

平成 29 年 9 月 7 日

小児がん「神経芽腫」のがん化機構の一端を解明

—ポリコーム抑制複合体 2 の寄与を明らかにし、新たな分子標的薬の開発に期待—

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長：門松 健治）分子生物学の坪田 庄真（つぼた しょうま）研究員と門松 健治（かどまつ けんじ）教授らの研究グループは、小児がんの一つである神経芽腫の成り立ちについて研究を行い、エピゲノム制御分子の一つであるポリコーム抑制複合体 2 (Polycomb repressive complex 2、PRC2) が、神経芽腫の発生と悪性度に大きく関与していることを明らかにしました。

一般的に成人がんでは、遺伝的要因や環境要因（UV やたばこなど）、組織幹細胞の細胞増殖に伴う DNA 複製エラーなどによる遺伝子変異が発がんの主な原因です。一方、小児がんの神経芽腫は、体が作られる発生期に起こるため、がん化と正常発生の細胞分化プログラムが密接に関連していると考えられます。しかし、説明可能な遺伝子異常（DNA の点変異など）が少なく、その発がん機構はよくわかっていないのが現状です。

研究グループでは、神経芽腫モデルの TH-MYCN マウスを用い、その組織から、がん化した細胞を選択的に培養できる新規な細胞培養法を確立し、がん化初期の細胞を捉えることに成功しました。この培養法で得られたがん化初期の細胞を対象に網羅的な遺伝子発現解析・エピゲノム解析を行い、エピゲノム制御分子の一つである PRC2 が発がんに関与していることを初めて明らかにしました。また、約 500 例の神経芽腫患者から集められた遺伝子発現データを解析した結果、PRC2 によって制御されるターゲット遺伝子の発現が、神経芽腫の悪性度（ステージや患者の予後）と著しく相関することがわかりました。本研究により、神経芽腫の発がん機構の一端が明らかになり、さらには PRC2 をターゲットにした分子標的薬の開発が期待されます。

本研究は、科研費（特別研究員奨励費、基盤研究（C）、挑戦的萌芽研究）、日本医療研究開発機構（革新的がん医療実用化研究事業「なぜ遺伝子変異なしでがんができるか」：その分子基盤解明と標的探索）、科学技術振興機構（戦略的創造研究推進事業（CREST）「離散構造統計学の創出と癌科学への展開」）の支援により行われました。研究成果は、2017 年 8 月 14 日にアメリカ癌学会誌「Cancer Research」のオンライン速報版で公開されました。

小児がん「神経芽腫」のがん化機構の一端を解明 —ポリコーム抑制複合体2の寄与を明らかにし、新たな分子標的薬の開発に期待—

ポイント

- マウスモデルを用いて小児がん神経芽腫のがん化初期の細胞を捉えました。
- がん化には遺伝子変異ではなく、エピゲノム異常が関わることがわかりました。
- エピゲノムをコントロールすることで、神経芽腫を治療できる可能性を見出しました。

1. 背景

神経芽腫は、10万人中2.5～5人に発症する小児がんの一つです¹。患者の90%が10歳未満に発症し、診断時の中央年齢は18ヶ月ですが、発症年齢が高いほど患者の予後は悪いという特徴があります¹。日本国内の統計によると2014年に162名（20歳未満）の患者が登録されています²。低・中リスク神経芽腫患者の予後は良いですが、高リスク神経芽腫は化学療法や分化治療、免疫療法などの治療が適用された場合でも、5年生存率が50%であり、まだまだ改善する必要があります¹。生存率だけでなく、患者の生活の質の向上のためにも、分子標的薬を含む新規治療法開発が望まれているのが現状です。

成人がんでは、遺伝的要因や環境要因（UVやたばこなど）、組織幹細胞の細胞増殖に伴うDNA複製エラーなどによる遺伝子変異が発がんの主な原因です。一方、神経芽腫は体が作られる発生期に起こるため、がん化と正常発生の細胞分化プログラムが密接に関連していると考えられます。近年、神経芽腫を対象にした大規模なゲノム解析研究が行われました³。240例の高リスク神経芽腫（18ヶ月以上のステージ4）を対象にゲノム異常を調べた結果、遺伝子レベルでの点変異や挿入・欠失の割合が低く、MYCN遺伝子増幅を含めた染色体レベルでの増幅・欠失が、ほとんどのがんで確認されました³。ゲノム異常が明らかになってはきましたが、説明可能な遺伝子異常（DNAの点変異など）が少なく、未だにその詳細な発がん機構はわかっていません。発がん機構の解明は、基礎医学の発展のみならず、新たな分子標的薬の探索に直結すると思われます。本研究では、神経芽腫モデルのTH-MYCNマウス⁴（注1）を用いて、いつ、神経芽腫の発がんが始まり、どのような分子機構が関与しているかを調べました。

2. 研究成果

本研究で実験対象にしたTH-MYCNマウスは、交感神経節の前駆細胞に、がん遺伝子であるMYCNが発現し神経芽腫を発症します⁴。MYCNの発現により、がん化がスタートしますが、その時期や、がん化に関わる分子機構はわかっていませんでした。また、がん化は少数の細胞からスタートし増殖しますが、がん化初期のごく少数の細胞を対象にした網羅的な遺伝子発現解析（注2）は技術的に難しいという問題がありました。この問題点を解消するために、細胞増殖能を獲得した未分化な神経芽腫細胞を「スフェア」と呼ばれる球状の細胞塊として培養する新しい培養法を確立しました（図1）（注3）。この培養法を利用して、がん化が起きる時期とその機構の解明に挑みました。

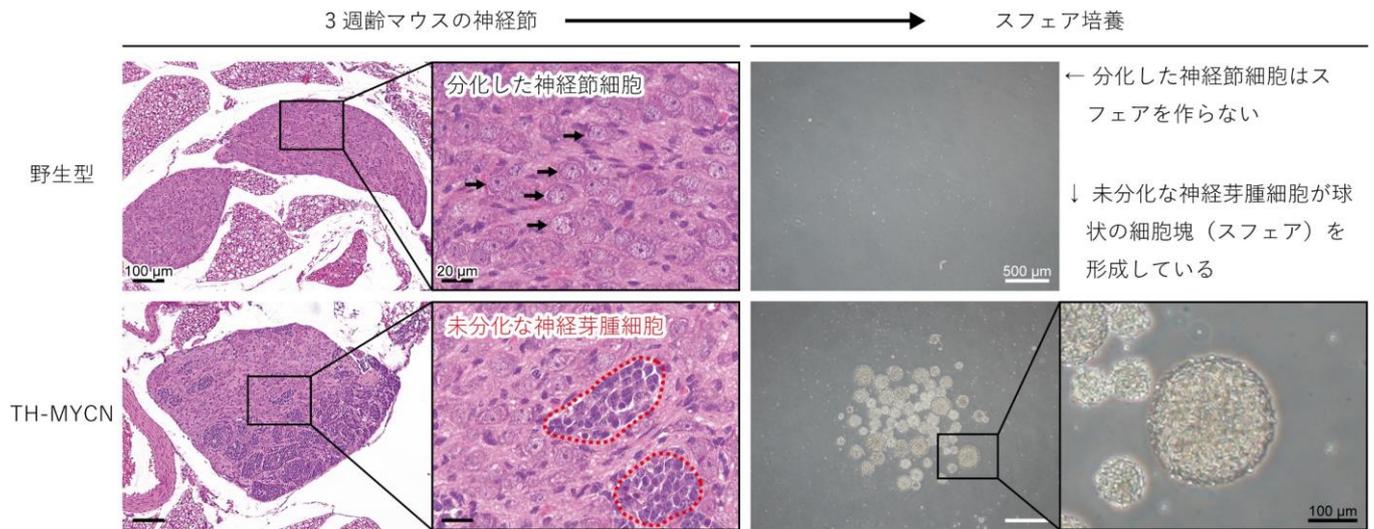


図 1 新規培養法により未分化な神経芽腫細胞がスフェアを形成する

はじめに、がん化の時期を明らかにするために、MYCN の mRNA 発現パターンを in situ hybridization 法 (注 4) により調べました。胎生期 13.5 日、生後 0 日、2 週齢マウスの組織を調べた結果、胎生期 13.5 日においてごく僅かな細胞で MYCN mRNA が発現し、その発現細胞が生後 0 日、2 週齢になるにつれて増えていくことがわかりました (図 2)。これらの時期の組織から取り出した細胞でスフェア培養を行った結果、約 50% の胎生期 13.5 日マウスから細胞増殖能を獲得し形質転換したがん細胞が培養できました。また、これら細胞が皮下で神経芽腫を形成することを確認しました (注 5)。一連の実験から、がん化は早くとも胎生期 13.5 日にスタートしていると結論付けました。

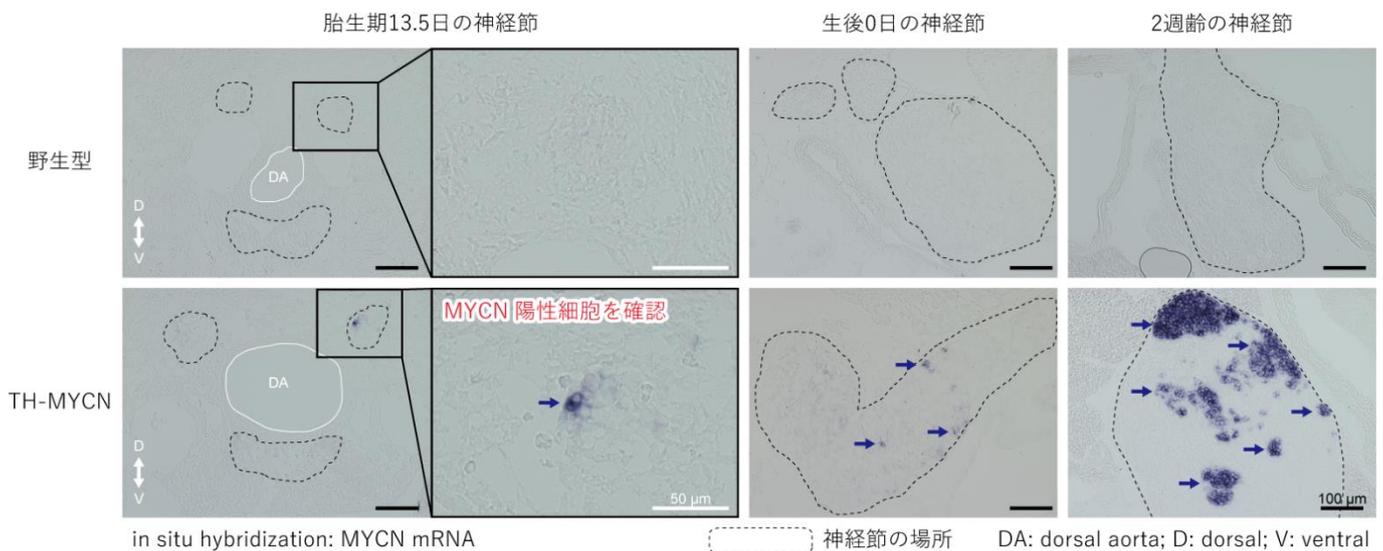


図 2 MYCN 遺伝子が早くとも胎生期 13.5 日から発現している

次に、がん化の機構を詳細に調べるために、がん化した早期のスフェア細胞を対象にマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現を網羅的に解析しました (注 2)。具体的には、TH-MYCNC 由来のがん化したスフェア細胞と、野生型マウス由来の正常スフェア細胞における遺伝子発現を比較しました。この解析の結果、今まで神経芽腫

への関与がほとんど報告されていなかったエピゲノム制御分子の一つであるポリコーム抑制複合体 2 (PRC2) が遺伝子発現の差に大きく影響していることが明らかになりました (注 6)。PRC2 は、Ezh2、Eed、Suz12 を含むタンパク質複合体であり、ヒストンタンパク質を修飾 (ヒストン H3 のリジン残基 27 番目をトリメチル化する、H3K27me3 と呼ぶ) することで、そのターゲット遺伝子群の発現を抑制します。興味深いことに、PRC2 構成分子の Ezh2 や Eed、Suz12 の発現自体に変化は見られませんでした。そのターゲット遺伝子群の発現は顕著に低下しており、また、ターゲット遺伝子群のゲノム領域の H3K27me3 修飾が増加していました (図 3)。これらの結果は、PRC2 がターゲット遺伝子のゲノム領域で H3K27me3 修飾を行い、そのターゲット遺伝子の発現を抑えていることを示しています。

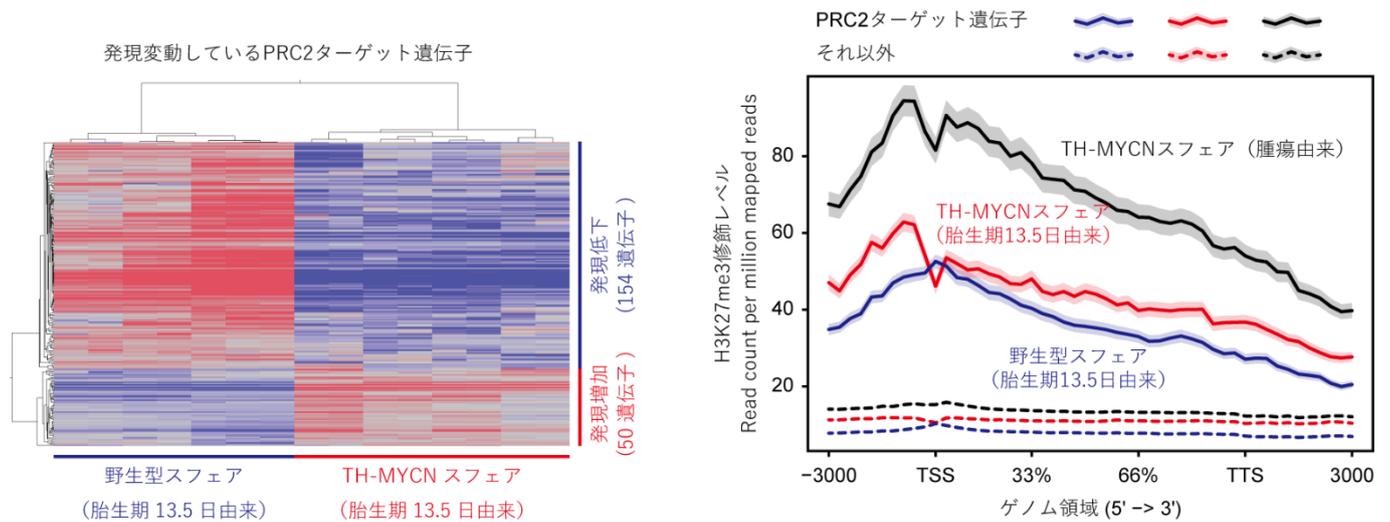


図 3 PRC2 ターゲット遺伝子の発現が低下し (左)、ゲノム上の H3K27me3 修飾が増えていた (右)

Ezh2 はヒストンメチル基転移酵素であり、PRC2 の酵素活性を担っています。次に、Ezh2 (を含む PRC2) ががん細胞の生存に必要であるかどうかを確かめるための介入実験を行いました。Ezh2 に対する shRNA (注 7) や阻害剤 EPZ-6438 (注 8) を用いて Ezh2 の機能を阻害した結果、どちらの手法でもスフェア細胞の増殖が著しく抑えられました (図 4)。Ezh2 阻害剤により、PRC2 ターゲット遺伝子の発現抑制が解除されることが確認されました。また、TH-MYCN マウスに Ezh2 阻害剤を投与したところ、マウス内の腫瘍増殖が著しく抑えられました (図 4)。これらの結果は、神経芽腫細胞の生存に Ezh2 が必須であることを示しています。

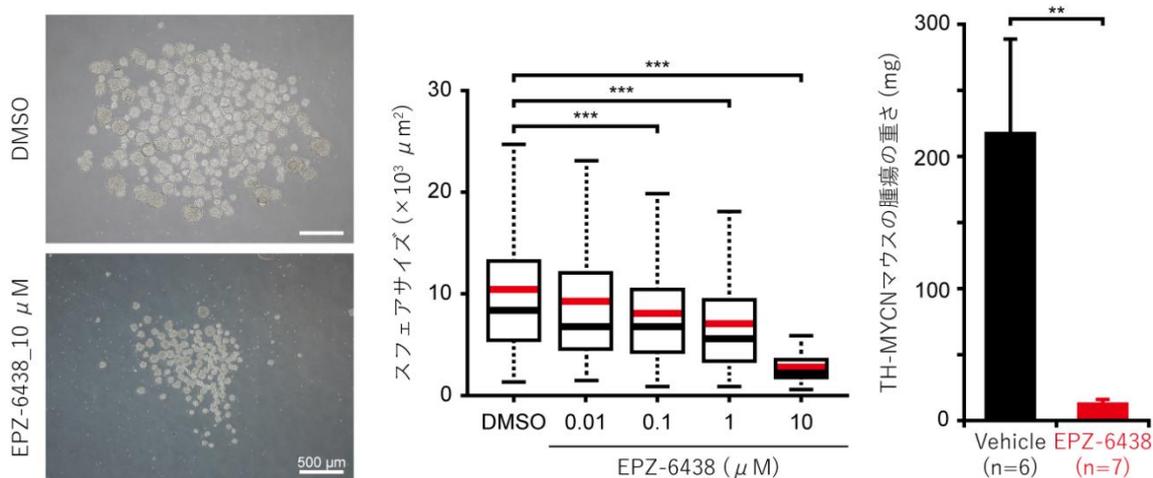


図 4 Ezh2 阻害剤は TH-MYCIN スフェア（胎生期 13.5 日由来）の形成を濃度依存的に抑え（左と中央）、
TH-MYCIN マウス内の腫瘍増殖を著しく抑えた（右）

最後に、公共データベースに蓄積された神経芽腫 500 例の遺伝子発現データを用いて PRC2 ターゲット遺伝子群の発現とがんの悪性度を評価しました。興味深いことに、PRC2 ターゲット遺伝子群の発現が、より悪性度の高い神経芽腫（MYCN 増幅型、高リスク、ステージ 4）において有意に低下しており、予後不良とも逆相関していました。PRC2 ターゲット遺伝子群の発現パターン、すなわち、PRC2 による遺伝子発現の制御が神経芽腫の悪性度と大きく関連していることが明らかになりました。

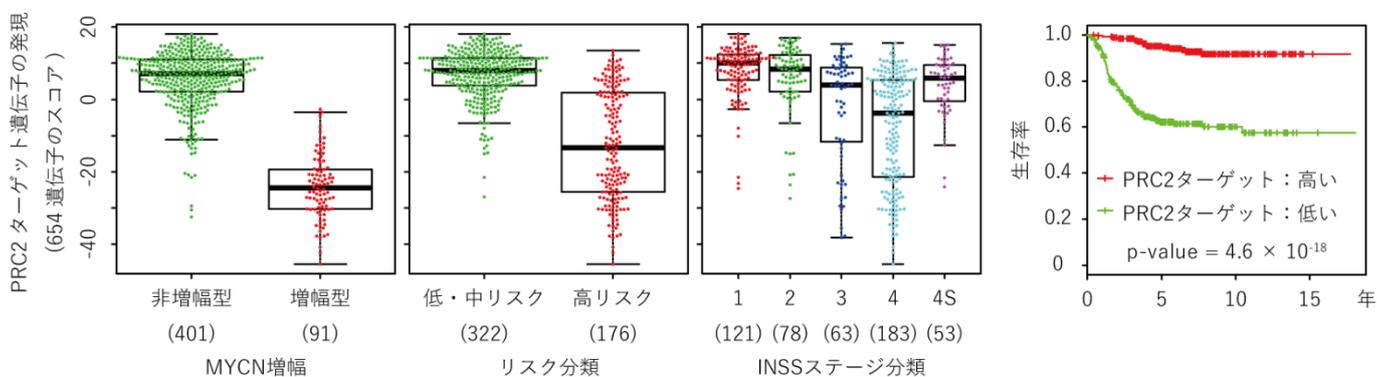


図 5 PRC2 ターゲット遺伝子の発現スコアが MYCN 増幅型・高リスク・ステージ 4
神経芽腫で低く（左 3 つ）、発現スコアが低いと患者の予後も悪い

3. 今後の展開

本研究により、神経芽腫の発生（特に MYCN によるがん化）には、PRC2 を介したエピゲノム異常が関与していること及びその異常がヒト神経芽腫の悪性度と相関していることが明らかになりました。しかし、どのように PRC2 の遺伝子発現制御が変化しているか、すなわち、PRC2 による遺伝子発現制御を左右する分子については、まだ明らかになっていません。また、今回は MYCN により引き起こされる神経芽腫に着目して研究を進めており、それ以外の神経芽腫の発がん機構については、今後の課題となりました。一方で、本研究により明ら

かになった PRC2 のがん化への関与や、そのターゲット遺伝子の発現ががんの悪性度と相関するという事実は、新たな診断法やこの機構をターゲットにした分子標的薬の開発を期待させる成果となりました。

4. 用語説明

(注1) TH-MYCN マウス

1997年に Weiss らによって作成された神経芽腫のトランスジェニックマウスモデルです⁴。外来遺伝子のプロモーターと MYCN 遺伝子がマウスゲノム中に組み込まれています。神経芽腫のがん遺伝子である MYCN が、チロシン水酸化酵素 (Tyrosine hydroxylase, TH) のプロモーターにより交感神経系の細胞特異的に発現します。我々が系統維持している 129^{Ter}/SvJc1 マウスは、交感神経節の一つであり腎臓の間に位置する上腸間膜神経節に神経芽腫を発症します。特徴として、生後の野生型マウスの神経節には分化が完了した交感神経節細胞が存在しますが、TH-MYCN マウスの神経節には未分化で増殖性の神経芽腫細胞が存在します (図 1)。この細胞が増殖を繰り返して大きな腫瘍を形成し、最終的にマウスは 10 週~20 週齢にかけて死亡します。当研究室では、このマウスモデルを用いて発がんに寄与する遺伝子の探索を行ってきました。

(注2) マイクロアレイ遺伝子発現解析

数万の遺伝子がヒトやマウスの様々な細胞で発現していますが、それら遺伝子の発現量を網羅的に調べる方法が遺伝子発現解析です。最近では、ハイスループットシーケンス技術を利用した RNA シーケンスが主流になっていますが、我々は RNA シーケンスより昔から利用されてきたマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行いました。マイクロアレイ解析は、各遺伝子に特徴的な DNA プローブがスポットされたスライドを用います。約 6 万種類の DNA プローブが存在するので、ほぼ全ての遺伝子を検出することが出来ます。本研究では、アジレント・テクノロジー社製の「SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8x60K」を用いました。

(注3) スフェア培養法

一般的に細胞培養と言えば、培養皿の上に細胞が張り付いた状態で行います。これらの培養皿は細胞が接着できるように表面加工されていますが、正常な細胞(血球系細胞以外)は何かには接着しないと生存出来ません。一方、がん細胞は接着せずに生存・増殖できるという特徴があり、このことを「足場非依存的な増殖」と呼んでいます。また、がん細胞の中でもがん幹細胞などは、高い足場非依存的増殖能を示し、これらを細胞が接着できない状態で培養すると球状の細胞塊(スフェア)を形成します。このスフェア培養法は、がん細胞の増殖能を評価する一つの指標になり、がん化した細胞のみを選択的に培養することができるため、がん研究においては重要な実験手法の一つになっています。本研究では、過去に報告された培養方法やその培地組成を検討し、新しい培養法を提案しました。

(注4) in situ hybridization 法

組織切片中の遺伝子発現を調べる方法が in situ hybridization 法です。これは、目的遺伝子 (mRNA) に対

する RNA プローブを用いて、どの細胞で目的遺伝子が発現しているかを調べる方法です。本研究では、MYCN 遺伝子（ヒト由来）に対する特異的な RNA プローブを作成し、in situ hybridization 法により MYCN の発現時期と発現細胞を特定しました。

（注 5）皮下腫瘍形成能

がん細胞の悪性度やがん幹細胞の存在を調べるために、がん細胞をマウスの皮下へ移植し腫瘍形成能を評価することが出来ます。本研究では、がん細胞の悪性度を評価するために、培養したスフェア細胞を野生型マウスの皮下へ移植し、その後の皮下腫瘍形成能を評価しました。胎生期 13.5 日由来のスフェア細胞から出来た腫瘍が、病理学的に神経芽腫であることを確認しました。

（注 6）ポリコーム抑制複合体 2 (PRC2、Polycomb repressive complex 2)

エピゲノム制御には様々な分子や複合体が関与していますが、PRC2 はその中の一つです。基本的に、Ezh2、Eed、Suz12 という 3 つのタンパク質が複合体を形成し、さらに他のタンパク質や long non-coding RNA などと結合することで、その活性やゲノム上の位置が制御されています。Ezh2 は、ヒストンメチル基転移酵素であり、DNA が巻きついたヒストンタンパク質 Histone H3 の N 末から 27 番目のリジン残基にメチル基を 3 つ修飾します (H3K27me3 修飾と呼ばれている)。PRC2 ターゲット遺伝子のプロモーター領域で H3K27me3 修飾が行われると、その遺伝子の発現が抑制されます。本研究では、神経芽腫において PRC2 ターゲット遺伝子の発現に大きな変化が起きていることを見出し、PRC2 の中でも Ezh2 に着目して介入実験を行った結果、Ezh2 が神経芽腫の生存に必須であることが明らかになりました。

（注 7）shRNA (short hairpin RNA)

shRNA は分子生物学の実験で頻繁に使われる短い RNA 配列で、RNA 干渉と呼ばれる mRNA を分解する細胞内システムを利用したものです。標的遺伝子に対して shRNA を設計し細胞内で発現させると、shRNA が結合することで標的遺伝子が分解されます (ノックダウンと呼ぶ)。標的遺伝子をノックダウンすることで、細胞の生存などに影響が出れば、その遺伝子が重要であるということを確認することが出来ます。本研究では、Ezh2 の生存に及ぼす影響を調べるために、Ezh2 mRNA に対する shRNA を用いてノックダウン実験を行いました。

（注 8）Ezh2 阻害剤 (EPZ-6438)

Ezh2 は上記で説明したとおり、ヒストンメチル基転移活性を有しています。メチル基供与体である S-アデノシルメチオニンからメチル基を受け取り、ヒストン H3 のリジン 27 番目に移します。Epizyme 社により開発された EPZ-6438 は、Ezh2 の酵素活性を阻害 (基質と競合阻害) する化合物で、いくつかのがんに対して効果があることが示されており、臨床試験 (第 1/2 相) が進められています (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01897571)。本研究では、shRNA 同様に Ezh2 の機能が生存に影響を及ぼすかどうかを調べるために、EPZ-6438 を用い、スフェア細胞の増殖能、薬剤投与後の遺伝子発現、TH-MYCN マウスへの投与による神経芽腫の増殖抑制効果を検証しました。

5. 参考文献

1. Matthay KK, et al. Neuroblastoma. Nat Rev Dis Primers. 2016 Nov;10;2: 16078. DOI: 10.1038/nrdp.2016.78.
2. 国立がん研究センターがん対策情報センター、“がん診療連携拠点病院院内がん登録全国集計 2014 年全国集計報告書”、平成 28 年 9 月
リンク : http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/brochure/hosp_c_registry.html
3. Pugh TJ, Morozova O, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. Nat Genet. 2013 Mar;45(3): 279-84. DOI: 10.1038/ng.2529.
4. Weiss WA, et al. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. EMBO J. 1997 Jun 2;16(11): 2985-95.

6. 発表雑誌

Shoma Tsubota¹, Satoshi Kishida¹, Teppei Shimamura², Miki Ohira³, Satoshi Yamashita⁴, Dongliang Cao¹, Shinichi Kiyonari¹, Toshikazu Ushijima⁴, Kenji Kadomatsu¹

¹ Department of Biochemistry, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

² Division of Systems Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

³ Research Institute for Clinical Oncology, Saitama Cancer Center, Saitama, Japan

⁴ Division of Epigenomics, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan

PRC2-mediated transcriptomic alterations at the embryonic stage govern tumorigenesis and clinical outcome in MYCN-driven neuroblastoma, *Cancer Research*

DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3144>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Cancer_R_20170907en.pdf