

ヒト神経芽腫細胞株における
Zygote Arrest 1 遺伝子の機能解析
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系機能生理学専攻

渡邊揚介

修了年 2016 年

指導教員 越永従道

【論文要約】

はじめに

神経芽腫（以下、本症）は神経堤細胞を起源とする悪性固形腫瘍であり、副腎髄質や傍脊椎交感神経節から多く発生する胎児性腫瘍である。本症の発生頻度は米国の報告では 7,000 出生あたり約 1 例であり、小児悪性固形腫瘍の中では脳腫瘍に次いで頻度が高い。本症は組織学的・生物学的な特性が非常に多様な腫瘍であるため、現在 Children's Oncology Group では臨床的特徴と生物学的特性に基づいて低・中間・高リスクと 3 群に分類している。このリスク分類に基づいて治療方針を決定しているが、高リスク群では化学療法、放射線療法、手術療法、大量化学療法を伴う造血幹細胞移植を併用した集学的治療が行われているにも関わらず、未だに予後不良症例も多い。低リスク・中間リスク群の症例でも予後不良な経過をたどるものもあることから、新規治療標的の発見と治療法の開発が予後改善のために重要である。

近年、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構のひとつである DNA メチル化の異常が、様々な腫瘍においてその発生・進展に関与することが報告されている。これまで著者の所属する研究グループでは、マウス精巣特異的 DNA メチル化変化領域や、皮膚腫瘍モデルマウスにおける腫瘍特異的 DNA メチル化変化領域を網羅的に解析し、そのヒト相同領域についてヒト神経芽腫臨床検体を用いて検討することにより、新規予後規定因子となる遺伝子を発見し報告してきた。これらの遺伝子のうち、*Zygote Arrest 1 (ZAR1)* の DNA メチル化レベルは、本症のみならず、悪性黒色腫や肝細胞癌、脳腫瘍、膀胱癌においても予後と相関することが報告されている。このことは、*ZAR1* がこれらの癌腫の発生・進展において何らかの重要な役割を担っている可能性が高いと考えられる。

ZAR1 は、卵母細胞に特異的に発現し胚形成の開始に関与しているとされるが、腫瘍における役割はほとんど解明されていない。著者の所属する研究グループ

では、*ZAR1* exon1 上に位置する CG rich な配列である CpG island における DNA メチル化状態について、ヒト神経芽腫臨床検体と正常副腎髄質組織を比較することで、臨床的予後および *MYCN* 増幅をはじめとする既存の予後規定因子との関連を解析した。その結果、*ZAR1* exon1 上 CpG island の高メチル化状態が有意に予後不良と関連し、既存の予後規定因子の予後不良例でも高メチル化状態であることを発見した。また、public database では *ZAR1* の高発現が予後不良と関連することが報告されている。

本来胎生初期の細胞にのみ発現する遺伝子である *ZAR1* が、胎児性腫瘍とされる本症において予後不良群で高発現するという結果は、*ZAR1* が本症の発生・増殖や分化に関与している可能性を強く示唆している。本研究では、ヒト神経芽腫細胞株を用いて *ZAR1* の本症における役割を解析した。

目的

本症の予後と関連する *ZAR1* について、ヒト神経芽腫細胞株を用いてその機能を実験的に検証することで、本症における *ZAR1* の役割を解明するとともに、新規治療標的分子としての可能性を検討する。

対象と方法

MYCN 増幅ヒト神経芽腫細胞株 NB1 を用いて *ZAR1* の発現を強制的に抑制または過剰発現させ、各細胞の機能解析を行った。*ZAR1* の発現抑制は siRNA を用いて行った。過剰発現は、発現ベクターを導入による *ZAR1* 強制安定発現株を作製して行った。機能解析は、細胞形態、細胞増殖能、細胞遊走能、細胞浸潤能の変化について検討した。*ZAR1* 強制安定発現株では足場非依存性増殖能の変化についても検討した。また、臨床検体を用いた解析において *ZAR1* の DNA メチル化レベルと *MCYN* 増幅の有無に相関が見られたことから、この 2 つの遺

伝子間には相互作用が存在する可能性が考えられる。そのため、*ZAR1* および *MYCN* それぞれの siRNA を用いて発現抑制した際の各遺伝子の発現変化を解析するとともに、*ZAR1* 強制定発現株でも *MYCN* の発現変化を mRNA レベルおよびタンパクレベルで解析した。

結果

各 control 群と比較して細胞増殖能については有意な変化がみられなかったが、神経突起伸長は *ZAR1* 発現抑制により促進 ($p < 0.001$) し、強制定発現により抑制 ($p < 0.001$) された。細胞浸潤能は *ZAR1* 発現抑制により低下 ($p = 0.008$) し、強制定発現により上昇 ($p = 0.04$) した。細胞遊走能は *ZAR1* 発現抑制では有意差を認めなかったが低下する傾向 ($p = 0.16$) にあり、強制定発現により上昇 ($p = 0.04$) した。足場非依存性細胞増殖能は、*ZAR1* 強制定発現により低下 ($p = 0.047$) した。

ZAR1 と *MYCN* の相互作用を検討するために siRNA を用いて *ZAR1* の発現抑制を行ったところ、*MYCN* の発現低下がみられ、*ZAR1* 強制定発現により *MYCN* の発現上昇を認めた。また、*MYCN* に対して siRNA を用いて発現抑制を行った際には、*ZAR1* の発現が上昇した。

考察

神経突起の伸長は神経系細胞においては分化誘導を行った際に生じる現象であり、細胞が分化していることを意味している。*ZAR1* の発現抑制により神経突起伸長が促進され、強制定発現状態で抑制されたことから、*ZAR1* はヒト神経芽腫においては分化抑制に関わっている可能性が考えられた。また、細胞浸潤は悪性腫瘍の進展に深く関わるが、*ZAR1* の発現抑制により抑制され、強制定発現状態では亢進した。以上より、*ZAR1* はヒト神経芽腫において浸潤能を高めている可

能性が考えられた。しかしその一方で、*ZAR1* 強制発現実験において足場非依存性増殖能が抑制された。このことから、*ZAR1* には腫瘍抑制的に機能する側面もある可能性が考えられた。

また、*ZAR1* と *MYCN* それぞれの発現を抑制・強制発現させた際の発現変化から、*ZAR1* が *MYCN* の発現を増加させることが示され、*MYCN* の発現抑制により *ZAR1* の発現を増加させることが示された。*MYCN* は細胞増殖、アポトーシス抑制、分化抑制、浸潤・遊走・転移促進など多様な役割を果たす転写因子である。*MYCN* のコピー数が増幅し過剰な転写産物が発現した結果、本症の悪性化に深く寄与している。*MYCN* 下流の遺伝子制御においては、Focal Adhesion Kinase のリン酸化や、活性化された miR-9 による E-cadherin の発現抑制を介することで、本症の浸潤・遊走が促進されている。また、神経突起の伸長にはタンパク質架橋化酵素である Transglutaminase 2 が関与している。本症においては分化マーカーとしても有用であり、この機構において *MYCN* は *TGM2* の発現を抑制することで分化抑制的に機能している。*ZAR1* の発現制御をした際の表現型と *MYCN* の発現変化から、*ZAR1* を制御した際の表現型は *MYCN* の発現制御を介したメカニズムにより生じている可能性も考えられた。詳細な機構を解明するには今後の解析が必要である。

結語

ZAR1 はヒト神経芽腫細胞株 NB1 において、足場非依存性細胞増殖能を抑制する腫瘍抑制的な作用をもつ可能性がある一方、細胞の未分化性維持や細胞浸潤能を高めるなど、腫瘍促進的な機能も持つことが *in vitro* で確認できた。また、その機構は *MYCN* の発現制御を介して生じている可能性が考えられた。