

(総合研究報告書)

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 主任研究員

研究の分類・属性

発がん・がん生物学

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。

研究経費

年 度	研究経費
平成 23 年度	5,000 千円
平成 24 年度	3,361 千円
平成 25 年度	3,361 千円
総 計	11,722 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 シークエンス解析 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 (分担研究者)	バイオマーカー探索支援部門長	・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)ーシークエ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。

(研究終了時点の実績要点)

1. 神経芽腫培養細胞株において共通して転写因子 LM01 の制御下にある標的遺伝子を 8 個同定し、これらの遺伝子が機能するがん促進分子経路を明らかにした。先行研究で報告された LM01 のがん遺伝子として機能が、分子細胞生物学的に再確認された。
2. 上記の神経芽腫で機能するがん促進分子経路を阻害し細胞増殖を抑制する分子阻害剤 3 種を同定し、特許出願を行った。これらの分子阻害剤が神経芽腫の新規治療薬になりうることを提言した。また、LM01 の制御下にあるがん促進分子経路をさらに明らかにすることにより、新規の治療標的分子がさらに同定される可能性を示した。

研究方法

ChIPーシークエンス解析による転写因子 LM01 が制御する標的遺伝子の網羅的同定

3xFLAG-LM01 融合タンパク発現ベクターを作成し、胃がん由来培養細胞株（先行研究により導入効率がよいことがわかっている）に導入して発現させ、この細胞の溶解液に対して複数のメーカーから販売されている 8 種の抗 LM01 抗体及び抗 FLAG 抗体 (positive control) を用いて免疫沈降 (ChIP) を行った。ウェスタンブロット解析により免疫沈降に使用可能な抗 LM01 抗体を選定した。

神経芽腫培養細胞株 SK-N-BE (2) に 3xFLAG-LM01 融合タンパク発現ベクターを導入し、formaldehyde によるタンパク架橋処理を行ったのち、核内タンパク・クロマチンを回収し、酵素法による断片化を行った。これに対して抗 LM01 抗体及び抗 FLAG 抗体のそれぞれと Protein G agarose を用いて免疫沈降を行い、得られたクロマチンから DNA を精製した。1) ChIP 前 DNA サンプル、2) 抗 LM01 抗体 ChIP サンプル、3) 抗 FLAG 抗体 ChIP サンプルについてイルミナ社 HiSeq 2000 による高速シークエンスを行った。これにより得られたデータの解析結果から用いた抗 LM01 抗体が有効であることが判明したので、残り 2 種の神経芽腫培養細胞株 (SK-N-SH 及び LA-N-5) については 3xFLAG-LM01 融合タンパク発現ベクターの導入なしで抗 LM01 抗体による免疫沈降のみを行った。

3 種の神経芽腫培養細胞株についてのシークエンスデータはまず BWA 及び Novoalign の 2 つのプログラムを用いてゲノムアラインメントを行い、ついで 9 種の ChIPーシークエンスデータ解析用リード集積ピーク同定プログラム (CisGenome, MACS ver1, MACS ver2, SiSSrs, QuEST-TF, QuEST-PolIII, QuEST-His, spp-WTDS, spp-MTCS) を用いて解析し、ゲノム上の LM01 転写因子タンパク結合部位及びその周辺の遺伝子の同定を行った。

shRNA を用いた培養細胞での LM01 の発現抑制と標的遺伝子 (候補) の発現解析

LM01 の発現を抑制するための shRNA (shLM01) を 4 種デザインし、shRNA 発現用ベクター (G418 で選択可能) に挿入し、細胞導入試薬を用いてこれを神経芽腫培養細胞株 SK-N-BE (2) に導入後に RNA を抽出し、定量 PCR (TaqMan Gene Expression Assay) により LM01 の発現量を解析した。この中で最も LM01 発現抑制効果の高かった 3 つの shLM01 発現ベクター (shLM01 (1)-(3)) をそれぞれ SK-N-BE (2) に導入し、9 日間 G418 選択培養後 RNA を抽出し 8 の標的遺伝子候補について定量 PCR を行った。

shRNA を用いた培養細胞での LM01 標的遺伝子の発現抑制と細胞増殖の解析

LM01 標的遺伝子発現抑制用の shRNA 発現ベクターを培養細胞に導入後、定量 PCR (TaqMan Gene Expression Assay) により標的遺伝子の発現量を解析した。培養細胞を 96 ウェルプレートの 5 ウェル (1000 細胞/ウェル) にまき、72 時間培養後、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 法にて細胞数を計測した。

分子阻害剤を用いた細胞増殖抑制実験

培養細胞を 96 ウェルプレートの 5 ウェル (2000 細胞/ウェル) にまき、LM01 標的遺伝子が関連する分子経路の構成分子に対する阻害剤を異なる濃度で培養液に加え、72 時間培養後、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

tetrazolium bromide)法にて細胞数を計測した。スフェア形成実験では、培養細胞を低接着性の96ウェルプレートの5ウェル(1000細胞/ウェル)にまき、阻害剤を加えた特殊培地(DMEMとHam's F12の1:1混合液にepidermal growth factor(20ng/ml)、basic fibroblast growth factor(20ng/ml)、B27 Supplementを添加)にて72時間培養し、各ウェルの50µm以上の大きさのスフェア数を計測した。

研究成果と考察

全期間(研究終了時)

神経芽腫培養細胞についてChIP-シーケンスによる転写因子LMO1が発現を制御する標的遺伝子のゲノム網羅的同定を行い、8つの遺伝子(Gene A-F, I, J)を同定した。これらの遺伝子がコードするタンパクが機能する分子経路を既報の情報などから推定したところ、細胞増殖、薬剤抵抗性、細胞移動に関連する機能が報告されている分子経路が含まれていることがわかった(図)。これらの分子経路に含まれる分子に対する阻害剤を用いた阻害実験により3種の分子阻害剤が、足場非依存的な培養条件で神経芽腫培養細胞の細胞増殖を抑制することが示され、これらの分子阻害剤が新規治療薬になりうることを示唆された。

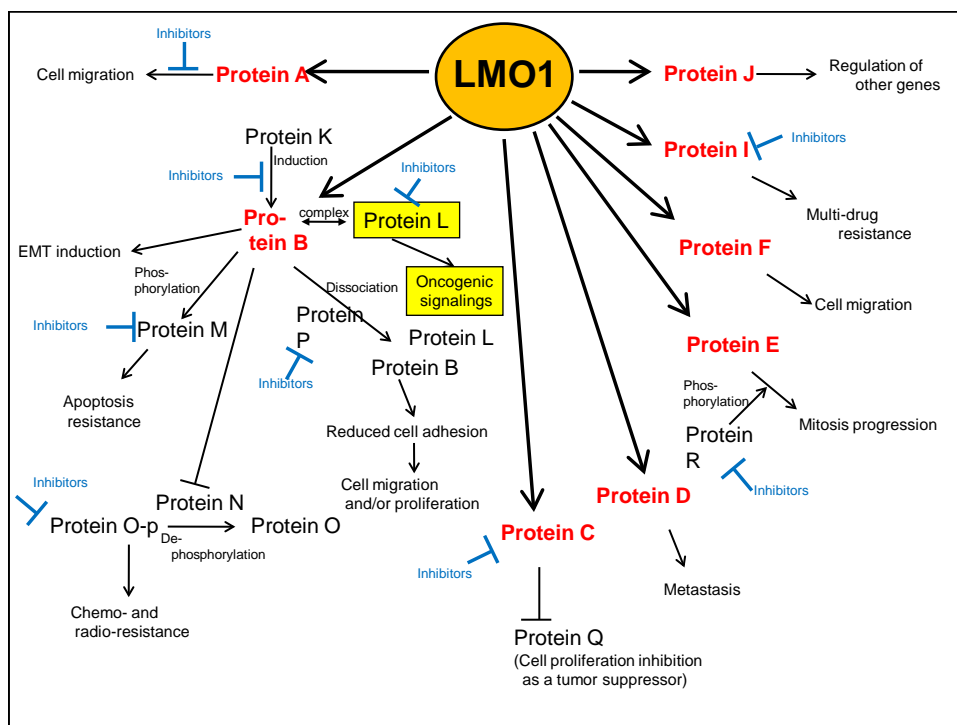


図 LMO1が発現を制御する標的遺伝子及びそれらの遺伝子に関わる分子経路と分子阻害剤

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)

投稿準備中

(学会発表)

(書籍)

(知的財産権)

25年度 特許出願

神経芽腫治療剤. 発明者 (国立がん研究センター: 佐伯宣久、佐々木博己)

出願番号 特願 2013-213663

(その他)

23年度

Saeki N, Sasaki H. LM01 (LIM domain only 1 (rhombotin 1)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, August 2011. URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/LM01ID33ch11p15.html>