

(平成 24 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

佐伯 宣久
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

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 LM01 (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 LM01 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、LM01 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。

平成 24 年度研究経費

3,361 千円

研究班の組織

佐伯 宣久	遺伝医学研究分野	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子の標的遺伝子の同定 ・分子経路解析
佐々木 博己	遺伝医学研究分野	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 LM01 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 2 年次 (到達目標)

- 1 第 1 年次に解析を行った 1 種の培養細胞株に加えて、さらに 2 種の神経芽腫培養細胞株について ChIPーシーケ

エンス解析を行い、計3種に共通する標的遺伝子を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）とする。

- 2 上記で得られた遺伝子（候補）について培養細胞を用いた系で確認を行い、標的遺伝子を同定する。
- 3 上記で得られた標的遺伝子を手掛かりにして神経芽腫培養細胞株で腫瘍促進的に機能している分子経路を推定し、培養細胞を用いた系でこれを確認する。
- 4 上記で得られた標的遺伝子あるいは腫瘍促進分子経路の主な分子の発現を臨床検体で確認する。

(年次評価時点の実績要点)

- 1 第1年次に解析を行った1種の培養細胞株（SK-N-BE(2)）に加えて、2種の神経芽腫培養細胞株（SK-N-SH及びLA-N-5）についてChIP-シーケンス解析を行い、計3種に共通して標的遺伝子候補として同定された遺伝子をリストアップし、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）として 10 遺伝子を同定した。
- 2 SK-N-BE(2)細胞においてshRNAを用いてLM01の発現を抑制し、これに伴う10の標的遺伝子（候補）の発現量の変化を調べ、4 遺伝子について発現量の明らかな低下が認められたことからこれらを LM01 の標的遺伝子とした。また、残り6遺伝子のうち4遺伝子の発現量についてもLM01の発現抑制による影響が否定できないことから、これら4遺伝子も今後の分子経路解析の対象とすることとした。
- 3 標的遺伝子を手掛かりにした神経芽腫培養細胞株で腫瘍促進的に機能している 分子経路の推定と確認のための実験については現在遂行中である。
- 4 標的遺伝子あるいは腫瘍促進分子経路の主な分子の発現を臨床検体で確認する作業は24年度終盤から25年度前半で行う予定である。

研究成果と考察

第2年次評価時点

2. LM01 標的遺伝子の網羅的同定のためのChIP-シーケンス解析

1) ChIP-シーケンス解析データのゲノムアラインメント

得られたシーケンスデータを2種のゲノムアラインメント用プログラムを用いて解析したところ、それぞれの細胞株のChIP DNA サンプルとコントロールサンプルについて98%前後の良好なアラインメント率が得られた(表1)。

表1 ChIP-シーケンスのゲノムアラインメントの結果

	SK-N-BE(2)		SK-N-SH		LA-N-5	
	ChIP DNA	Reference DNA	ChIP DNA	Reference DNA	ChIP DNA	Reference DNA
Sequenced reads	57319220	55027742	60831674	52122693	51998018	55827557
BWA-aligned reads	55747461	53555332	58867343	50890559	49645616	54622989
Novoalign-aligned reads	353231	361142	579649	351511	909976	382795
Total aligned reads	56100692	53916474	59446992	51242070	50555592	55005784
(%)	97.87	97.98	97.72	98.31	97.23	98.53
Unaligned reads	1218528	1111268	1384682	880623	1442426	821773

2) リード集積ピークの同定と標的遺伝子候補のリスト化

ゲノム上にアラインメントされたリードについて9種のリード集積ピーク同定プログラムで解析したところ、同定されたピーク（ゲノム上のLM01結合部位の候補）の数は表2のようになった。今回の解析では3種以上のソフトで同定されたピークを有効ピーク（真のLM01結合部位を反映するピーク）と定義し、この有効ピークのうち近傍（遺伝子上流及び下流5kb）に遺伝子が存在するものをリストアップしたところ11の有効ピークと近傍の10のLM01標的遺伝子候補が得られた（表3。未発表のデータのため遺伝子名は伏せ、以後Gene A- Gene Jと記載）。

表2 リード集積ピーク同定ソフトで同定されたピーク数

	CisGenome	MACS v1	MACS v2	SiSSrs	QuEST-TF	QuEST-PolII	QuEST-His	spp-WTDS	spp-MTCS
SK-N-BE(2)	1628	715	34	5	178	37	7	114	99
SK-N-SH	73818	10042	4203	4083	4014	913	285	981	999
LA-N-5	33323	2569	855	1727	1587	377	103	389	366

表3 近傍に遺伝子を含む有効ピークとその遺伝子の機能

Peak	Chromosome	Gene	Gene's function
1	2	Gene A	Microtubule-related function
2	2	Gene A	
3	2	Gene B	LIM domain-containing adaptor protein (Integrin-growth factor signalling)
4	5	Gene C	Ras-related function
5	5	Gene D	Metalloproteinase
6	6	Gene E	RNA-binding protein
7	7	Gene F	Cell adhesion
8	8	Gene G	Function unknown
9	9	Gene H	Extracellular matrix protein
10	10	Gene I	Transporter (related to multi-drug resistance)
11	X	Gene J	Zinc finger protein

今回の解析においては各リード集積ピーク同定プログラムのピーク判定条件を最も厳しいものに設定しており、また、3種のプログラムで同定されたものをピークと定義し、加えて、3種の神経芽腫培養細胞株で共通に同定されたピークを解析するという、厳しい基準で LM01 標的遺伝子候補をリストアップしている。神経芽腫は heterogeneity の強い腫瘍であると考えられていることから、1種の神経芽腫培養細胞株のみを解析してこの細胞における LM01 標的遺伝子候補をリストアップすることも合理性のある解析と考えられる。また、1種のプログラムで同定されたものをピークと定義して解析したり、個々のリード集積ピーク同定プログラムのピーク判定条件を緩めるなど、様々な data mining が可能であることから、今回得られた ChIP-シーケンズデータについて今後もいろいろな解析を試みて、標的遺伝子候補のリスト化について検討したいと考えている。

3. 培養細胞の発現解析による LM01 標的遺伝子の確定

4種の LM01 発現抑制用 shRNA 発現ベクターを作成して SK-N-BE(2)細胞に導入し、LM01 発現抑制効果の強かった3種を選択した。この中で発現抑制効果の最も低かった shRNA 発現ベクター (shLM01(3)) を SK-N-BE(2)細胞に導入して LM01 の発現を抑制し、この条件下で細胞増殖アッセイを行ったところ、コントロールベクターを導入した場合と比べて有意に増殖速度の減少が見られた (図2)。これにより、すでに報告のある SK-N-SH 及び LA-N-5 (Wang, Saeki, Sasaki, et al. *Nature* 2011) に加えて SK-N-BE(2)細胞においても LM01 は細胞増殖促進的に機能していることが示され、LM01 標的遺伝子も機能していることが示唆された。

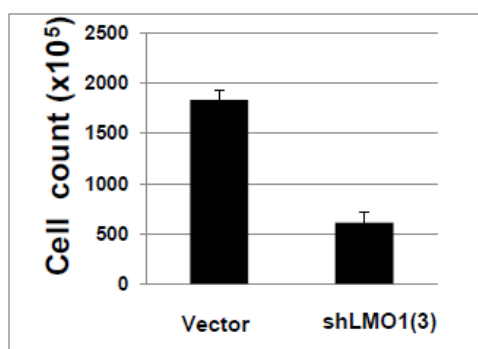


図2 LMO1 の発現を抑制しての細胞増殖アッセイ

LMO1 発現抑制用 shRNA を発現するベクター (shLMO1(3)) あるいは元の発現ベクター (vector) を SK-N-BE(2) 細胞に導入してのち培養を継続し、細胞数を計測したところ、shLMO1(3) を導入した細胞で細胞増殖速度の低下が見られた。

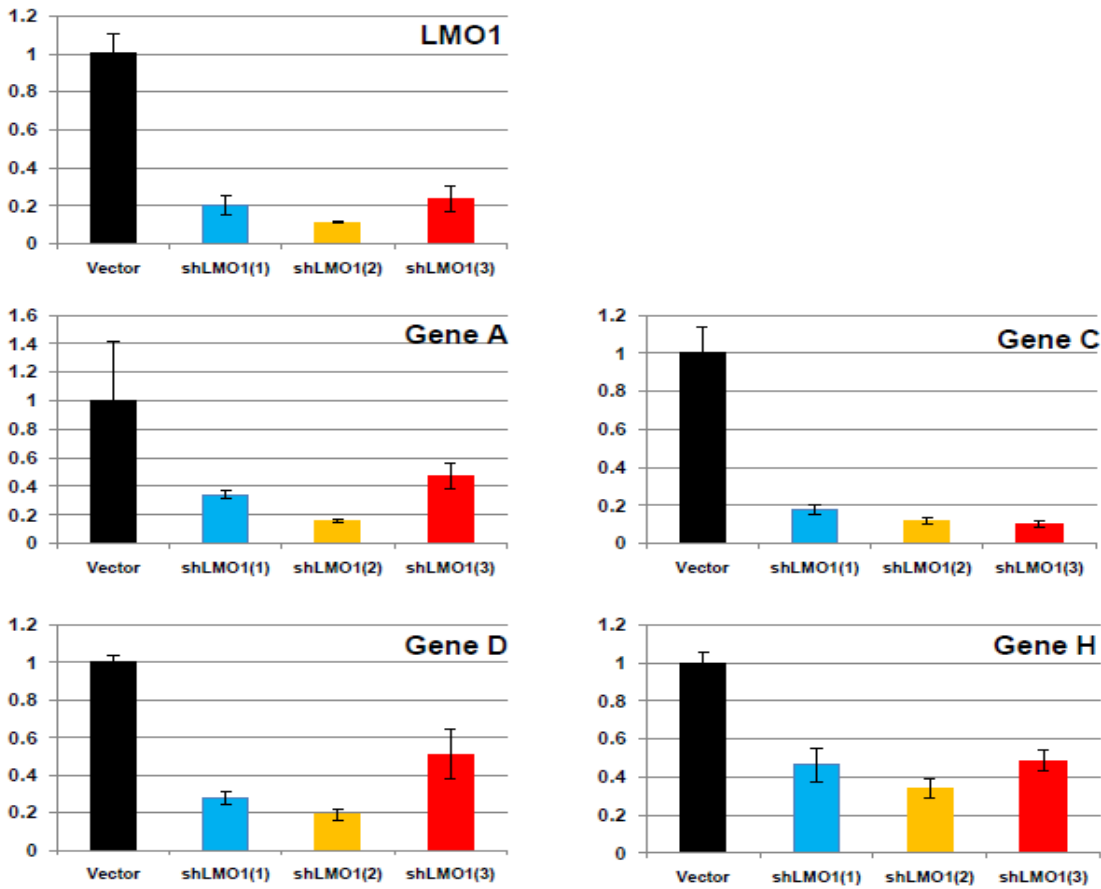


図3 SK-N-BE(2) 細胞において LMO1 の発現抑制により 4 つの LMO1 標的遺伝子候補の発現量が低下した (定量 PCR)

さらに、同様の条件下で培養した SK-N-BE(2) 細胞より RNA を抽出して 10 の LMO1 標的遺伝子候補について定量 PCR を行ったところ、4 つの標的遺伝子候補で発現の低下 (Gene A、Gene C、Gene D、Gene H) が見られたことから、これら 4 つの標的遺伝子候補を SK-N-BE(2) 細胞での LMO1 標的遺伝子とした (図 3)。これらの遺伝子については Gene A は神経芽腫での発現の報告があるものの、他のものについては神経芽腫との関連について報告がなく、加えて、これら 4 つの遺伝子すべてについて腫瘍増殖との関連の報告がないことから、今後分子経路の解析及び治療標的分子の探索を進める上で、ChIP-シーケンスを用いた LMO1 標的遺伝子の網羅的同定によってしか得られない有用な情報が得られたものと考えられる。SK-N-SH 及び LA-N-5 においても LMO1 標的遺伝子は共通するものと予測されるが、これについては同様の方法で現在確認作業を行っている。

また、残り 6 つの LMO1 標的遺伝子候補のうち 4 つ (Gene B、Gene F、Gene G、Gene J) については、3 つの shLMO1 発現ベクターを導入したうち 2 つについて発現低下が見られたことから (図 4)、LMO1 標的遺伝子と確定されないながらもその可能性が否定できないと判断した。これらについても今後の分子経路の解析の対象とし、その結果も合わせて検討して、LMO1 標的遺伝子であるかどうか判定することとした。

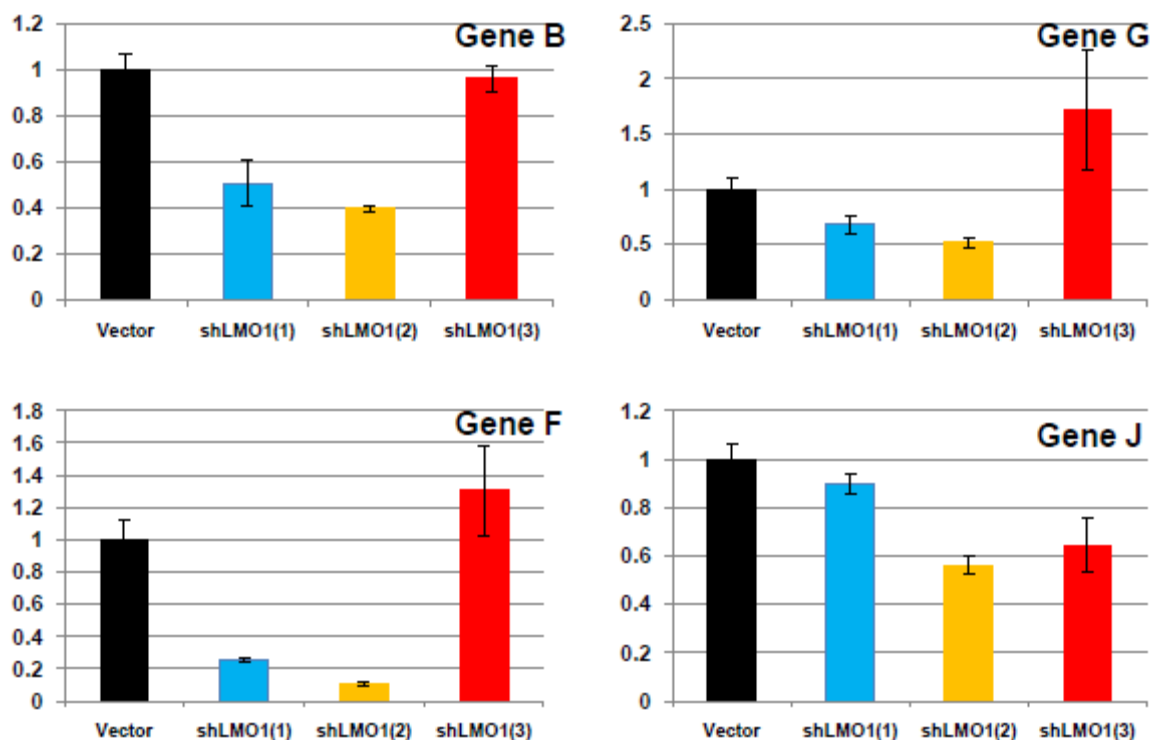


図4 SK-N-BE(2)細胞においてLMO1の発現抑制により4つのLMO1標的遺伝子候補の発現量低下について効果(細胞に3つのshLMO1発現ベクターをそれぞれ導入したうち2つについてLMO1標的遺伝子候補の発現低下が見られた)が見られた。(定量PCR)

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”の承認を得ている。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。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

(学会発表)

(書籍)

(知的財産権)

(政策提言 (寄与した指針等))

(その他)

Saeki N, Sasaki H. LMO1 (LIM domain only 1 (rhombotin 1)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, August

2011. URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/LMO1ID33ch11p15.html>