

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830092

研究課題名(和文) 神経芽腫の標的分子NLRR1による細胞増殖シグナルの選択的制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism by which NLRR1, a therapeutic target in neuroblastoma, selectively enhances growth signals

研究代表者

高取 敦志 (TAKATORI, Atsushi)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ・研究員

研究者番号：40455390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：進行性神経芽腫において受容体シグナルを制御する膜タンパク質であるNLRR1による腫瘍の増悪化のメカニズムについて検討した。NLRR1は成人癌にも発現し増悪化に関与することが明らかになる一方で、ALK1に対しては相互作用を介して負に制御することが明らかとなった。NLRR2が薬剤感受性に影響を及ぼすことも分かり、細胞増殖・分化を制御し、腫瘍細胞の運命決定において重要な役割を果たすことにより、腫瘍の進展に大きな影響を及ぼし予後因子となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present project, functional analyses of NLRR1 have shown that it promotes tumor growth by regulating various types of receptor tyrosine kinases (RTK) in neuroblastoma (NB). Immunohistochemistry and qPCR have demonstrated that NLRR1 is expressed in various types of adult cancers. Of note, NLRR1 rather suppresses the activation of ALK, a NB-related RTK, through protein-protein interaction. On the other hand, the functional study has indicated a novel role of NLRR2, another member of NLRR family, in drug resistance of NB cells. Overall, the new data from this study suggest that NLRR family proteins contribute to cell fate decision by regulating cell proliferation, survival and differentiation and serve as prognostic factors in NB and other type of cancers.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：シグナル伝達 NLRR 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

様々ながんの発がんメカニズムにおいて受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の関与が知られており、その機能を特異的に制御する分子標的薬が開発されてきている。しかし臨床試験においては、極めて高い癌遺伝子依存性 (oncogene addiction) がある場合を除き、単剤投与での有効性が認められないことが多く、皮膚炎や肺炎などの副作用も懸念される。さらに、標的分子における新たな点突然変異による耐性の獲得など、がん治療法の確立には課題も多い。癌遺伝子依存性が低い場合、RTK による細胞増殖シグナルがどのように制御・維持されているかを知ることは、将来他の抗癌剤との併用あるいは分子標的薬同士での併用療法を開発する上で重要である。

最近研究代表者らは、神経芽腫の予後に関連する膜一回貫通型タンパク質として同定された NLRR1 が EGF や IGF によるシグナル伝達を増強し、標的分子の候補となることを見出した。神経芽腫のうち 1 歳以上で発症する進行期の神経芽腫は抗がん剤が効きにくく未だ難治性であり、治療率向上を目指した発がん分子機構の解明及び新規治療法の開発が強く望まれている。NLRR1 は NLRR ファミリータンパクの一つであり、予後不良の神経芽腫において高い発現が認められる^{1,2)}。その機能については、LRR ドメインや immunoglobulin-like ドメインを持つことから、細胞接着や受容体としての機能が予想されていたが、詳しい機能は不明のままであった。

【参考文献】

- 1) Hamano, S. et al., *Int. J. Oncology*, 24:1457-66, 2004
- 2) Hossain, M.S., Takatori, A. et al. *Cancer Research*, 72(17):4587-96, 2012

2. 研究の目的

進行性神経芽腫は抗がん剤が効きにくく未だ難治性であり、治療率向上を目指した発がん分子機構の解明及び新規治療法の開発が強く望まれている。研究代表者はこれまでに悪性の神経芽腫に高い発現を示す NLRR1 が複数の増殖シグナルを選択的に増強し細胞増殖を増加させること、そして NLRR1 が細胞膜上の受容体局在を変化させることによりリガンドの結合を増加させることなどを明らかにし、さらに NLRR1 抗体が細胞増殖抑制効果を持つことを示し、NLRR1 が標的分子となり得ることを示してきた。本研究では NLRR1 の選択的シグナル制御機構を解明し、新たな受容体シグナル制御機構に基づく新規治療法の開発につなげることを大きな目的としている。

そこで、より効果的な NLRR1 標的治療薬の開発につなげていくべく、特に NLRR1 による RTK

の制御機構について検討し、発がん寄与する NLRR ファミリーの機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 成人がんにおける NLRR1 発現とモノクローナル抗体の細胞増殖抑制機構
成人がんにおける NLRR1 遺伝子の発現について組織切片アレイを用いた免疫組織化学的検索およびリアルタイム PCR 法により検討を行う。また、細胞増殖抑制効果をもつ NLRR1 モノクローナル抗体が EGF 受容体などに与える影響を細胞実験により検討する。

(2) NLRR1 がシグナルを負に制御するメカニズム

様々な受容体型チロシンキナーゼとの直接的な相互作用について免疫沈降法により検討する。相互作用が確認された分子についてはそれぞれの機能に対して相互作用が及ぼす影響について検討する。また、マウスサンプルや症例サンプルを用いて in vivo における相互作用の検討も行う。

(3) ファミリー遺伝子 NLRR2 の機能

本研究が進む過程において、NLRR1 の細胞内シグナルの中でも特に細胞増殖を促進する成長因子 (EGF や IGF) によるシグナル伝達を正に制御し、がんの増悪化に寄与する一方で、ALK などの他の受容体シグナルを抑制する機能を持つことが明らかとなってきた。一方、同じファミリー遺伝子である NLRR3 は細胞分化を促進することが示されていた。NLRR ファミリーの機能について全容を明らかにすべく、もう一つのファミリー遺伝子である NLRR2 の機能について主に細胞実験により検討を行う。

4. 研究成果

(1) 成人がんにおける NLRR1 遺伝子の発現について組織切片アレイを用いた免疫組織化学的検索により検討したところ、乳がんや皮膚がんのがん組織においても NLRR1 の発現が認められた (図 1)。

さらに肺癌サンプルの癌部・非癌部の組織試料から調整した cDNA サンプルを用いてリアルタイム PCR 法により NLRR1 の mRNA 発現量を測定したところ、癌部において高い発現を示した検体が散見されたことから、神経芽腫のみならず、各種成人がんの発生・進展においても NLRR1 の関与が示唆された。

一方、これまでに、細胞増殖を抑制する効果のある NLRR1 抗体を複数取得した。このうち、特に効果が強い抗体について、その作用機序を明らかにするために、NLRR1 発現細胞において抗体が EGF シグナル伝達に与える影響について検討した。その結果、NLRR1 抗体により EGF 処理による受容体の活性化が抑制されることが明らかとなった (図 2)。この

ことから、NLRR1 の機能が成長因子シグナルの増強にあることが再確認された。また、この抗体の抗原認識部位の遺伝子情報やエピトープのアミノ酸配列などの性状解析を行った。そして、特許微生物寄託センターに抗体産生ハイブリドーマの寄託を行った上で、得られた結果について特許出願を行った。

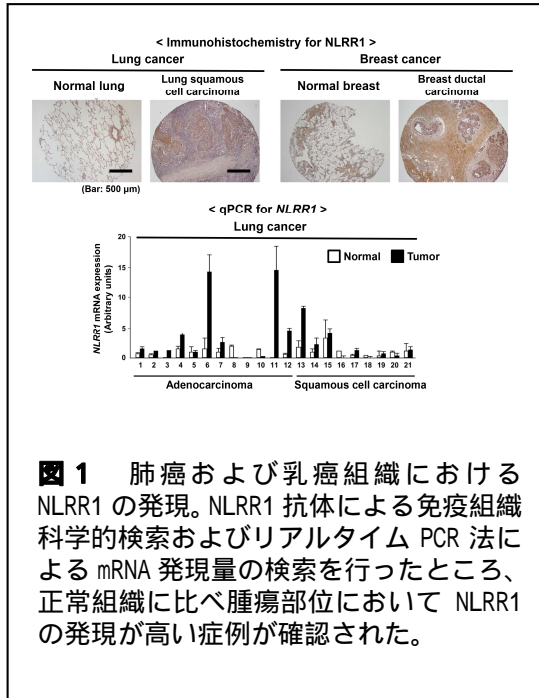


図1 肺癌および乳癌組織におけるNLRR1 の発現。NLRR1 抗体による免疫組織科学的検索およびリアルタイム PCR 法による mRNA 発現量の検索を行ったところ、正常組織に比べ腫瘍部位において NLRR1 の発現が高い症例が確認された。

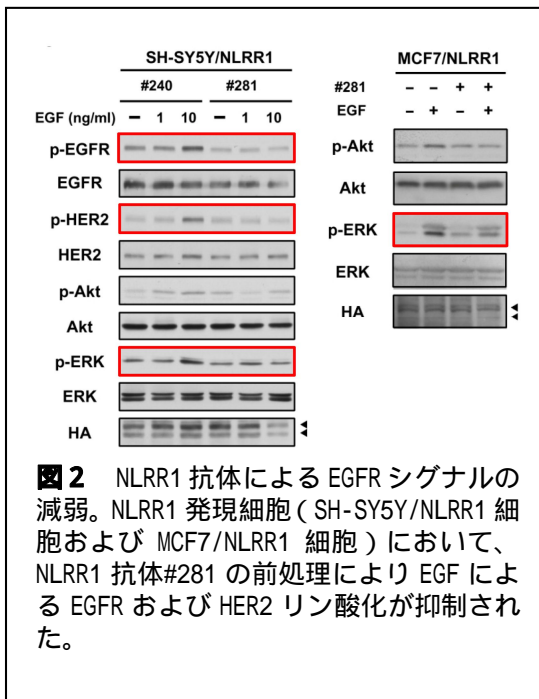


図2 NLRR1 抗体による EGFR シグナルの減弱。NLRR1 発現細胞 (SH-SY5Y/NLRR1 細胞および MCF7/NLRR1 細胞) において、NLRR1 抗体#281 の前処理により EGF による EGFR および HER2 リン酸化が抑制された。

(2) NLRR1 は EGF や IGF など細胞増殖を促進する成長因子によるシグナル伝達を正に制御し、がんの増悪化に寄与するが、他の増殖因子シグナルの制御については不明な点が多い。そこで、特に神経芽腫において発がんおよび悪性化に寄与することが知られており、治療標的として重要な受容体である ALK (Anaplastic lymphoma kinase) の機能に対する NLRR1 の影響について検討を行った。ALK 遺伝子に変異または増幅がある神経芽腫由来細胞に NLRR1 を発現させ、ALK および下流のシグナル分子のリン酸化について解析したところ、NLRR1 の発現は ALK およびその下流シグナル分子のリン酸化を減少させ、細胞増殖を抑制することが明らかとなった。さらに免疫沈降法による検討の結果、NLRR1 は ALK と細胞外ドメインを介して直接的な相互作用をもつことが明らかとなった (図3)。

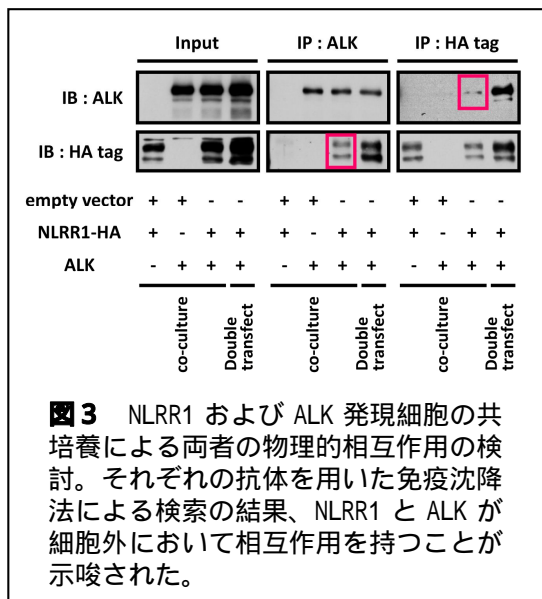


図3 NLRR1 および ALK 発現細胞の共培養による両者の物理的相互作用の検討。それぞれの抗体を用いた免疫沈降法による検索の結果、NLRR1 と ALK が細胞外において相互作用を持つことが示唆された。

そこで、生体内での ALK に対する NLRR1 の影響を明らかとするために、NLRR1 遺伝子欠損マウスの後根神経節における ALK の発現を免疫染色により観察したところ、野生型マウスに比べ著しい発現上昇が観察された (図4)。以上の結果から、NLRR1 が受容体シグナルのうち特に ALK を負に制御するメカニズムが明らかとなった。以前の研究において、NLRR1 および ALK はいずれも神経芽腫の重要ながん遺伝子である MYCN により転写制御を受けることが明らかとなっているが、タンパク質レベルでは両者に抑制的な機能制御があることが示唆された。

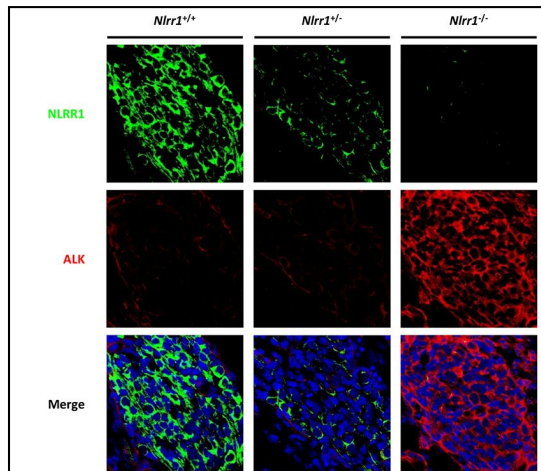


図4 マウス胎仔後背神経節におけるNLRR1とALKの免疫組織学的検索。両者は相互排他的発現パターンを示した。

(3) NLRRファミリー遺伝子であるNLRR2の機能解析を行ったところ、NLRR2は他のファミリーとは異なり、細胞内ストレス応答におけるJNK/c-Junシグナル伝達の活性化により遺伝子発現制御を受け、神経芽腫由来細胞においてレチノイン酸処理やDNA傷害ストレスに対して細胞生存を高める効果があることが分かった。神経芽腫の臨床サンプルにおいて遺伝子発現レベルを検討した結果、NLRR2高発現群において有意に予後が不良であることが明らかとなった。このことはNLRR1およびNLRR2の高発現により神経芽腫が増悪化することが示唆される。

一方、NLRR1と神経芽腫モデルマウスとのコンパウンドマウスの作出はできなかったが、NLRR3のノックアウトマウスの戻し交配作業を進めつつ、表現型の解析を始めた。これまでのところ、NLRR1ノックアウトマウスとは異なり、NLRR3ノックアウトマウスにおいては顕著な表現型は確認されていない。

本研究課題によって、NLRR1およびそのファミリー遺伝子による細胞内機能およびその遺伝子発現制御機構が明らかとなった。これらの遺伝子は細胞増殖・分化を制御し、神経芽腫細胞の運命決定において重要な役割を果たすことにより、神経芽腫の進展に大きな影響を及ぼし予後因子となることが明らかとなった。今後は得られた知見がNLRRファミリー遺伝子を標的とした新規治療法開発につながることを期待される。

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2件)

Akter J, Takatori A*, Islam MS, Nakazawa

A, Ozaki T, Nagase H, Nakagawara A. Intracellular fragment of NLRR3 (NLRR3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有 2014, 453(1):86-9
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09.065.
(*Corresponding author)

Fukuda M, Takatori A*, Nakamura Y, Suganami A, Hoshino T, Tamura Y, Nakagawara A. Effects of novel small compounds targeting TrkB on neuronal cell survival and depression-like behavior Neurochemistry International, 査読有 2016, 97:42-48
DOI:10.1016/j.neuint.2016.04.017
(*Corresponding author)

[学会発表](計15件)

Takatori A 他, NLRRs are transcriptionally regulated by MYCN and serve as potential targets for diagnosis and therapy in neuroblastoma
平成25年度がん若手研究者ワークショップ
2013年9月、蓼科市

Takatori A 他, NLRR1 is a cis-acting modulator of growth-promoting receptor and a potential target for therapy of neuroblastoma
第72回日本癌学会学術総会
2013年10月、横浜市

Satoh S, Takatori A 他, Neuroblastoma cells up-regulate TrkA expression to survive after ALK inhibitor treatment
第72回日本癌学会学術総会
2013年10月、横浜市

Satoh S, Takatori A 他, TrkAはALK阻害剤処理により誘導され、神経芽腫細胞の生存に寄与する
日本小児血液・がん学会学術集会
2013年11月、横浜市

Satoh S, Takatori A 他, TrkA and EGFR control NB cell survival in ALK inhibitor treatment 第72回日本癌学会学術総会
2013年12月、神戸市

Takatori A 他, Anti-NLRR1 monoclonal antibody inhibits growth of neuroblastoma xenograft in mice
Advanced Neuroblastoma Research (ANR) 2014
2014年5月、ドイツ

Satoh S, Takatori A 他, Additional receptor tyrosine kinases compensate

survival signals in ALK inhibitor-treated neuroblastoma cells
Advanced Neuroblastoma Research (ANR) 2014
2014年5月、ドイツ

Akter J, Takatori A 他, γ -secretase mediated intramembrane proteolysis of NLRR3 leads to the liberation of its intracellular domain and its role in the NB differentiation
Advanced Neuroblastoma Research (ANR) 2014
2014年5月、ドイツ

Fukuda M, Takatori A 他, Neuronal Leucine Rich Repeat Protein1 (NLRR1) proteins repress NGF-dependent cell growth in neuroblastoma cells
第73回日本癌学会学術総会
2014年9月、横浜市

Akter J, Takatori A 他, γ -secretase mediated cleavage of NLRR3 intracellular domain and its functional role in the neuroblastoma differentiation
第73回日本癌学会学術総会
2014年9月、横浜市

Fukuda M, Takatori A 他, Neuronal Leucine Rich Repeat Protein1 (NLRR1) inhibits cell growth via suppressing NGF/TrkA signals in neuroblastoma cells
第56回日本小児血液・がん学会学術集会
2014年11月、岡山市

Fukuda M, Takatori A 他, Neuronal Leucine Rich Repeat Protein1 (NLRR1) suppresses NGF/TrkA signal in neuroblastoma
SIOP2014 2014年10月、カナダ

Fukuda M, Takatori A 他, Novel candidate compounds identified by in silico screening activate TrkB and attenuate depressant-like behavior in mice
第58回日本神経化学会
2015年9月、さいたま市

Sheikh A, Takatori A 他, NLRR2 is involved in neuronal survival and differentiation through JNK pathway in neuroblastoma
第74回日本癌学会学術総会
2015年10月、名古屋市

福田真佑、高取敦志、他, in silico スクリーニングで同定された低分子化合物は TrkB の活性化を誘導し、マウスのうつ病様症状を低下させる
第38回分子生物学会年会
2015年12月、神戸市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計2件)

名称: 抗 NLRR1 抗体
発明者: 中川原 章、高取 敦志
権利者: 千葉県
種類: 特許権
番号: PCT/JP2014/061759
出願年月日: 2014年4月25日
国内外の別: 国外

名称: NLRR1 細胞外ドメインタンパク質を検出する方法
発明者: 中川原 章、高取 敦志
権利者: 千葉県
種類: 特許権
番号: 特願2014-062363
出願年月日: 2014年3月25日
国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: 癌の治療薬のスクリーニング方法
発明者: 中川原 章、高取 敦志
権利者: 久光製薬、千葉県
種類: 特許権
番号: 特許第5389780号
取得年月日: 平成25年10月18日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyu/o/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高取 敦志 (TAKATORI ATSUSHI)
千葉県がんセンター(研究所)・がん治療
開発グループ・研究員
研究者番号: 40455390