

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860802

研究課題名(和文)Evi5に注目した神経芽腫発症・進展の分子機構に関する研究

研究課題名(英文)Role of Evi5 in the progression of neuroblastoma

研究代表者

平瀬 敏志(Hirase, Satoshi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・医学研究員

研究者番号：50622883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：半数以上のStage 4神経芽腫患者では腫瘍が再発するのに対して、骨髄、皮膚、肝に局限した転移を示すStage 4S患者では腫瘍が自然消退する。Stage 4と4S患者の間に、このような違いをもたらす分子機構は、未だ明らかになっていない。そこで申請者は、Stage 4S患者の非腫瘍細胞における染色体転座部位t(1;10)(p22;q21)から単離された遺伝子Evi5に注目し、その機能解析を試みた。神経芽腫特異的な発現を示す新規Evi5アイソフォームを同定し、Evi5をノックダウンした神経芽腫細胞は、スフェア形成能、コロニー形成能、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能が低下することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：While more than 50% of neuroblastoma patients with stage 4 disease have experienced tumor relapses, patients with stage 4S pattern of disease (characterized by metastases limited to liver, skin, and bone marrow) have experienced spontaneous tumor regression. The molecular mechanism responsible for the difference between stage 4 and 4S patients remains elusive. In the present study, we have focused on Evi5, which was isolated from t(1;10)(p22;q21) in non-tumor cells from a stage 4S patient, and examined its role in the progression of neuroblastoma. We have identified a novel Evi5 isoform (Evi5-NB) that is specifically expressed in neuroblastoma, and revealed that the sphere, colony and xenograft formation of neuroblastoma cells were diminished upon Evi5 knockdown.

研究分野：小児科学

キーワード：神経芽腫 自然消退 Evi5

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、長期生存率が 40%に満たない Stage 4 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。転移を有し高リスクに分類される Stage 4 患者の 50%以上は再発しているが、骨髄、皮膚、肝に限局した転移を有する Stage 4S 患者は自然消退し得ることが知られている。神経芽腫の Stage 4 と 4S 患者の間に、このような違いをもたらす分子機構については、未だ明らかになっていない。

そこで申請者は、神経芽腫 Stage 4S 患者の非腫瘍細胞における染色体転座部位 t(1;10)(p22;q21)から単離された遺伝子 Evi5 に注目した。Evi5 は、最初に AKXD マウスの T 細胞性リンパ腫におけるレトロウイルス挿入部位から同定された遺伝子で、その後 Runx1 関連白血病の発症に関与することやショウジョウバエの細胞運動を制御することが報告されているが、神経芽腫の発症・進展との関連は未だ不明であった。

Evi5 は Tre2-Bub2-Cdc16 に保存された ~300 アミノ酸からなる TBC ドメインを有する TBC ドメイン Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 GTPase 活性化蛋白質 (TBC/Rab GAPs) のメンバーでもある。44 のメンバーから成る TBC/Rab GAPs は、60 以上のメンバーから成る Rab の特定のメンバーの活性を制御する。Rab は、細胞内小胞輸送の中心的な制御系で、各 Rab のメンバーが、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として働く。GTP 結合型 Rab は、細胞内の特定の膜ドメインに局在し、その部位で標的蛋白質(複合体)と特異的に結合することによって、その部位での小胞輸送の特異性・選択性を制御する。

この Rab の活性化・不活性化は、活性型である GTP 結合型から不活性型である GDP 結合型へ不活化する TBC/Rab GAPs に加えて、不活性型である GDP 結合型から活性型である GTP 結合型へ活性化する GDP/GTP 交換因子 (Rab GEF)、不活性型である GDP 結合型と細胞質で結合する GDP 解離抑制因子 (Rab GDI) によって時間的・空間的に制御されている。Rab11 は、エンドソームに局在して細胞膜とエンドソームの間のリサイクリングを制御しており、Evi5 と結合することが報告されていた。Rab の活性制御の破綻は、多数のヒト疾患の原因となることが知られており、がんの発症・進展に関与する例も報告されている。

これまでに申請者は、神経芽腫の予後改善を目指して、神経芽腫患者の微小残留病変 (MRD) に注目した研究に従事してきた。MRD は、がん細胞集団の中ごく少数存在する自己複製能と多分化能を持つがん幹細胞から構成されており、神経芽腫の再発は、治療によっても残存し潜んでいたがん幹細胞の再活性化によると考えられる。

神経芽腫患者の予後改善には、MRD を正しく検出することが必須だと考えられる。腫瘍細胞特異的な遺伝子の同定されていない神経芽腫では、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た MRD 評価法が報告されてきた。最初に、tyrosine hydroxylase (TH) 遺伝子が、神経芽腫 MRD マーカーとして報告されたが、TH 陰性症例が少なからず存在することが明らかになった。次に、paired-like homeobox 2b (PHOX2B) がより高感度な MRD マーカーとして報告されたが、PHOX2B にも、極少数ながら陰性症例の存在が指摘された。そこで、複数のマーカーを組み合わせたより偽陰性の少ない MRD 評価法が、多くのグループから報告された。しかし、報告するグループ毎に、組み合わせるマーカー遺伝子自体が異なっていた。そこで、申請者は、これまでに報告された MRD マーカーの神経芽腫がん幹細胞における発現を再検証し、11 マーカーを用いたリアルタイム RT-PCR による新しい神経芽腫患者 MRD の評価法を開発した。

そこで本研究では、Evi5 の神経芽腫発症・進展における役割を明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

Stage 4S 患者における神経芽腫の発症・進展の分子機構の理解を目指して、Stage 4S 患者の非腫瘍細胞における染色体転座部位 t(1;10)(p22;q21)から単離された遺伝子 Evi5 の機能解析を行なった。

3. 研究の方法

(1) 新規 Evi5 アイソフォーム (Evi5-NB) の単離・同定

神経芽腫細胞株 BE(2)-C 細胞から cDNA を調整し、Evi5 の full-length cDNA を PCR でクローニングした。得られた全てのクローンを DNA シークエンスし、新規 Evi5 アイソフォームを同定した。

(2) Evi5 の発現解析

ヒトの組織および細胞株から cDNA を調整し、Evi5 の発現をアイソフォーム特

異的なプライマーを用いてリアルタイム RT-PCR で定量した。

(3)Evi5 の機能解析

Evi5 shRNA を恒常的に発現する神経芽腫細胞株 BE(2)-C 細胞を樹立し、スフェア形成能を解析した。さらに、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。

(4)神経芽腫 MRD の評価

スフェアとして培養した BE(2)-C 細胞 (がん幹細胞) における発現を再検証した 11 の MRD マーカー遺伝子 (CHRNA3, CRMP1, DBH, DCX, DDC, GABRB3, GAP43, ISL1, KIF1A, PHOX2B, TH) 発現をリアルタイム RT-PCR で定量した。各マーカー毎に設定した基準値を超える発現を示したマーカーを、MRD 陽性マーカーと定義し、11 マーカー中 MRD 陽性マーカーを 1 つ以上含む検体を MRD 陽性と判定した。

4. 研究成果

(1)新規 Evi5 アイソフォーム (Evi5-NB) の同定と発現解析

神経芽腫細胞株 BE(2)-C 細胞の cDNA から新規 Evi5 アイソフォーム (Evi5-NB) を単離・同定した。Evi5-NB は、神経芽腫細胞に特異的な発現を示した。

(2)Evi5 の神経芽腫の発症・進展における役割

Evi5 をノックダウンした神経芽腫細胞は、スフェア形成能、コロニー形成能、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能が低下した。

(3)神経芽腫患者の骨髄と末梢血検体における 11MRD マーカーの発現解析

神戸大学病院および兵庫県立子ども病院で診断・治療された高リスク神経芽腫患者 7 名から同時に採取した骨髄と末梢血各 23 検体 (計 46 検体) における 11MRD マーカーの発現をリアルタイム RT-PCR で定量した。骨髄で感度の高い (陽性検体数の多い) マーカーは、DBH と PHOX2B だったが、末梢血では KIF1A と CRMP1 の感度が高かった。各マーカーの骨髄と末梢血検体における MRD 陽性数に基づいた順位の相関をスピアマンの相関係数を用いて評価すると、有意な相関を認めなかった。

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) 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* (2015) 46: 1089-1098. (査読有) DOI: 10.3892/ijo.2014.2801

(2) 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 Let* (2015) 10: 3228-3232. (査読有) DOI: 10.3892/ol.2015.3710

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 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

(2) 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

(3) 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

(4) 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

(5) 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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平瀬 敏志 (Hirase Satoshi)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号 : 50622883