

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462717

研究課題名(和文) マウス各発達段階組織を用いたヒト小児肝腫瘍、腎腫瘍における腫瘍関連遺伝子の検討

研究課題名(英文) Analysys of tumor-associated genes in human pediatric liver tumor and renal tumor using mice at each developmental stage

研究代表者

杉藤 公信 (SUGITO, Kiminobu)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10328750

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)：ヒト小児肝腫瘍、腎腫瘍の発生・進展に関わる遺伝子の探索を目的として、候補遺伝子のゲノムメチル化状態を、マウスの各発達段階の肝・腎組織において定量的に検討した。その結果、肝組織の発達に伴いメチル化レベルの亢進していたZSCAN10、SIC16A5について、肝腫瘍・腎腫瘍細胞株並びに当科で保存している臨床検体における発現状態を定量的に解析したが、一定の結果は得られなかった。そこで、別の新規候補遺伝子であるTfap2eの肝芽腫細胞株における機能解析を行なったところ、Tfap2e抑制での細胞増殖亢進と過剰発現での細胞増殖低下が確認され、がん抑制遺伝子としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To newly identify genes involved in the development of hepatoblastoma and nephroblastoma, we analyzed the methylation status of the candidate genes in liver and kidney of mice at different developmental stages. In this analysis, we found that methylation levels of ZSCAN10, SIC16A5 were significantly higher in liver of elder mice. However, there was no significant difference in the expression levels of these genes between hepatoblastoma cells and liver tissues, and between nephroblastoma and normal kidney tissues. In addition, no aberrant expression of both genes was observed in the surgical specimens of hepatoblastoma and nephroblastoma. We then conducted the functional analysis of TFAP2E in hepatoblastoma. In this analysis TFAP2E silenced hepatoblastoma cells showed higher viability compared to that of control cells. On the other hand, forced expression of TFAP2E resulted in reduced cell viability. These results indicate that TFAP2E has a tumor suppressive function in hepatoblastoma.

研究分野：小児外科学

キーワード：小児腫瘍学 肝芽腫 腎芽腫 機能解析

1. 研究開始当初の背景

小児がんは小児死亡原因の第2位を占め、特に固形腫瘍は難治性で予後不良のものも多く、臨床的治療の確立が急がれる。小児腫瘍の多くでは発生・分化の途中段階にある細胞から生じると考えられ、成人にみられない種類のものも多く、また成人同様の腫瘍であったとしても、環境因子への暴露の程度が低い小児の場合は性質が異なることが考えられ、成人腫瘍との違いを念頭に置いた研究が重要である。

一般に、ゲノム中の CpG ジヌクレオチドの 60~90%がメチル化を受けており、多くの遺伝子の promoter 領域にある GC 豊富な領域 (CpG アイランド) が高頻度に脱メチル化すると高発現状態になる。腫瘍細胞では、腫瘍遺伝子の promoter 領域の脱メチル化、腫瘍抑制遺伝子の promoter 領域の DNA メチル化が生じており、DNA メチル化異常が腫瘍発生に関与することは多く知られている。こうした epigenetic な制御機構は、分化した細胞・組織にその性質を維持せしめるに必要な遺伝子発現パターンをもたらすことにも関わっている。この制御下にある遺伝子は組織の分化特異的な発現を示し、その制御に異常をきたすと発現の変化とともに細胞の性質も変化させ得るという点で、腫瘍関連遺伝子としての側面を持つことが考えられる。成人腫瘍では、慢性経過での DNA メチル化異常に起因する発癌が指摘されているが、小児腫瘍では染色体異常や遺伝性疾患との関与や発生・分化に関わる遺伝子の DNA メチル化異常が原因であると考えられている。

我々はこれまでに小児悪性固形腫瘍である神経芽腫において、epigenetic な異常、特に DNA メチル化異常を主とした遺伝子変化の解析を試みてきた。ゲノムに DNA メチル化感受性酵素 *NotI* を含めた 3 種類の制限酵素を用いて作製した DNA フラグメントを 2 次元的に電気泳動することで生じたスポットを組織間で比較し、マウス特異的 DNA メチル化領域の解析を行った。このうち、精巣特異的 DNA メチル化変化領域のヒト相同領域を神経芽腫細胞株・臨床検体について解析することで、神経芽腫の新規腫瘍特異的遺伝子を報告してきた (Sugito K, et al. *Pediatr Blood Cancer*. 2013, Sugito K, et al. *J pediatr Surg*. 2013)。さらに胎児・新生仔・成体の各発達段階におけるマウス脳組織の DNA メチル化変化を同様の手法で解析し、神経芽腫臨床検体と比較することで DNA メチル化異常を生じている新規腫瘍関連・予後規定遺伝子を報告した (Kawashima H, et al. *Int J Oncol*. 2012)。

以上より我々は、神経芽腫における新規腫瘍関連遺伝子として *ZSCAN10*、*ZARI*、*SLC16A5*、*NR4A3* を同定している。これらの結果は、組織発達時的 DNA メチル化変化が、神経芽腫以外の小児胎児性腫瘍の発生にも関わっている可能性を示唆する。

2. 研究の目的

現在までに同定した腫瘍組織特異的遺伝子 (*ZSCAN10*、*ZARI*、*SLC16A5*) について、マウスの各発達段階 (胎児・新生仔・成体において肝・腎組織で定量的 DNA メチル化解析を行い、新規腫瘍関連遺伝子候補としての可能性をヒト小児肝腫瘍細胞株・ヒト小児腎腫瘍細胞株並びに当科で保存している臨床検体を用いて検討する。また、同定された新規腫瘍関連遺伝子については、将来的な治療への応用を考え、機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) マウス肝臓・腎臓の組織発達段階における定量的 DNA メチル化解析
マウスの各発達段階において、それぞれ肝臓・腎臓を摘出する。これらよりゲノム DNA および RNA を抽出し、現在までに報告してきた新規腫瘍関連遺伝子 (*ZSCAN10*、*ZARI*、*SLC16A5*) について、MassARRAY EpiTYPER を用いた定量的 DNA メチル化解析を行う。

(2) ヒト腫瘍細胞株を用いた候補遺伝子の定量的遺伝子発現解析
定量的 DNA メチル化解析により DNA メチル化状態に変化を認めた遺伝子に対して、ヒト正常 (肝・腎) 組織、小児肝腫瘍細胞株 (HepG2・Huh6)、小児腎腫瘍細胞株 (SKNEP-1・G401) に対して、Real time PCR を用いた発現解析を行う。

(3) *in vitro* における候補遺伝子の機能解析

上記 (1)、(2) で絞り込んだ候補遺伝子の siRNA を lipofectin 法で腫瘍細胞株に導入し、発現抑制を行う。その後、発現抑制状態における (a) 細胞形態、(b) 細胞増殖能の機能解析を行う。

さらに、候補遺伝子に対する full length のプラスミドベクターを作製し、腫瘍細胞株に lipofection 法で導入する事で一過性の過剰発現を行う。過剰発現の状況下で、同様に (a)、(b) を行う。

4. 研究成果

(1) マウス肝臓・腎臓の組織発達段階における定量的 DNA メチル化解析

マウス (C57BL/6) の胎生 15 日、出生 0 または 1 日、12 週齢の肝臓・腎臓を 3 検体ずつ摘出した。各組織から RNA および DNA を抽出し、これまで神経芽腫での新規腫瘍関連遺伝子として報告してきた遺伝子 (*ZSCAN10*、*ZARI*、*SLC16A5*) について、

Real-time PCR による発現解析、および MassARRAY EpiTYPER による定量的 DNA メチル化解析を行った (図 1、2)。

図1 肝組織におけるメチル化解析

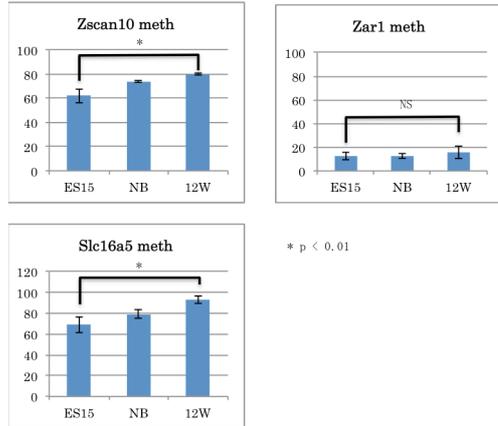
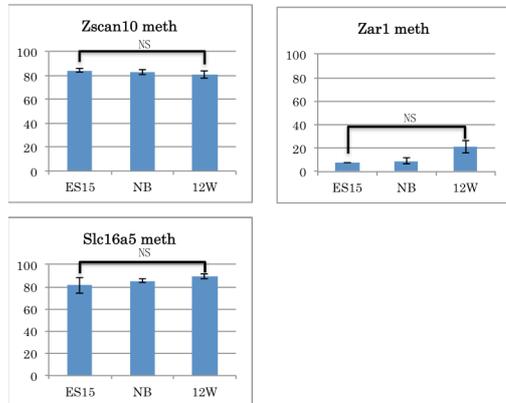


図2 腎組織におけるメチル化解析



その結果、肝・腎組織のいずれにおいても *ZSCAN10*、*SIC16A5* は高メチルであり、*ZAR-1* は低メチルであった。また、*SLC16A5*、*ZSCAN10* がマウスの肝組織の発達に伴い、有意に高メチル化状態へと変化していた。

(2) ヒト腫瘍細胞株を用いた候補遺伝子の定量的遺伝子発現解析

(1) でメチル化状態に変化を認めた遺伝子 *ZSCAN10*、*SIC16A5* において、ヒト正常(肝・腎)組織、小児肝腫瘍細胞株 (HepG2・Huh6)、小児腎腫瘍細胞株 (SKNEP-1・G401) に対して、Real time PCR を用いた発現解析を行った。

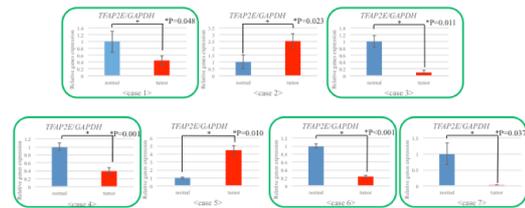
その結果、*ZSCAN10*、*SIC16A5* のどちらの遺伝子も、肝組織・腎組織での遺伝子発現に有意差を認めなかった。

(3) 臨床検体を用いた候補遺伝子の定量的遺伝子発現解析

上記のように、候補遺伝子の解析に一定に結果を得られなかった。

そこで、我々が神経芽腫において前述と同様の手法で新規腫瘍特異的遺伝子として同

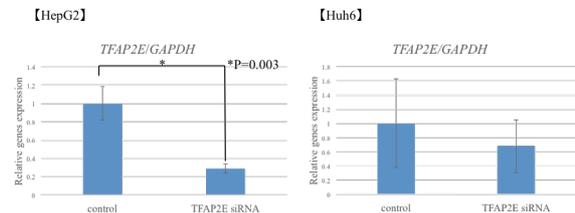
定し、機能解析を行った transcription factor activator protein-2 epsilon (*Tfap2e*) 遺伝子に着目した。*Tfap2e* は肝芽腫において研究報告のない遺伝子であり、当科で保存している肝芽腫臨床検体 7 症例に対して、正常肝組織と腫瘍組織での *Tfap2e* の発現状態を Real time PCR で解析した。



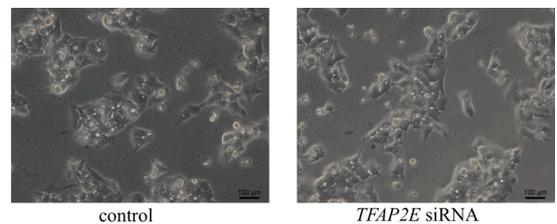
その結果、7 症例中 5 症例において、正常肝と比較し腫瘍検体で有意に低発現であった。

(4) 候補遺伝子の発現抑制状態での機能解析

肝芽腫細胞株 (HepG2 および Huh6) に *TFAP2E* に対する siRNA を導入し発現抑制効果を Real-time PCR で解析した。

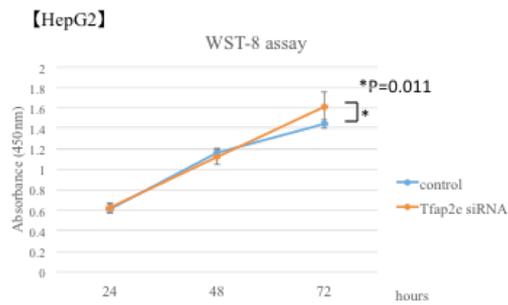


発現抑制の確認できた細胞株 HepG2 を用いて、*Tfap2e* の発現抑制状態での機能解析 (a) 細胞形態、(b) 細胞増殖能を行った。



(a) 細胞形態
形態変化は認めなかった。

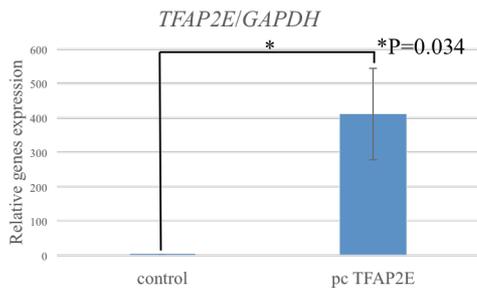
(b) 細胞増殖能
Tfap2e の siRNA を導入し、24・48・72 時間後の生細胞数を WST-8 assay で解析した。



その結果、siRNA 導入群において 72 時間後に有意に cell viability が上昇した。

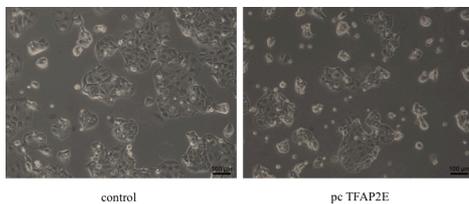
(5) 候補遺伝子の一過性過剰発現での機能解析

肝芽腫細胞株 Huh6 に *Tfp2e* の発現ベクターを導入し、一過性過剰発現を Real-time PCR で確認した。



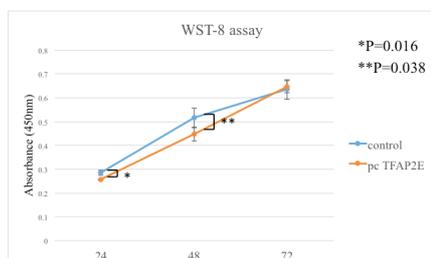
一過性過剰発現状態での機能解析 (a) 細胞形態 (b) 細胞増殖能の解析を、発現抑制状態と同様の手法で行なった。

(a) 細胞形態



形態変化に差はなかった。

(b) 細胞増殖能



一過性過剰発現状態で、24・48 時間後
で有意に cell viability が低下した。

以上の結果より、*Tfp2e* が肝芽腫に対して、
がん抑制遺伝子として機能する可能性が示
唆された。

今後は、*Tfp2e* の機能解析、および *in vivo*
での解析を計画する予定である。

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 1 件)

① Hoshi Reina, Sugito Kiminobu, Koshinaga Tsugumichi, et al.
Depktion of TFAP2E attenuates Adriamycin
-mediated apoptosiss in human
neuroblastoma cells.
Oncol Rep. 2017 Apr;37(4):2459-2464. doi:
10.3892/or.2017.5477. Epub 2017 Feb 24.
(査読あり)。

[学会発表] (計 3 件)

① 星 玲奈, 杉藤 公信, 越永 従道 (10
人中 10 番)、神経芽細胞腫細胞における
TFAP2E の腫瘍抑制的役割、第 58 回 日本小児
血液・がん学会学術集会、2016 年 12 月 15 日、
品川プリンスホテル (東京都・港区)

② 星 玲奈, 杉藤 公信, 越永 従道 (12
人中 2 番)、マウス皮膚腫瘍特異的 DNA メチ
ル化領域を用いた新規ヒト神経芽腫関連遺
伝子の探索、第 56 回 日本小児血液・がん
学会学術集会、2014 年 11 月 29 日、岡山コン
ベンションセンター (岡山県・岡山市)

③ 渡邊 揚介, 杉藤 公信, 越永 従道 (11
人中 2 番)、Sotos 症候群に合併した肝芽腫に
おける NSD1 遺伝子の DNA メチル化検討、
第 56 回 日本小児血液・がん学会学術集会、
2014 年 11 月 28 日、岡山コンベンションセ
ンター (岡山県・岡山市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉藤 公信 (SUGITO, Kiminobu)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：1 0 3 2 8 7 5 0

(2) 研究分担者

越永 従道 (KOSHINAGA, Tsugumichi)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：7 0 2 0 5 3 7 6

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：4 0 5 9 5 7 0 8