

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461614

研究課題名(和文) 幹細胞制御因子CD133を標的とした難治性神経芽腫の新規治療法開発の基盤研究

研究課題名(英文) A novel therapeutic targeting of CD133 transcription in malignant neuroblastoma

研究代表者

竹信 尚典 (Takenobu, Hisanori)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：60392247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞マーカーであるCD133は、神経芽腫の幹細胞が濃縮される細胞塊(以下スフェア)培養において発現が誘導され、細胞の分化の抑制および増殖促進に関与することが明らかになった。そこで神経芽腫スフェアでCD133のプロモーター領域を解析し、転写を誘導する転写因子CDX1を同定した。CDX1は神経芽腫細胞の増殖を促進し、スフェア形成を誘導した。さらに、CDX1は複数の幹細胞関連遺伝子の発現に関与していることが示唆された。そこで、CD133およびCDX1を組織特異的に発現するマウスを作出するため、TgベクターをES細胞へ導入してマウスを作出した。

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). Further, CDX1 was identified as a transcription factor that directly induced CD133 expression in NB spheres by analysis of CD133 promoter region. CDX1 directly bound to CD133 promoter regions and up-regulated CD133 transcription, cell proliferation and NB sphere forming efficiency. Then, we developed tissue specific-overexpressing CD133 and CDX1 transgenic (Tg) mice. These Tg vectors were used to insert into the ROSA26 locus of mouse ES cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：幹細胞 発がん 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

正常組織の発生および組織再生が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) 性質の異なる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

神経堤細胞に由来する小児固形腫瘍である神経芽腫は、難治例では治療抵抗性を示し、転移を起こして悪性化する。我々は、幹細胞特異的な分子 CD133 の発現は、がん幹細胞を濃縮する sphere 培養法で上昇し、神経芽腫の分化を抑制して悪性化に関するメカニズムをこれまでに明らかにした (Takenobu et al., Oncogene, 2011)。本研究の目的は、難治性神経芽腫が転移する性質に着目し、そのメカニズムをジェネティック・エピジェネティックの変化から明らかにして、新たな治療法を探索する基盤を明らかにすることである。転移性の悪性腫瘍は、原発巣の腫瘍と比較して新たな遺伝子レベルの変化を獲得していると考えられ、がん幹細胞の性質を規定していると考えられる。したがって転移組織ごとにジェネティック・エピジェネティックな変化を特定することは、転移性の難治神経芽腫の新たな治療法開発に結びつくものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 神経芽腫 sphere で特異的に発現する転写因子の同定を行うため、複数の神経芽腫細胞で sphere を形成させる。その sphere 由来の RNA と通常の接着培養細胞の RNA を用いて、網羅的な遺伝子発現を調べるために発現マイクロアレイを用いて高発現している遺伝子を探索する。

(2) 同定した転写因子が発現することで、神経芽腫の sphere 形成能が上昇することが予想される。そこで通常の条件では sphere を形成できない神経芽腫細胞に転写因子を高発現させ、sphere 形成への影響を検討する。一方で、sphere を形成する細胞においては、RNAi を用いて遺伝子発現を抑制して、sphere 形成効率を測定する。

(3) 同定した転写因子は、CD133 のみならず、種々の未知ながん幹細胞関連遺伝子の転写を制御する可能性がある。そこで転写因子を遺伝子導入して神経芽腫細胞に高発現させ、その細胞の RNA を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行う。

(4) 本研究で見出された、神経芽腫のがん幹細胞を制御する遺伝子を高発現するマウスを作成する。がん幹細胞に關与する遺伝子を全身で高発現させると、場合によっては神経以外の臓器の異常をきたすことが予想されることから、導入時には loxP-停止コドンで発現を止めておき、ゲノムへ遺伝子導入後に組織特異的な Cre マウスと交配することで、組織特異的に遺伝子が発現するようにする。また、遺伝子の位置的な影響を抑制するため、Rosa26 領域にのみ導入されるベクターを使用する。なお、コントロールとして、神経芽腫がん幹細胞特異的遺伝子である CD133 を高発現するマウスも同様の方法で作成する。

4. 研究成果

(1) すでに神経芽腫 sphere 特異的遺伝子として報告している CD133 とともに、転写因子 CDX1 の発現が sphere 形成依存的に上昇することが明らかとなった。また、CD133 の上流配列に CDX1 が直接結合して転写することを、*in vitro* で見出した。さらにマイクロアレイの解析から、ES 細胞を含む幹細胞に重要な転写因子・増殖因子の経路が亢進していることが明らかとなった。

(2) sphere 特異的な転写因子 CDX1 を高発現させることで、通常は sphere を形成しない神経芽腫細胞においても、sphere 形成が観察され、RNAi による遺伝子発現抑制によって、sphere 形成は阻害された。このことから、CDX1 は sphere で特異的に発現するだけでなく、神経芽腫の sphere 形成を制御する遺伝子であることが示唆された。

(3) CDX1 を高発現させた神経芽腫細胞では、様々な遺伝子の発現誘導が確認された。その中で、幹細胞に關連する遺伝子経路は、sphere 形成と同様に亢進しており、CDX1 は sphere 形成時の細胞の性質を制御する因子の一つであることを確認することができた。

(4) CDX1 および CD133 を組織特異的に発現するため、CAG プロモーターの下流に loxP-停止コドン-loxP を上流に持つ CD133 または CDX1 のトランスジェニック (Tg) ベクターを作成した。このベクターを用いて、遺伝子組換え ES 細胞を作成し、C57 bl/6 マウスの受精卵に導入することで Tg マウスを作成した。作出したマウスは Rosa26 領域に挿入した遺伝子を持つが、普段は発現がないか、非常に低いため、特にこれまでに形態的な異常や発がんは観察されていない。

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 8 件)

1. Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, Ohira M, Kamijo T, Kondo S, Fujii Y, Nakagawara A. Novel adaptor protein Shf interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma.

- Cancer Sci. 2013, 104(5):563-572
2. Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int.* 2013, 29(11):1147-1152
 3. Haruta M, Kamijo T, Nakagawara A, Kaneko Y. RASSF1A methylation may have two biological roles in neuroblastoma tumorigenesis depending on the ploidy status and age of patients. *Cancer Lett.* 2014, 348(1-2):167-176
 4. Sun Y, Furihata T, Ishii S, Nagai M, Harada M, Shimozato O, Kamijo T, Motohashi S, Yoshino I, Kamiichi A, Kobayashi K, Chiba K. Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers. *Clin Transl Med.* 2014, 3:37
 5. Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T. Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway. *Eur J Cancer.* 2014, 50(8):1555-1565.
 6. Nakazawa A, Haga C, Ohira M, Okita H, Kamijo T, Nakagawara A. Correlation between the International Neuroblastoma Pathology Classification and genomic signature in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 2015, 106(6):766-771
 7. Sai S, Wakai T, Vares G, Yamada S, Kamijo T, Kamada T, Shirai T. Combination of carbon ion beam and gemcitabine causes irreparable DNA damage and death of radioresistant pancreatic cancer stem-like cells in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 2015, 6(8):5517-5535
 8. Shimozato O, Waraya M, Nakashima K, Souda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, Nakagawara A, Ozaki T, Kamijo T. Receptor-type protein tyrosine phosphatase directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene.* 2015, 34(15):1949-1960.
- [学会発表](計 14 件)
1. 上條 岳彦, 中川原 章, 小児がん長期ケア事業による地域ヘルスケア構築, 第 17 回日本医療情報学会春季学術大会, 2013 年 6 月, 富山
 2. 竹信 尚典, 下里 修, 古関 明彦, 上條 岳彦, Tumor sphere specific transcription factor regulates stem cell-related genes in neuroblastoma, 第 1 回 日本・台湾 神経芽腫シンポジウム, 2013 年 10 月, 横浜
 3. 竹信 尚典, 下里 修, 秋田 直洋, 山口 陽子, 上原 悠, 藁谷 美雪, 池田 英里子, 中川原 章, 上條 岳彦, 神経芽腫スフェア特異的な転写因子による幹細胞関連遺伝子の発現制御, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月, 横浜
 4. 竹信 尚典, 下里 修, 秋田 直洋, 山口 陽子, 上原 悠, 藁谷 美雪, 池田 英里子, 中川原 章, 上條 岳彦, 神経芽腫スフェア形成に関わる転写因子の標的探索, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月, 福岡
 5. 竹信 尚典, Amallia Nuggetsiana Setyawati, 秋田 直洋, 上條 岳彦, ポリコーム PRC2 複合体 EZH2 の異常ヒストン修飾による神経芽腫発がん, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月, 福岡
 6. 上條 岳彦, 山口 陽子, 竹信 尚典, 大平 美紀, 他 2 名, Novel 1p Tumor Suppressor DMAP1 Regulates MYCN/ATM/p53 Pathway, 16th Advanced Neuroblastoma Research 2014, 2014 年 6 月, ドイツ
 7. 竹信 尚典, 上條 岳彦, 他 9 名, Tumor Sphere Specific Transcription Factor CDX1 Regulates Stem Cell-Related Gene Expression and Aggressiveness in Neuroblastoma, 16th Advanced Neuroblastoma Research 2014, 2014 年 6 月, ドイツ
 8. 上條 岳彦, 大平 美紀, 竹信 尚典, 中

- 川原章, 山口 陽子, MYCN/ATM/p53 経路を制御する 1p がん抑制遺伝子 DMAP1, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月, 横浜
9. 竹信 尚典, 力石 浩志, 上條 岳彦, 他 9 名, 神経芽腫スフェア特異的に発現する転写因子 CDX1 は細胞の幹細胞性を制御する, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月, 横浜
10. 上條 岳彦, 神経芽腫の基礎生物学, 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014 年 11 月, 岡山
11. 竹信 尚典, 上條 岳彦, 他 8 名, Identification of neuroblastoma stemness-regulating pathway using tumor sphere, 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014 年 11 月, 岡山
12. 竹信 尚典, 大平 美紀, 力石 浩志, 秋田 直洋, 山口 陽子, 春田 雅之, 古関明彦, 上條 岳彦, 神経芽腫のがん幹細胞性を制御する経路の探索, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月, 名古屋
13. Takenobu H., Ohira M, Chikaraishi K, Akita N, Yamaguchi Y, Haruta M, Koseki H, Kamijo T., Neuroblastoma sphere specific gene regulates stemness pathway for cancer stem cells, 神経芽腫アジアパシフィックシンポジウム 2015, 2015 年 11 月, 台湾
14. 竹信 尚典, 大平 美紀, 上條 岳彦, 神経芽腫のがん幹細胞性を制御するシグナル経路, 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2015 年 11 月, 山梨

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: CDX1 測定による神経芽腫の悪性度の決定と予後判定
発明者: 上條岳彦、竹信尚典
権利者: 千葉県
種類: 特願
番号: 2013-002842
出願年月日: 2013/1/10
国内外の別: 国内

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹信 尚典 (TAKENOBU HISANORI)
埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・
専門研究員
研究者番号: 60392247

(2) 研究分担者

上條 岳彦 (KAMIJO TAKEHIKO)
埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・
所長
研究者番号: 90262708

(3) 連携研究者

()

研究者番号: