

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461584

研究課題名(和文) Rabファミリー低分子量G蛋白質を標的とした神経芽腫の新しい治療法に関する研究

研究課題名(英文) Targeting Rab family small G proteins as a novel neuroblastoma therapeutic approach

研究代表者

西村 範行(Nishimura, Noriyuki)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：00322719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高リスク神経芽腫患者は、半数以上が再発を経験しており、その長期生存率は未だ40%に達していない。高リスク神経芽腫患者の予後改善には、再発の起源と考えられる微小残存病変(MRD)を構成する神経芽腫がん幹細胞を標的とした新しい治療法の開発が必要である。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、神経芽腫がん幹細胞の発生・分化を制御するRabのメンバーとその標的蛋白質を同定し、それらの上流/下流シグナルの同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：More than half of high-risk neuroblastoma patients have experienced tumor relapses and their overall survival rates remain less than 40%. To improve their prognosis, it is necessary to develop a novel therapeutic approach targeting minimal residual disease (MRD) comprised of chemoresistant cancer stem cells (CSCs). In the present study, we have identified a member of Rab family small G proteins (Rabs), which control the development of neuroblastoma CSCs, and its effector protein. We have then characterized their upstream/downstream signaling pathways.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：神経芽腫 がん幹細胞 微小残存病変(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 15%を占める代表的な小児難治性固形がんである。特に、その半数以上が再発する高リスク群患者の予後改善は、現在の小児がん診療における緊急の課題である。

神経芽腫を含む多くのがんで、自己複製能と多分化能を持ち、その他多くのがん細胞を生み出すことの出来るがん幹細胞が同定された。その結果、神経芽腫の再発は、治療に耐性を示し、臨床的に微小残存病変(MRD)として捉えられる神経芽腫がん幹細胞の再活性化による、と考えられるようになった。

近年、高リスク群患者における治療標的分子の同定を目指した全ゲノムシーケンスが行なわれ、1人の神経芽腫患者あたり平均約 20 の遺伝子変異を有することが明らかになった。その結果、約 1/4 の高リスク群患者に治療標的となる遺伝子変異が見いだされたが、残り約 3/4 の患者における治療標的分子の同定には、新しい手法が必要だと考えられている。

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いる。

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。これらの実績に基づいて、神経芽腫がん幹細胞の発生・分化を制御する Rab のメンバーとその標的蛋白質を同定してきた。

また、神経芽腫患者検体中の MRD を評価することは、がん幹細胞の概念が確立する以前から、試みられてきた。神経芽腫では、腫瘍細胞特異的な遺伝子が同定されていないため、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て、MRD が検出されている。単一マーカーを用いた MRD の評価法では、偽陰性症例が少なからず存在することが指摘されたため、複数のマーカーを組み合わせたより偽陰性の少ない MRD の評価法が主に用いられている。しかし、報告するグループ毎に、組み合わせるマーカー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。そこで、研究代表者らは、神経芽腫がん幹細胞での発現量に基づいた MRD マーカーの再評価を行い、新しい MRD 評価法を報告してきた。

2. 研究の目的

神経芽腫の新しい治療法の開発を目指して、神経芽腫がん幹細胞の発生・分化を制御する Rab のメンバーとその標的蛋白質を同定し、それらの上流/下流シグナルの同定すること。

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、骨髓穿刺液、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) 神経芽腫がん幹細胞の発生・分化に関わる Rab のメンバーおよびその標的蛋白質の同定

通常培養した神経芽腫細胞およびスフェア培養した神経芽腫がん幹細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によって Rab の全メンバーの発現量を定量した。Rab のメンバーには、活性型(GTP 結合型)と不活性型(GDP 結合型)が存在し、全てのメンバーに共通の遺伝子変異を導入することで GTP および GDP 結合型変異体を作製出来るので、神経芽腫細胞と比べて神経芽腫がん幹細胞において発現量の変化した Rab のメンバーについて、GTP 結合型変異体を発現した神経芽腫細胞、GDP 結合型変異体を発現した神経芽腫細胞、過剰発現した神経芽腫細胞、およびノックダ

ウンした神経芽腫細胞を樹立した。スフェアー培養した時に形成されるスフェアーの数が、コントロールと比べて大きく変化した Rab を、神経芽腫がん幹細胞の発生・分化に関わるものとして同定した。

これまでに多数の Rab の標的蛋白質(複合体)が同定されて、「一つの Rab が複数の標的蛋白質(複合体)を介して働いている」ことが明らかになっている。そこで、神経芽腫がん幹細胞の発生・分化に関わる働きを担う標的蛋白質(複合体)を、免疫沈降法によって単離した。

GTP 結合型変異体を発現した神経芽腫細胞、および GDP 結合型変異体を発現した神経芽腫細胞の細胞質画分から、SDS-PAGE 上 GTP 結合型変異体に特異的に結合するバンドを切り出し、Mass Spectrometry を用いて Rab の標的蛋白質(群)を同定した。

(4) Rab のメンバーおよびその標的蛋白質の機能解析

Rab およびその標的蛋白質を過剰発現またはノックダウンした神経芽腫細胞を樹立して、スフェアー形成能、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) Rab のメンバーおよびその標的蛋白質の上流/下流シグナルの同定

上記で樹立した Rab およびその標的蛋白質を過剰発現した神経芽腫細胞とノックダウンした神経芽腫細胞における遺伝子発現を DNA マイクロアレイによって解析し、Rab およびその標的蛋白質と共に発現変化する遺伝子(群)から、リアルタイム RT-PCR によって検証可能な遺伝子(群)を、上流/下流シグナル分子の候補として同定した。

(6) 神経芽腫 MRD の評価

神経芽腫がん幹細胞での発現量に基づいて MRD マーカーの再評価を行い、11 マーカー (CHRNA3, CRMP1, DBH, DCX, DDC, GABRB3, GAP43, ISL1, KIF1A, PHOX2B, TH) を選択した。リアルタイム RT-PCR によって、骨髄および末梢血検体における 11 の MRD マーカー遺伝子発現を定量し、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 のメンバーおよびその標的蛋白質

神経芽腫がん幹細胞において発現が誘導され、スフェアー形成、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 のメンバーおよびその標的蛋白質として、Rab6B-MTMR5 を同定した。

(2) 神経芽腫患者の MRD モニタリング

神戸大学医学部附属病院および兵庫県立

子ども病院で診療された神経芽腫患者から採取した骨髄および末梢血検体の MRD を評価した。

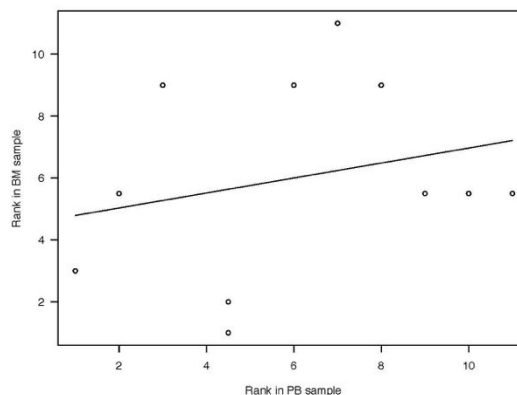
1. 骨髄および末梢血検体における MRD 陽性率

		BM sample	
		MRD (+)	MRD (-)
PB sample	MRD (+)	11	4
	MRD (-)	5	3

2. 骨髄および末梢血検体における MRD マーカー陽性率

MRD marker	PB sample	BM sample
CHRNA3	(+)	9
	(-)	14
CRMP1	(+)	10
	(-)	13
DBH	(+)	12
	(-)	11
DCX	(+)	8
	(-)	15
DDC	(+)	9
	(-)	14
GABRB3	(+)	5
	(-)	18
GAP43	(+)	8
	(-)	15
ISL1	(+)	8
	(-)	15
KIF1A	(+)	9
	(-)	14
PHOX2B	(+)	13
	(-)	10
TH	(+)	9
	(-)	14

骨髄および末梢血検体における MRD マーカーの相関



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) Hashimoto O, Yoshida M, Koma Y, Yanai T, Hasegawa D, Kosaka Y, Nishimura N, and Yokozaki H. Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development. *J Pathol* 240: 211-223. (2016) DOI: 10.1002/path.4769 (査読有)

(2) Hirase S, Saitoh A, Hartomo TB, Kozaki A, Yanai T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Yamamoto N, Mori T, Hayakawa A, Iijima K, Nishio H, and Nishimura N. Early detection of tumor relapse/re-growth by consecutive minimal residual disease monitoring in high-risk neuroblastoma patients. *Oncol Lett* 12: 1119-1123. (2016) DOI: 10.3892/ol.2016.4682 (査読有)

(3) Hartomo TB, Pham TVH, Yamamoto N, Hirase S, Hasegawa D, Kosaka Y, Matsuo M, Hayakawa A, Takeshima Y, Iijima K, Nishio H, and Nishimura N. Involvement of aldehyde dehydrogenase 1A2 in the regulation of cancer stem cell properties in neuroblastoma. *Int J Oncol* 46: 1089-1098. (2015) DOI: 10.3892/ijo.2014.2801 (査読有)

(4) Yamamoto N, Kozaki A, Hartomo TB, Yanai T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Hirase S, Mori T, Hayakawa A, Iijima K, Nishio H, and Nishimura N. Differential expression of minimal residual disease markers in peripheral blood and bone marrow samples from high-risk neuroblastoma patients. *Oncol Lett* 10: 3228-3232. (2015) DOI: 10.3892/ol.2015.3710 (査読有)

[学会発表](計13件)

(1) Nishimura N, Pham TVH, Thwin KK, Yamamoto N, Mori T, Hayakawa A, Nishio H, Matsuo M, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, and Iijima K. Rab6B mediates the progression of neuroblastoma through the interaction with MTMR5. *Advances in Neuroblastoma Research Conference 2016*. Cairns, Australia, June 19-23, 2016

(2) Yamamoto N, Thwin KK, Fujimura J, Nakanishi K, Mori T, Hayakawa A, Nishio H, Matsuo M, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Iijima K, and Nishimura N. DENN domain protein DENND2A regulates the progression

of neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research Conference 2016*. Cairns, Australia, June 19-23, 2016

(3) 西村範行, Khin Kyaemon Thwin, 山本暢之, 森健, 早川晶, 長谷川大一郎, 川崎圭一郎, 小阪嘉之, 西尾久英, 飯島一誠. 神経芽腫患者の微小残存病変モニタリング **第119回日本小児科学会学術集会**, 札幌, 2016年5月13-15日

(4) Saito A, Hirase S, Kozaki A, Yanai T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Hayakawa A, Iijima K, Nishio H, and Nishimura N. Two high-risk neuroblastoma cases with early detection of tumor relapse/re-growth by consecutive minimal residual disease monitoring. *11th Asian Society for Pediatric Research*. Osaka, Japan, April 15-18, 2015

(5) Uemura S, Yamamoto N, Kozaki A, Yanai T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Hayakawa A, Iijima K, Nishio H, and Nishimura N. Neuroblastoma minimal residual disease markers are differentially expressed in peripheral blood and bone marrow samples. *11th Asian Society for Pediatric Research*. Osaka, Japan, April 15-18, 2015

(6) 西村範行, 山本暢之, 長谷川大一郎. 神経芽腫の発症・進展におけるRab6BとRab28の役割. **第74回日本癌学会学術総会**, 名古屋, 2015年10月8-10日

(7) 山本暢之, 西村範行, 長谷川大一郎. DENNドメイン蛋白質DENND2Aによる神経芽腫の発症・進展の制御機構. **第74回日本癌学会学術総会**, 名古屋, 2015年10月8-10日

(8) Yamamoto N, Horinouchi T, Fujimura J, Mori T, Hayakawa A, Hasegawa D, Kosaka Y, Nishio H, Iijima K, and Nishimura N. DENN domain protein DENND2A mediates the progression of neuroblastoma. **第57回日本小児血液・がん学会学術集会**, 山梨, 2015年11月27-29日

(9) Uemura S, Yamamoto N, Kozaki A, Nino N, Takafuji S, Yokoi T, Saito A, Ishida T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Mori T, Hayakawa A, Iijima K, Nishio H, and Nishimura N. Differential expression of minimal residual disease markers in peripheral blood and bone marrow samples from high-risk neuroblastoma patients. **第57回日本小児血液・がん学会学術集会**, 山梨 2015年11月27-29日

(10) 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

(11) 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. Aldehyde dehydrogenase 1A2 expression correlates with cancer stem cell properties in neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research Conference 2014*, Cologne, Germany, May 13-16, 2014

(12) 西村範行, Thi Van Huyen Pham, Tri Budi Hartomo, 山本暢之, 平瀬敏志, 早川晶, 矢内友子, 長谷川大一郎, 川崎圭一郎, 小阪嘉之, 松尾雅文, 飯島一誠, 西尾久英. 神経芽腫がん幹細胞の発生・分化における細胞内小胞輸送の制御因子Rab6Bの役割. **第56回日本小児血液・がん学会学術集会**, 岡山, 2014年11月28-30日

(13) Nishimura N, Hartomo TB, Pham TVH, Yamamoto N, Hirase S, Hayakawa A, Yanai T, Hasegawa D, Kawasaki K, Kosaka Y, Matsuo M, Iijima K, Nishio H. Aldehyde dehydrogenase ALDH1A2 regulates cancer stem cell properties in neuroblastoma. **第56回日本小児血液・がん学会学術集会**, 岡山, 2014年11月28-30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・特命教授
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・医学研究員
研究者番号：40379376

(3)研究分担者

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