

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700957

研究課題名(和文) ヒト小児神経芽腫の病態に類似する新たな神経芽腫マウスモデルの解析

研究課題名(英文) Neuroblastoma mouse model developing metastatic tumors

## 研究代表者

末永 雄介 (Suenaga, Yusuke)

千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノムセンター・研究員

研究者番号：80581793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫において、がん遺伝子MYCNは増幅し、過剰発現することで悪性化に寄与する。これまでの研究において我々はMYCNと共に増幅する遺伝子であるNCYM遺伝子がヒトとチンパンジーなど限られた種にのみ存在することを見出していた。発がんモデルであるMYCN トランスジェニックマウスは神経芽腫の治療法の評価に用いられてきたが、発生する神経芽腫は、転移能が低く、治療感受性であり、ヒトの病態を反映しない。そこで、本研究ではNCYMとMYCNを交感神経系に過剰発現する新規の発がんマウスモデルを作製した。このマウスモデルは高頻度に転移し、治療抵抗性を示すなど、よりヒトの病態を反映することが示された。

研究成果の概要(英文)：MYCN oncogene has a central role in the genesis and progression of neuroblastomas, and its amplification is associated with an unfavorable prognosis. We have found that NCYM, a MYCN cis-antisense RNA, is evolutionally conserved only in the taxonomic group containing humans and chimpanzees and that the NCYM gene encodes a functional protein in humans. MYCN transgenic mice, which express human MYCN in sympathoadrenal tissues, spontaneously develop neuroblastomas. However, unlike human neuroblastoma, distant metastasis is infrequent. We established MYCN / NCYM double transgenic mice as a new animal model for studying neuroblastoma pathogenesis. We found that NCYM expression promoted both the metastasis and chemo-resistance of the neuroblastomas formed in the double transgenic mice. These results demonstrate that the MYCN / NCYM transgenic mouse may be a suitable model for the screening of the new drugs against high-risk neuroblastomas.

研究分野：分子生物学、腫瘍学

キーワード：NCYM MYCN neuroblastoma OCT4 Myc-nick stem cell transgenic mouse metastasis

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトに発生する神経芽腫はマウスモデルに発生する神経芽腫の病態と異なる

神経芽腫は交感神経節や副腎から発生する小児がんである。がん遺伝子 *MYCN* が増幅している神経芽腫は特に悪性度が高く、高頻度に転移し、その長期生存率は約 30% と非常に低い。1997 年、交感神経節にヒト *MYCN* を特異的に過剰発現する *MYCN* トランスジェニックマウス (*MYCN Tg* マウス) が作出され (Weiss et al., *EMBO J* 1997)、現在に至るまで神経芽腫研究の主要な発がんモデルとして使用されてきた。しかし、*MYCN Tg* マウスに自然発生する神経芽腫は以下に挙げる点でヒト神経芽腫の病態に類似しないことが明らかになっている。

- ① ヒト神経芽腫は転移するが、*MYCN Tg* マウスではほとんど転移しない。
- ② ヒトの神経芽腫は化学療法に対して抵抗性だが、*MYCN Tg* マウスでは化学療法によりほぼ 100% 治ってしまう。

これらの事実は既存の神経芽腫マウスモデルである *MYCN Tg* マウスはヒトの神経芽腫を反映せず、治療法の探索や評価には不十分であることを示している (図 1)。

(2) *NCYM* 遺伝子はヒトとチンパンジーにのみ存在する遺伝子である

*NCYM* は *MYCN* 遺伝子領域から逆向きに転写されるアンチセンス転写産物として報告されたが (Krystal et al., *Mol. Cell Biol.* 1990)、その機能は全く明らかではなかった。研究開始当初、申請者らは *NCYM* について次の 3 点を明らかにしていた。

- ① *NCYM* は *MYCN* と共に遺伝子増幅し、神経芽腫の予後不良群で過剰発現する。
- ② *NCYM* タンパク質は、ヒトとチンパンジーにのみコードされる。ヒト科に属する動物の中でもヒト、チンパンジーでは共に 109 アミノ酸残基をコードし、保存

性が高いものの (96% の同一性)、オランウータンなど他の動物種での保存性は極めて低い。マウスはコドンの読み枠が保存されておらず、タンパク質をコードしない。

- ③ *NCYM* タンパク質は *MYCN* と結合し、*MYCN* を安定化することでがん細胞の生存を維持する。

以上の結果から、*NCYM* はヒトとチンパンジーにのみ存在する機能タンパク質であり、*MYCN* を安定化することで神経芽腫の生存を維持することが明らかになった。

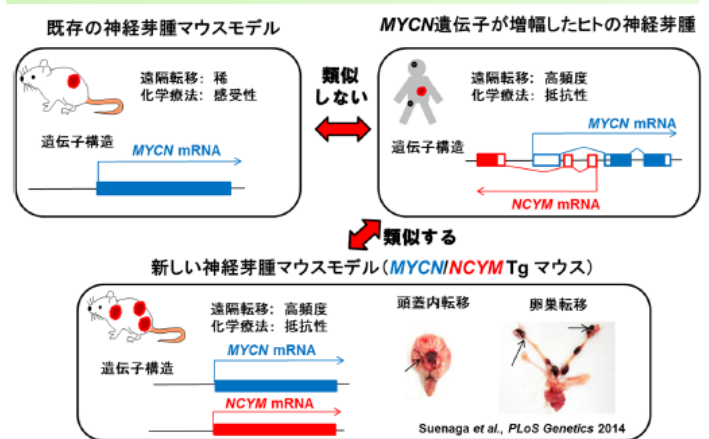
2. 研究の目的

本研究では生体内において *NCYM* が神経芽腫の悪性化に寄与するかを調べることを目的とし、新規発がんマウスモデルの構築とその解析を行った。

3. 研究の方法

今までのマウスモデルである *MYCN Tg* は rat tyrosine hydroxylase (*TH*) promoter により交感神経節および副腎髄質に特異的に *MYCN* を発現するが、*NCYM* を発現しない (図 1)。そこで我々は rat *TH* promoter 下流に *MYCN* および *NCYM* が発現するダブルトランスジェニックマウスを作出し、ヒト神経芽腫の *MYCN* 増幅例により類似した遺伝子構造を持つマウス (以下 *MYCN/NCYM Tg* マウスを

図1. *MYCN/NCYM Tg* は遠隔転移を高頻度に発症する



作成した (図 1、特許出願中)。

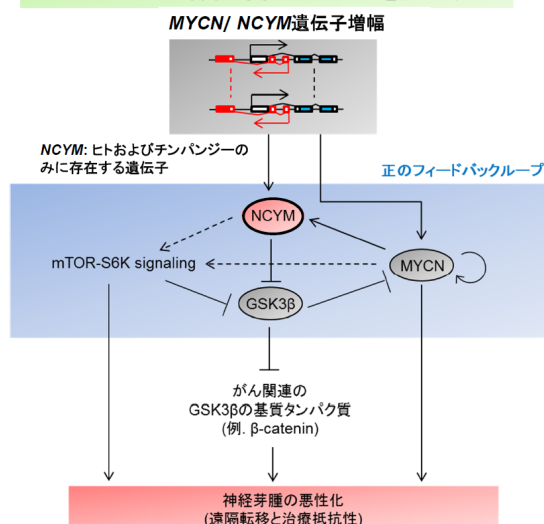
#### 4. 研究成果

**MYCN Tg** マウスでは発生した神経芽腫のうち、5%ほどしか転移巣を伴わないが、**MYCN/NCYM Tg** マウスは約 30%で転移巣を伴った。また、**MYCN Tg** マウスに発生した腫瘍と比較して、**MYCN/NCYM Tg** マウスで発生した腫瘍ではがん遺伝子産物である **MYCN** および  $\beta$ -catenin が安定化していた。さらにこれらがん遺伝子産物の分解を促進する上流制御因子である **GSK3 $\beta$**  が恒常的にリン酸化され、抑制されていた。細胞株を用いた実験により **NCYM** は **GSK3 $\beta$**  と結合し、**MYCN** のリン酸化を抑制することで **MYCN** を安定化することが示唆された。

近年開発された **PI3K/ mTOR** 阻害剤 (**NVP-BEZ235**)により **MYCN Tg** を治療すると、腫瘍が縮小し、生存率が上昇することが報告されていた (**Chanthery et al., Sci. Transl. Med.** 2012)。**PI3K** および **mTOR** 経路の阻害は **GSK3 $\beta$**  のリン酸化を抑制することで **MYCN** を安定化する。そこで、**MYCN/NCYM Tg** マウスに対し同様の治療をしたところ、抵抗性を示し、生存率の上昇はみられなかった。これは、阻害剤による **GSK3 $\beta$**  の活性化が **NCYM** の過剰発現により打ち消されたためと考えられた。

これらの結果から、**NCYM** はヒトにおいて神経芽腫の悪性化を促進する因子であることが示された (図 2, **Suenaga et al., PLOS Genetics** 2014)。本論文は、*Nat. Rev. Cancer* 誌の Research Highlight に紹介され (*Nat. Rev. Cancer* 14, 155, 2014)、*New York Times* 誌のニューヨーク版にて新聞報道された (*New York Times*, page D1, the New York edition, April 29, 2014)。

図2. **NCYM**は神経芽腫の悪性化を促進する



#### 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 3 件)

1. Kaneko Y., Suenaga Y. #, Islam R., Matsumoto D., Nakamura Y., Ohira M., Yokoi S., Nakagawara A. #, Functional interplay between MYCN, NCYM and OCT4 promotes aggressiveness of human neuroblastomas, *Cancer Sci., in press.*

#Corresponding author. (査読有り)

2. Shoji W., Suenaga Y. #, Kaneko Y., Islam R., Alagu J., Yokoi S., Nio M., Nakagawara A. #, NCYM promotes calpain-mediated Myc-nick production in human MYCN-amplified neuroblastoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 461, 501-506, 2015.

#Corresponding author. (査読有り)

3. Suenaga Y., Islam R., Alagu J., Kaneko Y., Kato M., Tanaka Y., Kawana H., Hossain S., Matsumoto D., Yamamoto M., Shoji W., Itami M, Shibata T, Nakamura Y., Ohira M., Haraguchi S., Takatori A,

Nakagawara A., *NCYM*, a *cis*-antisense gene of *MYCN*, encodes a *de novo* evolved protein that inhibits GSK3 $\beta$  resulting in the stabilization of *MYCN* in human neuroblastomas, *PLoS Genetics* 10, e1003996, 2014. (査読有り)

[学会発表] (計 23 件)

平成 26 年度

1. 末永 雄介, 庄子 涉, イスラム ラフィクル, アラグー ジェニファー, 金子 伊樹, 加藤 護, 田中 祐吉, 川名 秀忠, ホセイン シヤミム, 伊丹 真紀子, 柴田 龍弘, 中村 洋子, 大平 美紀, 原口 清輝, 横井 左奈, 中川原 章, *MYCN* のアンチセンス遺伝子から進化した *de novo* gene である *NCYM* はヒトの神経芽腫において *MYCN* 機能を制御する, 第 37 回日本分子生物学会, 平成 26 年 11 月 25 日~11 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
2. Yusuke Suenaga, Wataru Shoji, Rafiqul Islam, Jennifer Alagu, Yoshiki Kaneko, Mamoru Kato, Yukichi Tanaka, Hidetada Kawana, Shamim Hossain, Makiko Itami, Tatsuhiro Shibata, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Seiki Haraguchi, Sana Yokoi, Akira Nakagawara, *NCYM*, a *de novo* gene evolved from *MYCN* *cis*-antisense genes, encodes a protein regulating *MYCN* functions in human neuroblastomas, The 9th 3R symposium, 平成 26 年 11 月 17 日~11 月 21 日, 御殿場高原ホテル (静岡県・御殿場市)
3. 末永 雄介, 庄子 涉, ラフィクル イスラム, アラグー ジェニファー, 金子 伊樹, 加藤 護, 田中 祐吉, 川名 秀忠, シヤミムホセイン, 伊丹 真紀子, 柴田 龍弘, 中村 洋子, 大平 美紀, 原口 清輝, 横井 左奈, 中川原 章, *MYCN* のアンチセンス遺伝子から進化した *de novo* 遺伝子産物である *NCYM* はヒトの神経芽腫において *MYCN* 機能を制御する, 第 87 回日本生化学会, 平成 26 年 10 月 15 日~10 月 18 日, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
4. 末永 雄介, 神経芽腫における *de novo* gene *NCYM* の機能, 平成 26 年 7 月 23 日, 独立行政法人国立がん研究センター (東京都・中央区)
5. 末永 雄介, *MYCN* のアンチセンス遺伝子である *NCYM* は *MYCN* 機能の制御を

介して神経芽腫の悪性化に寄与する, 平成 26 年 7 月 17 日, 独立行政法人放射線医学総合研究所 (千葉県・千葉市)

6. Yusuke Suenaga, Mamoru Kato, Tatsuhiro Shibata, and Akira Nakagawara, *NCYM*, a *cis*-antisense gene of *MYCN*, is a *de novo* evolved gene, *Advances in Neuroblastoma Research 2014*・平成 26 年 5 月 13 日~16 日・ケルン (ドイツ)
7. Yoshiki Kaneko, Yusuke Suenaga, S. M. Rafiqul Islam, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira and Akira Nakagawara, *NCYM* maintains stemness via the induction of OCT4 expression in neuroblastoma, *Advances in Neuroblastoma Research 2014*, 平成 26 年 5 月 13 日~16 日, ケルン (ドイツ)
8. Wataru Shoji, Yusuke Suenaga, S. M. Rafiqul Islam, Masaki Nio, Akira Nakagawara, *NCYM* promotes production of Myc-nick in neuroblastoma, *Advances in Neuroblastoma Research 2014*, 平成 26 年 5 月 13 日~16 日, ケルン (ドイツ)

平成 25 年度

9. Yoshiki Kaneko, Yusuke Suenaga, S. M. Rafiqul Islam, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, *NCYM* induces OCT4 via stabilization of *MYCN* in neuroblastoma, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日~10 月 5 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
10. Yusuke Suenaga, S.M. Rafiqul Islam, Jennifer Alagu, Mamoru Kato, Yukichi Tanaka, Hidetada Kawana, Shamim Hossain, Daisuke Matsumoto, Mami Yamamoto, Wataru Shoji, Makiko Itami, Tatsuhiro Shibata, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Seiki Haraguchi, Atsushi Takatori and Akira Nakagawara, *NCYM*, a *cis*-antisense gene of *MYCN*, is a TAp63 target gene that encode a *de novo* evolved protein stabilizing *MYCN* in human neuroblastoma, 6th p63/p73 International Workshop 2013 年 9 月 15 日~9 月 18 日, かずさアカデミアパーク (千葉県・木更津市)
11. Yoshiki Kaneko, Yusuke Suenaga, S. M. Rafiqul Islam, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, *NCYM* induces OCT4 via

the stabilization of MYCN in human neuroblastoma, 平成 25 年度 がん若手研究者ワークショップ・平成 25 年 9 月 4 日～9 月 7 日、蓼科グランドホテル滝の湯 (長野県・茅野市)

12. S.M. Rafiqul Islam, Yusuke Suenaga, Atsushi Takatori, Yasuji Ueda, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, Transgene-Free Reprogramming of Human Neuroblastoma Cells, CiRA International Symposium 2013, Raising the Next generation of Stem Cell Research, 平成 24 年 3 月 11 日～3 月 12 日、京都大学(京都市・京都市) .

平成 24 年度

13. 庄子 渉、末永 雄介、Rafiqul S.M. Islam、仁尾 正記、中川原 章、NCYM は神経芽腫において Calpain による Myc-nick 産生を促進する、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、平成 24 年 11 月 30 日～12 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

14. Yoshiki Kaneko, Yusuke Suenaga, Islam S.M. Rafiqul, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira and Akira Nakagawara, NCYM, a MYCN antisense gene product, induces OCT4 and regulates cell sphere formation in neuroblastoma, 第 71 回日本癌学会学術総会, 平成 24 年 9 月 19 日-9 月 21 日, ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

15. 末永 雄介、八巻 智洋、ジェニファーアラゲー、高取 敦志、金子 伊樹、松本 大介、モハマド・シャミン・ホセイン、エスエム ラフィクル イスラム、庄子 渉、中村 洋子、大平 美紀、原口 清輝、中川原 章、神経系腫瘍の増殖制御における TAp63 と Myc の機能的役割、第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 19 日-21 日、ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

16. S.M. Rafiqul Islam, Yusuke Suenaga, Atsushi Takatori, Yasuji Ueda, Yoshiki Kaneko, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, Transgene Free Reprogramming of Human Neuroblastoma Cells, 第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 19 日-21 日、ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

17. 末永 雄介、高取 敦志、金子 伊樹、川名 秀忠、エスエム ラフィクル イスラム、ジェニファー アラゲー、モハ

マド シャミンホセイン、松本 大介、庄子 渉、中村 洋子、伊丹 真紀子、中村 洋子、大平 美紀、原口 清輝、中川原 章、NCYM, a novel MYCN cis-antisense gene product, stabilizes MYCN and contributes to aggressiveness of human neuroblastoma、平成 24 年度がん若手研究者ワークショップ、平成 24 年 9 月 2 日、蓼科グランドホテル滝の湯 (長野県・茅野市)

18. Yoshiki Kaneko, Yusuke Suenaga, Daisuke Matsumoto, Yohko Nakamura, Miki Ohira and Akira Nakagawara, NCYM, a MYCN antisense gene product, induces OCT4 promotes cell proliferation in neuroblastoma, Advances in Neuroblastoma Research Conference 2012, 平成 24 年 6 月 18 日-6 月 21 日、トロント (カナダ)

19. Yusuke Suenaga, Atsushi Takatori, Hidetada Kawana, Yoshiki Kaneko, Daisuke Matsumoto, Wataru Shoji, Mohammad Shamim Hossain, Miki Ohira, Makiko Itami, Seiki Haraguchi, and Akira Nakagawara, NCYM, a novel MYCN cis-antisense gene product, stabilizes MYCN and contributes to aggressiveness of human neuroblastoma, Advances in Neuroblastoma Research Conference 2012, 平成 24 年 6 月 18 日-6 月 21 日、トロント (カナダ)

20. S.M. Rafiqul Islam, Yusuke Suenaga, Atsushi Takatori, Yasuji Ueda, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, Reprogramming of human neuroblastoma cells using iPSC technology, Advances in Neuroblastoma Research Conference 2012、平成 24 年 6 月 18 日-6 月 21 日、トロント (カナダ)

21. S.M. Rafiqul Islam, Yusuke Suenaga, Atsushi Takatori, Yasuji Ueda, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, Reprogramming of Human Neuroblastoma Cells to iPSC-like State, 10th Annual meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 平成 24 年 6 月 13 日～16 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

22. 末永 雄介, Functional roles of TLP-TAp63 pathway in human cancers, 平成 24 年 5 月 21 日～5 月 25 日、河北

医科大学（中国）

23. S.M. Rafiqul Islam, **Yusuke Suenaga**, Atsushi Takatori, Yasuji Ueda, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Akira Nakagawara, Reprogramming of Human Neuroblastoma Cells to iPS-like State, The 2nd Japan-China Symposium on Cancer Research, 平成 24 年 5 月 9 日～5 月 11 日, 幕張メッセ国際会議場(千葉県・幕張市)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：神経芽腫モデルマウス

発明者：中川原章、末永 雄介

権利者：千葉県

種類：

番号：2012-220434

出願年月日：2012 年 10 月 2 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chiba-cc.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

末永 雄介 (Suenaga Yusuke)

千葉県がんセンター（研究所）・がんゲノムセンター・研究員

研究者番号：80581793