

氏 名	李 正皓
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 1081 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ポリコーン分子群の神経芽腫における機能解析
論文審査委員	委員長 連携教授 上條 岳彦 委員 教授 坂井 貴文 委員 准教授 坂田 一郎 委員 教授 田中 秀逸

論文の内容の要旨

神経芽腫（neuroblastoma, NB）は小児の固形悪性腫瘍の中で 2 番目に多い腫瘍である。主に副腎もしくは交感神経節から生じ、非常に複雑な病態を呈する。近年 NB 患者の全体的な予後は大きく改善されたが、高リスク NB は集学的治療にもかかわらず、長期生存は約 40% であり、依然として難治性の小児がんのひとつである。

現在、がんはジェネティックもしくはエピジェネティック異常によって発生するとされている。ジェネティック異常には、塩基配列の変化、欠失、増幅などが含まれる。これらのジェネティック異常は主に発がん性物質やウイルスによる誘導、あるいは親から受け継ぐものである。一方で、エピジェネティック異常は DNA 修飾、ヒストン修飾、miRNAなどを指す。これらの異常によって、発がん遺伝子の発現促進あるいはがん抑制遺伝子の調節に異常が生じて、発がんが促進される。

ポリコーン群は最初 *Drosophila* の *HOX* 遺伝子のエピジェネティックな転写抑制メカニズムとして発見され、高等生物においても発生や細胞分化に関わる遺伝子の制御に関与する分子である。ポリコーン群は PRC1 と PRC2 複合体の 2 つに分けられ、酵素活性としては、PRC2 は H3K27 のメチル化、PRC1 は H2AK119 のモノユビキチン化を触媒することで遺伝子の転写を抑制する、

EZH2 は EED と SUZ12 とともにポリコーン分子群複合体 PRC2 を構成し、ヒストン H3 の 27 番目リシン（H3K27）をトリメチル化する活性を持つ。これまで、前立腺がんや、乳がん、膀胱がん、胃がん、肺がんなどを含む複数のがん種では EZH2 の高発現が見られた。また、リンパ腫では EZH2 の機能獲得性変異が見られた。近年 EZH2 阻害剤が開発され、様々ながんに対する治療への応用が進められている。しかしながら、小児固形腫瘍のひとつである神経芽腫において、EZH2 の遺伝子変異は報告されていない。NB の EZH2 による悪性化に関わる機能についてはいくつか報告されているが、まだ不明な点が多い。本研究は EZH2 の NB の病態における役割について詳細な検証を行った。NB 患者における生存率の Kaplan-Meier 解析によって、EZH2 高発現は不良な予後と相関していることが示された。NB 形成における EZH2 の機能を調べるために、レンチウイルスシステムを用いて、NB 細胞で EZH2 の過剰発現もしくは発現抑制を行った。EZH2 の過剰発現によって、分化誘導剤である ATRA が誘導する NB 細胞の神経突起の伸長が抑えられ、細胞分化が抑制された。また、がん細胞の悪性度を示す軟寒天コロニー形成能および、ヌードマウスでの造腫瘍

能は EZH2 過剰発現によって促進された。一方で、EZH2 の発現抑制は有意に NB 細胞の神経突起の伸長を促進した同時に、神経分化マーカーである NF68 と GAP43 を発現誘導した。加えて、EZH2 阻害剤処理によって NB 細胞の神経突起の伸長が促進し、ATRA による分化誘導を強める効果を示した。そして、EZH2 を発現抑制した NB 細胞を用いたトランスクリプトーム解析から、細胞の分化を制御する NTRK1 が EZH2 KD によって上昇することが分かった。NTRK1 は TrkA と呼ばれ、予後良好な NB に高発現することが知られている。また、NTRK1 が NGF の受容体として働き、NGF と結合することで神経の分化を促進する。正常な NTRK1 は 3 種の転写バリエーションを持つ。その中、NTRK1 バリエーション 1 とバリエーション 2 は共通なプロモーターである P1 に制御される。クロマチン免疫沈降実験から EZH2 が NTRK1 バリエーション 1/2 の転写開始点上流の P1 プロモーターに直接結合し、ヒストン H3K27 のトリメチル化を介して NTRK1 バリエーション 1/2 の転写を抑制していることが明らかになった。このメカニズムは EZH2 による NB 細胞の分化抑制と NB の悪性化に関与すると考えられる。そして、良好な予後の NB では、主に NTRK1 バリエーション 1/2 が発現していることが分かった。一方、NTRK1 バリエーション 3 の発現は、良好な予後の NB でも顕著ではなく、そのプロモーター部分 (P2) の DNA メチル化によって抑制されることが証明された。

ポリコーム複合体 PRC1 はヒストン H2A の K119 のユビキチン化を介して遺伝子の転写を抑制し、BMI1 は PRC1 の重要なサブユニットである。BMI1 は造血幹細胞や神経幹細胞など組織幹細胞の維持に必要であることが分かっている。これまでの研究、がんにおいては、BMI1 高発現は非小細胞肺癌や大腸がん、そして神経芽腫などで見られている。そして、BMI1 は抗がん剤耐性の原因とされるがん幹細胞の維持や増殖に重要な役割を持つと考えられている。また BMI1 は NB のリスク因子である MYCN によって転写制御され、NB 細胞の分化を抑制して NB の悪性化に関わっている。最近、所属研究グループによって、BMI1 KD は数多くの NB 細胞株で高率にアポトーシスを引き起こすことが観察された。また、このアポトーシスは p53 および p73 の活性化に依存している。そして、二本鎖 DNA 切断マーカー γ -H2A.X は、アポトーシスが誘導される前に蓄積した。BMI1 KD によるアポトーシスは DNA 損傷によって引き起こされる可能性があるが、どのような遺伝子が関与したのかはまだ不明である。本研究は、BMI1 による NB 細胞のアポトーシス制御機構を解明するために、3 種の NB 細胞株を用いて BMI1 KD 実験を行った。BMI1 を KD した後、アポトーシスが発生した時に RNA を回収し、全ての遺伝子の変化を解析するマイクロアレイ実験を行った。その結果、アポトーシス関連遺伝子である SCN3B と CSRNP3 は全ての BMI1 KD NB 細胞株で発現が上昇することが分かった。以前の報告によると、SCN3B は p53 に関わるアポトーシスに伴って発現上昇し、SCN3B 過剰発現はアポトーシスを誘導する。本研究で、NB 細胞をドキシソルビシンで処理によって、アポトーシスが誘導され、SCN3B の発現の上昇が見られた。このことから、BMI1 KD による NB 細胞のアポトーシスは DNA 損傷によって引き起こされ、SCN3B、CSRNP3 などの分子によって制御されることが考えられる。

論文の審査結果の要旨

李 正皓氏（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成 30 年 1 月 24 日に理学部 4 番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って内容を審査した。以下に審査結果の概要を示す。

李は小児がんである神経芽腫におけるポリコム分子群の機能を本論文で解析した。ポリコム抑制複合体 2 (polycomb repressive complex2, PRC2) の構成タンパク質である EZH2 (enhancer of zeste homolog2) はヒストン H3K27 をメチル化し、細胞の運命決定、細胞周期、細胞死、細胞の分化、がん化などの重要な細胞内プロセスに関与することが近年明らかにされた。様々ながんにおいて EZH2 は高発現し、リンパ腫では EZH2 の機能獲得性変異が見られる。注目すべきことに、近年 EZH2 阻害剤が開発され、様々ながんに対する治療への応用が進められている。しかしながら、小児固形腫瘍のひとつである神経芽腫 (neuroblastoma, NB) において、EZH2 の遺伝子変異は報告されていない。NB の EZH2 による悪性化に関わる機能については若干の報告はされているが、まだ不明な点が多い。

第一章では NB 形成における EZH2 の機能解析を行った。

レンチウイルスシステムを用いて、NB 細胞で EZH2 の過剰発現もしくは発現抑制を行った。EZH2 の過剰発現によって、分化誘導剤である all-trans retinoic acid (ATRA) が誘導する NB 細胞の神経突起の伸長が抑えられ、軟寒天コロニー形成能とヌードマウスでの造腫瘍能が促進され、神経芽腫における EZH2 の Oncogenic な機能が確認された。一方で、shRNA による EZH2 の発現抑制は有意に NB 細胞の神経突起の伸長を促進し、神経分化マーカーである NF68 と GAP43 を発現誘導した。加えて、EZH2 阻害剤処理によって NB 細胞の神経突起の伸長が促進し、ATRA による分化誘導を強める効果を示した。また、NB 患者における生存率の Kaplan-Meier 解析によって、EZH2 高発現は不良な予後と相関していることが示された。そして、EZH2 を発現抑制した NB 細胞を用いたマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析から、細胞分化を制御する NTRK1 (neurotrophic receptor tyrosine kinase 1) が EZH2 ノックダウンによって、その転写が有意に増加することが判明した。NTRK1 は蛋白質レベルでも増加し、リガンドである NGF 投与で NB 細胞分化誘導をもたらす、その機能が確認された。さらに、クロマチン免疫沈降実験によって EZH2 が NTRK1 バリエント 1/2 の転写開始点上流の P1 プロモーターに直接結合し、ヒストン H3K27 のトリメチル化を介して NTRK1 バリエント 1/2 の転写を抑制していることが明らかになった。この研究は MYCN が増幅した悪性度の高い NB において、EZH2 が増加して NTRK1 の転写を抑制し、NB 細胞の分化抑制と NB の悪性化に関与することを初めて明らかにした重要な研究と考えられた。

第二章では、PRC1 の構成分子である BMI1 の研究を行った。

BMI1 はポリコム抑制複合体 1 (PRC1) の重要なサブユニットである。BMI1 は造血幹細胞や神経幹細胞など組織幹細胞の維持に必要であることが報告されている。がんにおいては、BMI1 は抗がん剤耐性の原因とされるがん幹細胞の維持や増殖に重要な役割を持つと考えられている。また BMI1 は MYCN によって転写制御され、NB 細胞の分化を抑制して腫瘍細胞の悪性化に関わっている。一方で、BMI1 のノックダウンは NB 細胞のアポトーシスを誘導する。そして、そのアポトーシス誘導において p53 または p73 の発現誘導および活性化が観察される。その分子的な機構を調べるため、BMI1 をノックダウンした NB 細胞を用いてマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、BMI1 ノックダウンによって SCN3B や CSRNP3 といったアポトーシス誘導時に発現するタンパク質が誘導されることを明らかにした。それらの遺伝子の高発現は NB の良好な予後と相関することから、BMI1 ノックダウンにおける p53/p73 依存的な

アポトーシスの誘導を制御する重要な役割を担っていると考えられる。

小児がんである神経芽腫においては、予後良好な腫瘍タイプでは腫瘍の“自然退縮”が認められる。この自然退縮においては NGF のレセプターである NTRK1 (TrkA) が関与していることも判明していたが、予後不良な NB である MYCN がん遺伝子増幅タイプの NB では自然退縮は認められず、NTRK1 の発現が認められないことも明らかにされていた。MYCN がん遺伝子増幅タイプの NB での NTRK1 の発現低下の分子機構は、これまで NTRK1 プロモーターメチル化によるものとされていたが、李の研究はこの機構がポリコム分子群特に EZH2 による NTRK1 プロモーター部分のヒストンコードの修飾 (H3K27 トリメチル化) が主体であることを明らかにした。この研究はこの分野のこれまでの知見に重要な進歩をもたらした。さらに EZH2 阻害剤の開発が進行していることを考慮すると、難治性小児固形腫瘍である MYCN 増幅神経芽腫に新たな分子標的療法の創出を可能とするものと考えられた。これらの成果から、本審査委員会は本学位論文を博士 (理学) の学位を授与するに値すると判断し、合格とした。