

(平成 23 年度研究報告書)

23-B-18 がん促進転写因子の標的遺伝子の同定による
高リスク群神経芽腫細胞で機能する分子経路の解明と創薬標的分子の探索

独立行政法人国立がん研究センター研究所・遺伝医学研究分野 佐伯 宣久

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

神経芽腫は白血病、脳腫瘍について頻度の高い小児がんである。本研究者らが参加した最新の全ゲノムのアプローチにより、転写因子 LMO1 (Lim domain only 1) が神経芽腫、その中の特に高リスク群と関連していることが示され、さらに、神経芽腫の発生において LMO1 ががん遺伝子として機能していることが明らかとなった (Wang, Saeki, Sasaki, et al. *Nature* 2011)。

本研究は、LMO1 が神経芽腫細胞内で発現を制御している標的遺伝子を同定することにより、神経芽腫において機能する重要な分子経路を解明し、新たな治療法の開発の可能性を探ろうとするものである。

本研究により創薬の基盤となる知見が得られ、これが臨床応用に結びついた場合、現在治療法のない高リスク群の再発症例に対して有効な治療法が確立される可能性が出てくることから、その意義は大きいと考えている。

研究経費

5,000 千円

研究班の組織

佐伯 宣久
(主任研究者)

主任研究員

- ・クロマチン免疫沈降-DNAシーケンス解析及びがん促進転写因の標的遺伝子の同定
- ・分子経路解析

佐々木 博己
(分担研究者)

ユニット長

- ・分子経路解析 (補助)
- ・分子経路阻害実験
- ・臨床検体での発現解析

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標) :

クロマチン免疫沈降(ChIP)ーシーケンス解析を神経芽腫培養細胞株について実行し、神経芽腫培養細胞株において転写因子 LMO1 の制御化にある標的遺伝子を網羅的に同定し、これを手掛かりに神経芽腫細胞で機能している、がんの発生・進展に重要な分子経路を同定する。分子経路阻害実験を行い、治療創薬の基盤を構築する。

第1年次

(到達目標)

- 1 ChIP-シーケンス解析により神経芽腫培養細胞株において転写因子 LM01 が制御する標的遺伝子（候補）を網羅的に同定する。

(年次評価時点の実績要点)

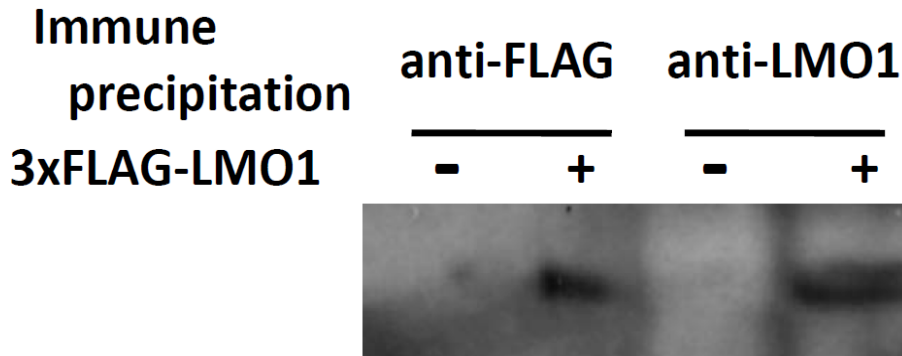
- 1 市販されている抗体の中から ChIP に使用可能な抗 LM01 抗体の選定を行った。ChIP-シーケンス解析を予定している 3 種の神経芽腫培養細胞株のうち、一つの培養細胞株について ChIP を実施した（現在業者に委託してシーケンスを行っている）。

研究成果と考察

第1年次評価時点

市販されている 8 種の抗 LM01 抗体のうち、1 種のみが免疫沈降に使用可能であることを確認した（図 1）。

取り寄せた 3 種の神経芽腫培養細胞株、SK-N-BE(2)、SK-N-SH 及び LA-N-5 について、数種類の細胞導入用試薬を用いて 3xFLAG-LM01 融合タンパク発現ベクターの導入効率をチェックし、最も導入効率がよかった SK-N-BE(2) について 3xFLAG-LM01 融合タンパク発現ベクター導入後に免疫沈降を行い DNA を精製した。現在高速シーケンスを行っているが、その解析結果から、抗 LM01 抗体と抗 FLAG 抗体のうちどちらが ChIP-シーケンス解析に適しているか比較検討を行い、適した抗体を用いてさらに SK-N-SH 及び LA-N-5 の ChIP-シーケンス解析を行う予定である。



Immunoblot with anti-FLAG antibody

図 1 抗 LM01 抗体による 3xFLAG-LM01 融合タンパクの免疫沈降

3xFLAG-LM01 融合タンパク発現ベクターを導入した胃がん培養細胞株 HSC-59 (+) としていない HSC-59 (-) の細胞溶解液について、抗 FLAG 抗体 (anti-FLAG) 及び抗 LM01 抗体 (anti-LM01) で免疫沈降を行い、ウェスタンブロットにて融合タンパクを検出した。どちらの抗体でも融合タンパクの免疫沈降が可能であることがわかった。

倫理面への配慮

1. 本研究は、基本的には一般的な生化学及び分子生物学的な研究であり、がん研究センター内では既報の培養細胞株以外のヒト由来の試料は使用しないため個人情報や人権に関する事項には該当しない。また、他施設との共同研究を行って臨床検体についてがん研究センター内で解析する場合は、先方で匿名化するなど、個人情報の取り扱いに注意する。
2. 本研究の遂行に必要な組み換え DNA 実験については“国立がん研究センター遺伝子組み換え実験安全委員会”の承認を得る。動物実験についても“国立がん研究センター動物実験倫理委員会”の承認を得て行う。
3. 本研究は関連法令や指針、国立がん研究センターの内部基準を遵守して行う。