

厚生労働科学研究費委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

マウス神経芽腫がん幹細胞の新規培養法開発とエピゲノム解析に関する研究

研究分担者 門松 健治 名古屋大学大学院医学系研究科生化学教室 教授

研究要旨

胎児期 E13.5 交感神経節を対象に sphere 培養を確立した。この sphere は既に腫瘍形成能を獲得していた。そのゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームの網羅的な解析により、いくつかの特徴的变化が起きていることが判明した。

A．研究目的

マウス神経芽腫がん幹細胞の新規培養法開発とゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム解析をおこなう。“遺伝子変異を伴わないがん”の発がん分子機構の解明と治療のための分子標的同定の基盤を確立する。

B．研究方法

TH-MYCNマウスの胎児期E13.5交感神経節を対象にsphere培養を行う。交感神経節とsphereについて組織学的に同等であるかを解析する。これらsphereの分化能、自己増殖能、腫瘍形成能を比較する。また、E13.5 sphereについて、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームの解析を行う。特にエピゲノム変化が重要と予想されるので、これを中心にmRNA、miRNA、lncRNAとの関連を解析する。

（倫理面への配慮）

学内の遺伝子組み換え研究計画書及び実験動物計画書の承認を受け、研究倫理を順守して研究を行った。

C．研究結果

TH-MYCNマウスおよび胎児期（E13.5）の野生型マウスの腹腔交換神経節からのSphere培養を樹立した。まず、E13.5 TH-MYCNマウスのSphereは既に腫瘍形成能を獲得していることが判明した。そこで、野生型及びMYCN-TgマウスのSphereの差別化がどのようにして起こるのかを明確にするために、ゲノム網羅的メチル化解析をMDB-seq法を用いて行った。加えてmRNA、lncRNA、miRNAの発現解析をマイクロアレイを用いて、ゲノム解析をarray CGHを用いて行った。この結果、TH-MYCNマウスでは、ゲノムコピー数の異状はE13.5で起きていること、遺伝子発現の特徴としてMYCN下流遺伝子の発現誘導などが起きていること、DNAメチル化に差別化が起きていることなどが明らかになった。

E．結論

E13.5 sphereは既に腫瘍形成能を獲得していた。そのゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームの網羅的な解析により、いくつかの特徴的变化が起きている

ることが判明した。

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies. *Expert Opin Drug Discov.* 10(1):53-62, 2015.

Nakaguro M, Kiyonari S, Kishida S, Cao D, Murakami-Tonami Y, Ichikawa H, Takeuchi I, Nakamura S, Kadomatsu K. The nucleolar protein PES1 is a marker of neuroblastoma outcome and is associated with neuroblastoma differentiation. *Cancer Sci.* 2014.

Murakami-Tonami Y, Kishida S, Takeuchi I, Katou Y, Maris JM, Ichikawa H, Kondo Y, Sekido Y, Shirahige K, Murakami H, Kadomatsu K. Inactivation of SMC2 shows a synergistic lethal response in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Cell Cycle.* 13(7):1115-31, 2014.

Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, Kadomatsu K. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One.* 9(1):e86813, 2014.

Kishida S, Kadomatsu K. Involvement of midkine in neuroblastoma tumorigenesis. *Br J Pharmacol.* 171(4):896-904, 2014.

Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine: an emerging target of drug deve-

lopment for treatment of multiple diseases. *Br J Pharmacol.* 171(4):811-3, 2014.

Kadomatsu K, Bencsik P, Görbe A, Csonka C, Sakamoto K, Kishida S, Ferdinandy P. Therapeutic potential of midkine in cardiovascular disease. *Br J Pharmacol.* 171(4):936-44, 2014.

### 2. 学会発表

Kishida S, Kadomatsu K. The RNA aptamer Against Midkine Suppresses neuroblastoma Xenograft Growth by Attenuating Midkine-Notch2 Pathway (口頭), ANR2014

Tsubota S, Kishida S, Kadomatsu K. Elucidation of mechanisms underlying fate determination of neuroblastoma in MYCN-Tg mice. (ポスター), ANR2014

## H . 知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む。 )

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし