

進行性神経芽腫における DNA メチル化酵素の役割の解明

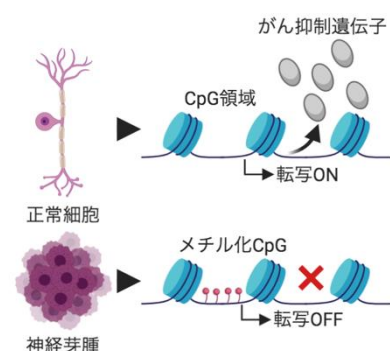
申請者 名古屋市立大学大学院
薬学研究科 助教 青木啓将

共同研究者 名古屋市立大学大学院
薬学研究科 教授 青山峰芳

1. 研究の背景・目的

神経芽腫は白血病、脳腫瘍、リンパ腫にならんで死亡率が高い小児がんであり、神経堤細胞を発生源として体幹の交感神経節や副腎髄質に形成される。一部の腫瘍で自然退縮が観察される一方で、約 6 割は予後不良な高リスク群が占めており、特に MYCN 遺伝子が増幅している症例は高リスク群に分類される。予後不良群に対しては未だ有効な治療法が確立されていないことから、有効性が高く副作用の少ない治療法を開発することが待ち望まれている。

近年、様々ながん種において遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドのメチル化ががんの発症や悪性化と密接に関わることが明らかとなってきた。がん細胞では増殖するために都合の悪い遺伝子、すなわちがん抑制遺伝子の発現が DNA のメチル化によって発現抑制されているケースが多い [1]。実際に神経芽腫においてもがん抑制遺伝子や神経分化関連遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドが高頻度でメチル化されていることが明らかとなっている(図 1) [2]。DNA のメチル化を担っている DNMT ファミリーには、DNA 複製時にメチル化状態を娘 DNA に引き継ぐ維持メチル化酵素:DNMT1、および新たに DNA メチル化状態を付与する新規メチル化酵素:DNMT3a・DNMT3b が存在する。これら DNMT ファ



ミリーの阻害剤である 5-アザシチジンは神経芽腫の臨床試験において一定の効果が認められている。しかし、依然として決定的な治療効果は得られておらず、投与量を増やすと副作用が強くなってしまふことが問題となっている [3]。我々は神経芽腫細胞の生存や増殖に関与する特定の DNMT だけを阻害することでこれらの問題点を解決できるのではないかと考察した。そこで本研究では、神経芽腫の悪性化に関わる DNMT を同定し、有効性が高く副作用の少ない新規治療法を提案することを目的とした。

2. 研究の対象ならびに方法

DNMT3B の選択的阻害剤である nanaomycin A を複数の神経芽腫細胞株に処理し、細胞生存率を WST-8 アッセイにより評価した。DNA の 5-メチルシトシン (5-mC) の割合は 5-mhMethylFlash Global DNA Methylation ELISA Easy Kit により測定した。アポトーシスの評価はウェスタンブロッティングにより行った。神経分化関連因子の遺伝子発現解析は RT-qPCR 法を用いて行った。

3. 研究結果

代表的な神経芽腫細胞株である IMR-32 に対し、siRNA により DNMT1、DNMT3A もしくは DNMT3B をノックダウンしたところ、DNMT3B のノックダウンが最も細胞生存率を低下させた。従って我々は DNMT ファミリーの中でも特に DNMT3B が神経芽腫の悪性化に関わるとの仮説を立て、実験を進めた。複数の神経芽腫細胞株に対して nanaomycin A 処理によって DNMT3B の機能を阻害した結果、複数の神経芽腫細胞株 (IMR-32, TGW, GOTO) において細胞生存率を低下させた。IC₅₀ は IMR-32 が 4.6 μ M、TGW が 2.4 μ M、GOTO が 2.6 μ M であった。次に nanaomycin A が IMR-32 の 5-mC の割合を減少させるかどうかを検討した結果、容量依存的に 5-mC が減少することが確認できた。さらに、5 μ M の nanaomycin A の処理によって cleaved caspase 3 および cleaved PARP が増加することが明らかとなった。また、神経細胞分化の関連因子の遺伝子発現量を解析した結果、nanaomycin A 処理によって IMR-32 における TUBB3 や MAP2 といった神経マーカーの発現が上昇した。一方で、神経芽腫の悪性化に寄与する TRKB や NEUROD1 の発現は nanaomycin A 処理によって低下した。

4. 考察

DNMT3B の選択的阻害剤である nanaomycin A は、ヒトのある種のがん細胞株に対して細胞死を誘導することが知られている [4]。本研究では、複数の神経芽腫細胞株における

nanaomycin A が抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。また、cleaved caspase 3 および cleaved PARP が nanaomycin A 処理によって増加したことから、DNMT3B の特異的な阻害は神経芽腫細胞株に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。以前、肺がん細胞株である A549 細胞において、nanaomycin A が癌抑制遺伝子 RASSF1A のプロモーター領域の脱メチル化を引き起こし、発現を誘導するとの報告がなされた [4]。神経芽腫細胞株においても同様の機構が働く可能性があるため、今後検討する必要がある。また、nanaomycin A 処理によって神経分化関連因子の遺伝子発現量の変動が見られたため、アポトーシスを誘導するだけでなく、神経細胞への分化を促進する可能性も示唆された。しかし、薬剤処理による細胞の形態的变化は認められなかったため、神経細胞分化に関してはさらなる検討を行う必要がある。

本研究により、DNMT3B が神経芽腫細胞の生存に関わること、DNMT3B が神経芽腫の治療標的となり得ることが示唆された。今後は RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析によって nanaomycin A の抗腫瘍効果の分子メカニズムの解明を試みる予定である。また、神経芽腫モデルマウスを用いて nanaomycin A の有効性や副作用を確認する予定である。

5. 文献

1. Kulis, M.; Esteller, M. DNA Methylation and Cancer. *Adv. Genet.* 2010, 70, 27–56.
2. Gómez, S.; Castellano, G.; Mayol, G.; Queiros, A.; Martín-Subero, J.I.; Lavarino, C. DNA Methylation Fingerprint of Neuroblastoma Reveals New Biological and Clinical Insights. *Genomics Data* 2015, 5, 360–363.
3. Jubierre, L.; Jiménez, C.; Rovira, E.; Soriano, A.; Sábado, C.; Gros, L.; Llord, A.; Hladun, R.; Roma, J.; Toledo, J.S. de; et al. Targeting of Epigenetic Regulators in Neuroblastoma. *Exp. Mol. Med.* 2018, 50, 51.
4. Kuck, D.; Caulfield, T.; Lyko, F.; Medina-Franco, J.L. Nanaomycin A Selectively Inhibits DNMT3B and Reactivates Silenced Tumor Suppressor Genes in Human Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* 2010, 9, 3015–3023.

6. 論文発表

Kazuya Izumi, Hiromasa Aoki et al. The DNMT3B inhibitor nanaomycin A as a neuroblastoma therapeutic agent. 論文投稿中