

16-17 神経芽腫進展の診断基準確立・分子機構解析とそれに基づく診断・治療法の確立

主任研究者 千葉県がんセンター研究所 中川原 章

研究成果の要旨

平成16年、17年の2年間にわたり、難治性神経芽腫の克服を目的として、神経芽腫の診断法および新しい治療法開発のためのターゲット分子の同定と機能解析を中心に研究を進め、以下の成果を得た。(1) 神経芽腫のゲノムおよび発現の網羅的解析をマイクロアレイを用いて検索し、予後に相関するゲノム異常と発現プロファイルの解析とともに、MYCN ターゲット遺伝子の大量同定とそれらによる神経芽腫細胞の分化制御における意義を明らかにした。(2) 神経芽腫進展を制御する新規な重要遺伝子として、受容体シグナルによる制御機構における ShcC 下流ターゲット分子の同定とその機能を解析した。また、予後良好な神経芽腫に特異的に発現している新規 BMCC1 の GAP 機能による神経細胞分化の制御機構を明らかにし、新規受容体遺伝子 NLRR1 の機能、1p にマップされる神経芽腫抑制遺伝子 KIF1B の細胞周期制御の破綻によるアポトーシス誘導機構などを明らかにした。これらの分子は治療法開発のターゲットとなりうる。(3) MYCN トランスジェニックマウスが MK を高発現することを見だし、発がんへの関与と治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

研究者名および所属施設

分担研究課題

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
中川原 章	千葉県がんセンター・研究所・所長	神経芽腫の予後に関わる遺伝子の同定とその臨床応用に関する研究
堺 隆一	国立がんセンター研究所・細胞増殖因子研究部・部長	神経芽腫進展のシグナル伝達の解析 神経芽腫の遺伝子治療法開発
門松 健治	名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座分子生物学・教授	マイクロアレイを用いた神経芽腫の予後に関わる遺伝子の解析
市川 仁	国立がんセンター研究所・腫瘍発現解析プロジェクト・プロジェクトリーダー	遺伝子診断、組織バンクの確立と新しい診断法の開発 神経芽腫の新しい分子病理診断法の開発 遺伝子情報による神経芽腫の性状予測と治療強度の層別化の可能性-clonal evolution に関する検討
檜山 英三	広島大学自然科学研究支援開発センター・教授	
大喜多 肇	国立成育医療センター研究所、発生・分化研究部、機能分化研究室・室長	総合研究報告
堀川洋子	国立病院機構 呉医療センター、小児科、臨床研究部	1 研究目的 生後6ヶ月時のマススクリーニング休止後、神経芽腫はその大部分が進行例として発見され、現在もなお治療に抵抗性である。このような難治性神経芽腫の予後を改善するために、基礎的な基盤研究を充実させ、新しい研究成果に基づいた正確な診断と予後予測、そして新しい治

*1：平成16年4月1日～平成18年3月31日

1 6-1 7 神経芽腫進展の診断基準確立・分子機構解析とそれに基づく診断・治療法の確立

療法を開発を目的として研究を行った。本研究では、1) 神経芽腫における遺伝子や蛋白質レベルでの発現解析を網羅的に行うとともに、予後決定に関わる因子を解析し、分子レベルでの新しい予後診断を確立する。また、マイクロアレイによる解析から MYCN により制御される生物学的特性の分子機構を明らかにする。3) 転写調節やシグナル伝達の面から神経芽腫の進展を制御する分子メカニズムを明らかにすることにより、病態に基づいた新しい治療法を開発する。4) 難治性神経芽腫に対する遺伝子治療法開発の基盤研究を展開する。これらを目的とした本研究により、遺伝子・蛋白質・病理レベルでの総合的な診断システムの確立と分子病態に基づいた画期的な新しい治療法が開発が可能になるものと期待される。

2 研究方法

(1) ゲノムおよび遺伝子発現の網羅的解析

アフィメトリックス社の SNPs アレイを用いた。

(2) 遺伝子機能の解析

通常分子生物学的方法を用いた。遺伝子発現の抑制には siRNA を使用した。

(3) トランスジェニックマウス

MYCN トランスジェニックマウスを米国 ATCC から購入した。

3 研究成果

(1) 神経芽腫遺伝子診断体制の強化

我が国における神経芽腫のトランスレーショナルリサーチ研究の基盤を確立するため、組織バンクと遺伝子診断を行う体制を整備するとともに、中央病理診断を行うためのシステム作りを行い、国際神経芽腫病理診断

(INPC) を我が国に導入・定着させるための準備を行った。さらに、スタンプ標本やホルマリン固定パラフィン切片を用いた fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により神経芽腫の染色体異常を安定的に検出する方法の確立を試みた。これらの神経芽腫診断体制の確立は、現在進められている全国統一神経芽腫グループスタディの基盤となるものと期待される。

(2) 神経芽腫のゲノム的手法による新しい分子診断法の開発

DNA マイクロアレイ、アレイ CGH (comparative genomic hybridization) を用いて、予後予測に強く関連する領域および候補遺伝子を新たに同定した。また、11q 欠失領域に、神経芽腫細胞腫細胞株の発育を抑制する遺伝子を見いだした。ゲノム異常の同定には、病理組織切片を用い

た FISH 法も導入し、リスク分類に必要な 1p36, 11q 欠失、MYCN 増幅の迅速診断法の確立を試みた。さらに、11q 欠失領域に新たながん抑制候補遺伝子を同定した。

(3) マイクロアレイによる MYCN ターゲット遺伝子の同定と機能的制御機構の解明

MYCN 増幅は神経芽腫の最も重要な予後決定因子であり、この細胞内シグナルをターゲットとした治療法が開発が重要である。そこで、MYCN 増幅のある多数の神経芽腫細胞株とその増幅のない複数の細胞株を対象に MYCN-siRNA を細胞内導入し、MYCN 発現低下に伴う遺伝子発現の変化を網羅的に解析したところ、MYCN 高発現が神経芽腫の分化抑制に直接的に関わっていることが示唆され、それに関与すると思われる多数の重要遺伝子が同定された。

(4) 神経芽腫進展を制御する分子標的としての細胞内シグナル伝達分子の解析

予後を大きく左右する MYCN を siRNA を用いて発現を低下させたところ、増殖の抑制だけでなく、付着性の増大、神経突起の伸長等の形態変化を引き起こし、MYCN が神経芽腫細胞の分化抑制に大きく関わっていることが示唆された。また、神経芽腫細胞株で高頻度にチロシンリン酸化を受けるドッキング分子 ShcC が、腫瘍で広範に発現する ShcA と対照的に、その SH2 ドメインを介してヌードマウスの造腫瘍能や接着非依存性増殖能に対し著明な抑制効果を持つことを明らかにした。さらに、その作用には Fyn などのチロシンキナーゼ活性および Cas を含む基質蛋白質のリン酸化を抑制する経路が関わっていることが示唆された。一方、ShcA と ShcC はともに神経芽腫の運動能・転移能を促進する方向に働くことが確認された。また、ShcC のドミナントネガティブ型の過剰発現系によりリン酸化シグナルをブロックすると、下流の Erk 経路や PI3K-Akt 経路が著名に抑制されて、細胞運動能や浸潤能の低下がみられた。一方、神経芽腫 cDNA library から新規に同定された BMCC1 は、TrkA 受容体の活性化によりリン酸化され、神経芽腫細胞の増殖と神経突起伸長を制御することが明らかとなった。BMCC1 は EGF 受容体とも結合することが明らかになり、NGF や EGF による神経分化の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、分子標的探索としては、1p36.2 ホモ欠失領域から同定した KIF1B-beta の機能解析から、本遺伝子が神経芽腫の抑制遺伝子であることを明らかにした。さらに、予後の悪い神経芽腫で有意に高発現している NLRR1 について新たに解析を進め、本受容体蛋白質は高度に 0-

16-17 神経芽腫進展の診断基準確立・分子機構解析とそれに基づく診断・治療法の確立

リンク型の糖鎖修飾を受けており、機能が全く不明の orphan receptor であることが明らかとなった。

(4) 難治性神経芽腫に対する遺伝子治療法の開発
神経芽腫細胞に高発現するミッドカイン (MK) を治療の分子標的と設定し、MK がエンドサイトーシス後に細胞質へ何らかの機構で確かに移行すること、そして細胞質あるいは核へ移行した MK がプロテアゾームによって分解されることを明らかにした。また、治療法の開発として、MK に対するモルフォリノ骨格のアンチセンスが安定性・安全性に優れ、治療効果があることを明らかにした。一方、siRNA を用いた癌治療を目指し、VEGF siRNA を局所投与したところ、ヒト前立腺癌細胞のヌードマウス皮下腫瘍に対する著しい抑制効果が得られた。さらに、神経芽腫の新しい治療法開発のために、MYCN トランスジェニックマウスを用いた系を確立した。これから発生してくる神経芽腫は Midkine (MK) を高発現していた。腫瘍発生に MK 発現が必要条件であるのかどうか、現在 MK ノックアウトマウスとの掛け合わせを行っている。また、この系を用いて、MK をターゲットとした治療法の開発を検討中である。

3 倫理面への配慮

1) 研究目的のみの検体の使用については、各施設の倫理審査委員会で審査され「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (2001 年 3 月)」を順守することを条件に承認される。

2) 動物実験は各所属施設の定める動物実験倫理規定に従って、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛をとまなう実験への十分な配慮のもとに、慎重に進める。

3) ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) は取り扱わない。