcriptional regulation of DNA repair genes、第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：MYCN 増幅型疾患のための分子標的及びその利用

発明者：門松健治・村上優子

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：C 1 2 N

番号：2012-104857

出願年月日：2012 年 5 月 1 日

国内外の別：国内

〔その他〕

招待講演：村上(渡並)優子、MYCN 増幅と合成致死表現型を示す遺伝子の探索～神経芽腫をモデルとして、薬学会東海支部特別講演会、2014 年 7 月 16 日、愛知県名古屋市

ホームページ：
http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi_shuyo/index.html#member

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上（渡並） 優子（Yuko Murakami-Tonami）

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学部・主任研究員

研究者番号：70405174

(2)研究分担者

門松 健治（Kenji Kadomatsu）

名古屋大学・大学院医学系研究科・生物化学講座分子生物学・教授