

## 【要約】

### **NLRR2 is transcriptionally regulated through JNK/c-Jun pathway and enhances cell survival in neuroblastoma**

(NLRR2 は JNK/c-Jun 経路により転写制御され、神経芽腫の細胞生存を高める)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：田川雅敏 教授)

Afzal Sheikh

## **NLRR2 is transcriptionally regulated through JNK/c-Jun pathway and enhances cell survival in neuroblastoma**

(NLRR2 は JNK/c-Jun 経路により転写制御され、神経芽腫の細胞生存を高める)

【背景】神経芽腫は頭蓋外に発生する小児の悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度の高い腫瘍である (1-2)。進行期の神経芽腫は予後が悪く集学的治療によっても難治性であり、その長期無病生存率は約 40%にとどまっている (3-6)。現在、治療に用いられている薬剤の多くは抵抗性獲得などの問題があり、神経芽腫の進展および薬剤抵抗性獲得に関わるメカニズムを理解することは、進行神経芽腫の治療成績を向上させる治療法の開発する上で重要であると考えられる。これまでに筆者らは、神経芽腫の進展に関わる因子の同定およびそれらの機能について分子生物学的に明らかにすることを目的に研究を行ってきた。神経芽腫の新たな標的分子を探索するために、異なる臨床像を示す神経芽腫組織から cDNA ライブラリーを作製し、ランダムに採取した 5,300 遺伝子 (cDNAs) の中から、神経芽腫の予後と相関し、神経組織特異的に発現し、分化や細胞死の際に誘導される遺伝子を絞り込み、解析の対象としてきた (7)。その中で同定された NLRR (neuronal leucine-rich repeat protein) は 3つのファミリー遺伝子から成り、NLRR1 の発現は予後不良の神経芽腫において高く、一方で NLRR3 の発現は予後不良の神経芽腫において低いという、NLRR1 とは正反対のパターンを示す。この NLRR ファミリーの発現パターンに関しては、神経芽腫において重要な転写因子である N-myc が NLRR1 の発現を誘導し、NLRR3 の発現を抑制することが明らかとなっている (8, 9)。また、NLRR1

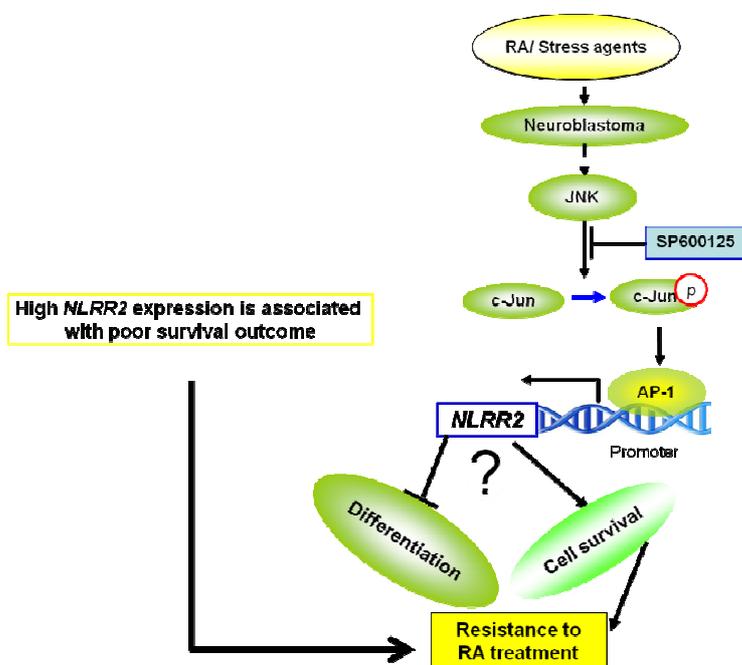
は細胞の増殖促進、NLRR3 は細胞分化の誘導という全く異なる機能に密接に関係していた。しかし、もう一つのファミリー遺伝子である NLRR2 の神経芽腫発生における機能および遺伝子発現制御機構については不明のままであった。

【目的】そこで本研究では、NLRR2 発現の臨床的意義について明らかにし、将来の新規治療法開発につなげるべく、神経芽腫細胞における NLRR2 分子の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】神経芽腫由来細胞株（SK-N-BE、TGW および SMS-SAN 細胞）における NLRR2 および c-Jun の発現量を RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法および Western blot 法により検討した。神経芽腫由来細胞の分化誘導実験においては、レチノイン酸（RA）を用いた。NLRR2 遺伝子のプロモーター解析にはルシフェラーゼアッセイおよびクロマチン免疫沈降法を行った。JNK 阻害剤は SP600125 を用いた。担がんマウスは神経芽腫細胞（SK-N-BE）を用いて作製し、アテロコラーゲンゲルを用いて siRNA の投与を行った。

【結果】神経芽腫 78 検体の cDNA における NLRR2 遺伝子発現をリアルタイム PCR 法において定量した結果、NLRR2 の高発現群において有意に予後不良であることが明らかとなった。神経芽腫由来細胞において NLRR2 を強制発現させた結果、細胞増殖が促進され、一方 siRNA により NLRR2 発現を抑制したところ細胞増殖が抑制された。in vivo の実験においても、担がんマウスの腫瘍部位周辺への siNLRR2 投与により腫瘍増生

が有意に抑制されたことから、NLRR2 は神経芽腫細胞の増殖・生存に関わることが示唆された。



興味深いことに、siRNAによりNLRR2発現を抑制した細胞において、RAに対する感受性が上がっており、細胞分化の誘導および増殖の抑制が認められた。このRA処理を行った細胞におけるNLRR2発現量をRT-PCRおよびWestern blot法により検討したところ、RA処理によるNLRR2発現の増加が観察された。このときに転写因子AP-1ファミリーの一つであるc-Junの発現も増加していたことから、JNK/c-Jun経路に注目してNLRR2遺伝子のプロモーター解析を行ったところ、AP-1結合領域を含むNLRR2遺伝子プロモーター領域が同定され、c-Junタンパク質の結合が確認された。一方で、JNK阻害剤によりNLRR2の発現が抑制されたことから、NLRR2遺伝子はJNK/c-Jun経路により正に転写発現制御されることが明らかとなった。

【考察】本研究により、NLRR2 の高発現が神経芽腫の予後と相関することが明らかとなった。NLRR2 の発現は RA などの薬剤処理による JNK/c-Jun 経路の活性化を介して誘導され、細胞生存に働くことにより治療抵抗性につながると考えられる。今後、NLRR2 が細胞生存に果たす機能の分子メカニズムを明らかとすることにより、神経芽腫に対する新規治療法開発につながることが期待される。

#### Reference:

1. Chang H.H., Lee H., Hu M.K., et al., Clin Cancer Res 16 (2010) 4411-20.
2. Nakagawara A., Arima-Nakagawara M. et al., Prog Clin Biol Res 385 (1994) 155-61
3. Maris J.M., N Engl J Med 362 (2010) 2202-2211.
4. Nakagawara A., M. Arima-Nakagawara M., et al., N Engl J Med 328 (1993) 847-54.
5. Nakagawara A., Azar C.G., Scavarda N.J., et al., Mol Cell Biol 14 (1994) 759-767
6. Brodeur G.M., Nakagawara A. Am J Pediatr Hematol Oncol, 14 (1992) 111-6.
7. Hamano S., Ohira M., Isogai E., et al., Int J Oncol 24 (2004) 1457-66.
8. Hossain M.S., Ozaki T., Wang H., et al., Oncogene 27 (2008) 6075-6082.
9. Akter J., Takatori A., Hossain M.S., et al., Clin Can Res 17 (2011) 6681-92.
10. Hossain M.S., Takatori A., Nakamura Y., et al., Cancer Res 72 (2012) 4587-96.