

主論文の要旨

The nucleolar protein PES1 is a marker of neuroblastoma outcome and is associated with neuroblastoma differentiation

〔 核小体タンパクである PES1 は神経芽腫の予後マーカーであり、
神経芽腫の分化と関連している 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
高次医用科学講座 臓器病態診断学分野

(指導：中村 栄男 教授)

中黒 匡人

[緒言]

神経芽腫は交感神経系の前駆細胞由来の悪性腫瘍で、小児の固形悪性腫瘍の中で最も頻度が高い。他の悪性腫瘍とは異なり、一部の神経芽腫の症例は自然退縮する事が知られている。この自然退縮は分化とアポトーシスによって引き起こされることから、13-cis-レチノイン酸を用いた分化の誘導は神経芽腫の有効な治療のひとつとなっている。MYCN はもっともよく知られた神経芽腫の発癌遺伝子であり、神経芽腫の症例の20-30%には MYCN の増幅がみられる。

PES1 は酵母からヒトに至るまで共通してみられる遺伝子である。PES1 に変異を持つゼブラフィッシュは脳容積の減少やその他の発達の障害がみられる。発達段階のマウスにおいては、germinal zoneを中心とした神経系の前駆細胞を多く持つ領域に PES1 の強い発現がみられる。神経の発生に関する役割に加えて、PES1 はリボソーム合成において重要な役割を果たす。PES1 はリボソーム合成を担う細胞内小器官である核小体に局在する。膠芽腫や乳癌、頭頸部の扁平上皮癌で PES1 の発現の増加が報告されており、リボソーム合成と腫瘍発生の密接な関連がその原因であると考えられている。

PES1 には神経発生と腫瘍発生との双方の役割があるが、神経芽腫における PES1 の役割は知られておらず、その探索が本研究の主題である。

[方法]

神経芽腫モデルマウスとして MYCN トランスジェニック (Tg) マウスを用いた。神経芽腫症例の遺伝子発現および予後解析には R2 ウェブサイト (<http://r2.amc.nl>) を用いて、AMC cohort study (GSE16476) の 88 症例を解析した。神経芽腫細胞株として NB39, TNB1, SH-EP を用いた。PES1 のノックダウンにはショートヘアピン RNA (shRNA) を用い、レンチウイルスを用いて細胞内に導入した。アポトーシスの測定には TUNEL 法を用いた。

[結果]

2 週齢の MYCN Tg マウスホモ接合型 (homo) では、上腸間膜神経節の腫大はないものの、組織学的に未分化な神経芽細胞の集簇がみられ、一種の前癌状態と考えられる。2 週齢のワイルドタイプ (wt) マウスに比べ、ホモ接合型の上腸間膜神経節は Pes1 の発現が増加し、6-14 週齢のホモ接合型あるいはヘミ接合型で形成される腫瘍ではさらに増加していた (Fig. 1)。

神経芽腫 88 症例の AMC cohort study (GSE16476) のデータを用いて PES1 の発現と臨床像との相関を調べた。PES1 の発現は MYCN の過剰発現を伴う症例で高く、転移を伴うステージ 4 でも有意に高かった。また PES1 高発現の症例は予後が不良であった (Fig. 2)。

神経芽腫細胞株で、PES1 を shRNA を用いてノックダウンしたところ、増殖が抑えられ、アポトーシスが誘導された。このノックダウンは同時に神経芽腫の分化関連の遺伝子マーカーの上昇をも引き起こした (Fig. 3)。

神経芽腫細胞株をレチノイン酸を用いて分化誘導したところ、神経突起の伸長と共に分化関連遺伝子の上昇がみられた。一方で PES1 の発現は抑えられた (Fig. 4)。

MYCN Tg マウス由来の初代培養スフェアを成長因子を用いて分化誘導したところ、細胞株と同様に神経突起の伸長が観察され、幹細胞マーカーの減弱と分化マーカーの上昇をみた。また細胞株の結果と同様に PES1 の発現低下も認められた (Fig. 5)。

神経芽腫細胞株を用いて、PES1 の局在を調べたところ、核小体の 3 層構造のうちの 2 層目の dense fibrillar component に存在する事がわかった。Camptothecin を用いて DNA ダメージを与えると、PES1 は核実質内のびまん性の局在になり、分布に大きな変化をもたらされた (Fig. 6)。

[考察]

本研究では神経芽腫の発生における PES1 の役割を臨床データベースやマウスモデル、細胞株を用いて探索した。PES1 はより悪性度の高い症例に多く発現すると過去に報告されてきたが、少数の症例あるいは細胞株を用いた研究に留まっていた。本研究では 88 症例のデータベースをもとに、予後と PES1 の発現に負の相関があることを明らかにした。

PES1 のノックダウンは分化マーカーの上昇を引き起こし、逆に分化の誘導は二つのモデルで PES1 の発現低下をもたらした。このことから PES1 が神経芽腫の分化を抑制する上で機能している事が示唆された。

PES1 と DNA ダメージとの関連についてはまだ明らかにされてきていない。過去に、PES1 は DNA ダメージから細胞を防御する方向に働き、PES1 ノックダウンは DNA ダメージを引き起こすと報告されている。本研究の結果も含めて考えると PES1 ノックダウンは DNA ダメージの蓄積を引き起こし、結果としてアポトーシスを誘導する可能性が考えられた。DNA ダメージ反応に関連のある遺伝子が多く持つ BRCT ドメインと呼ばれるリン酸化タンパク質結合ドメインを PES1 は 1 個持っている。我々の研究で、PES1 の BRCT ドメインを介した結合パートナーとして他の DNA ダメージに関連する蛋白が候補に挙がってきており、今後の研究が待たれる。

PES1 は多くの機能を持つ蛋白であるが、中でもリボソームの合成が最も知られている。リボソームは細胞の蛋白合成を司る細胞内小器官であり、その機能不全は細胞に重大な傷害をもたらす。本研究にみられた増殖抑制やアポトーシスはこのリボソームの機能不全によりもたらされた可能性がある。さらに上記に述べた DNA ダメージによる影響の可能性も考えられる。細胞分裂の停止は分化と密接に関連があることから、本研究に見られた分化も増殖抑制やアポトーシスと関連していると考えられる。

[結語]

本研究は PES1 が神経芽腫の予後マーカーである事、多機能な蛋白として神経芽腫細胞の生存と分化に関わる事、DNA ダメージがアポトーシスの制御にかかわる可能性がある事を示した。