主論文の要約

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

（胎生期における PRC2 を介した遺伝子発現変化が
MYCN による神経芽腫の発生と臨床結果を規定する）

名古屋大学大学院医学系研究科　総合医学専攻
生物化学講座　分子生物学分野
（指導：門松 健治　教授）
坪田 庄真

【緒言】

神経芽腫は小児腫瘍の一つであり、10 万人中 2.5 ~ 5 人が罹患する。副腎や交感神経節に発生するため、神経堤由来の交感神経副腎前駆細胞が神経芽腫の起源だと考えられている。患者の 90%が 10 歳未満で発症し、診断時の中央年齢は 18 ヶ月だが、発症年齢が高いほど予後は悪い。低・中リスク神経芽腫患者の予後は良いが、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%である。生存率だけでなく、患者の生活の質を向上させるためにも、分子標的薬を含む新規治療法開発が望まれている。

成人がんは、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ある。一方、神経芽腫は発生期に起きるため、がん化と正常発生の分化プログラムが密接に関連していると考えられている。近年、240 例の高リスク神経芽腫（診断時月齢 18 ヶ月以上のステージ 4）を対象にした大規模なゲノム解析研究が行われた。その結果、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た。染色体レベルでのゲノム異常は明らかになったが、発がんメカニズムを説明出来る遺伝子異常（点変異など）が少なく、未だに神経芽腫発生機構には謎が多い。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る。本研究では、神経芽腫モデルの TH-MYCN トランスジェニックマウスと新たに確立した培養方法を用いて、神経芽腫のがん化の初期を捉え、エピゲノム異常が発がんに関与していることを明らかにした。

【方法】

本研究で用いた TH-MYCN マウスは、交感神経副腎前駆細胞にがん遺伝子である MYCN を強制発現させることで神経芽腫を発症する（Figure 1A）。MYCN の発現によりがん化がスタートするが、その時期やがん化に関わる分子機構は明らかになっていなかった。また、最初のがん化は少数の細胞でしか起こらないと考えられるため、それらを対象にした網羅的な遺伝子発現解析などは技術的に難しいという問題点があった。この問題点を解消するために、腫瘍化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た（Figure 1B）。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取り組んだ。

【結果】

はじめに、がん化の時期を明らかにするため、in situ hybridization 法により MYCN mRNA の発現パターンを調べた。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加していた（Figure 2A）。次に、これらの時期の組織から細胞を取り出し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出来た（Figure 2B）。さら

に、皮下への同種移植実験によりこれら細胞の腫瘍形成能を確認した（Figure 2C）。一連の結果は少なくとも胎生期 13.5 日にはがん化がスタートしていることを示唆している。

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た。具体的には、胎生期 13.5 日の TH-MYCN マウス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た。Gene set enrichment analysis を行った結果、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った（Figure 3A）。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であるヒストン H3 のリジン 27 番目をトリメチル化修飾（H3K27me3）することで、そのターゲット遺伝子群の発現を抑制する。実際、多数の PRC2 ターゲット遺伝子の発現が顕著に低下していた（Figure 3B）。またターゲット遺伝子群のゲノム領域の H3K27me3 修飾が増加していることを ChIP シーケンス法により明らかにした（Figure 3C）。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、その発現を抑えていることを示している。

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る。次に、Ezh2 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介入実験を行った。Ezh2 に対する shRNA や阻害剤（EPZ-6438）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た（Figure 4A、4B）。更に、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を確認した（Figure 4C）。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た（Figure 4D）。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唆している。

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た。興味深いことに、PRC2 ターゲット遺伝子群の発現が、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（Figure 5A）、予後不良とも逆相関していた（Figure 5B）。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った。

【結論】

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った。PRC2 による遺伝子発現制御を左右する分子とその詳細な機構については今後の課題である。一方、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利用した分子標的薬の開発を期待させる。