

【要約】

Effect of CFC1 on cancer cell stemness in neuroblastoma

(神経芽腫のがん幹細胞性における CFC1 の役割)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻（医学領域）

（主任：下条直樹教授）

力石 浩志

【目的】

近年各種悪性腫瘍において、再発・治療抵抗性の原因としてがん幹細胞の存在が証明されてきている。高リスク神経芽腫は、強力な集学的治療にもかかわらず予後不良な悪性腫瘍であり、再発・難治化の原因としてがん幹細胞の関与が考えられているが、他のがん種のようながん幹細胞を同定できるマーカーは現在までに見つかっていない。しかしながら神経芽腫細胞では、無血清培地に EGF、bFGF を添加した sphere 培養を行うことによって、がん幹細胞を集積できるとされている。

今回我々は、sphere 培養法を用い、神経芽腫細胞の幹細胞性制御因子の同定と機能解析を行った。

【方法・結果】

患者検体を用い、生検腫瘍検体と sphere 細胞の遺伝子発現の変化をマイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、sphere 細胞において 2 倍以上の発現上昇が認められた遺伝子が 206 遺伝子あった。発現上昇率が上位で、高発現が患者の不良な予後と相関し、さらに治療標的としやすい細胞表面タンパク質を産生する遺伝子であり、かつ細胞株でも同様の発現変化が再現性される遺伝子として、*CFC1* 遺伝子を抽出した。

神経芽腫細胞株において *CFC1* 遺伝子を knockdown したところ、sphere 形成能は低下した。また、ヌードマウスの皮下への移植実験を行ったところ、*CFC1* knockdown 細胞株では *in vivo* での腫瘍形成も抑制された。

次に、神経芽腫細胞株において同遺伝子を **overexpression** した。**Knockdown** の際とは逆に **sphere** 形成能は促進され、細胞増殖実験 (WST アッセイ)、**soft agar colony** アッセイにおいても、細胞増殖能の増加が確認された。さらに、*in vivo* での移植腫瘍形成も促進された。

さらに、これらの現象における **CFC1** の作用機序を見出すために、**CFC1** を **overexpression** した細胞株でマイクロアレイ・**pathway** 解析を行った。**Activin A** シグナルに所属する遺伝子の発現が有意に変化しており、同シグナルを介して **CFC1** は機能している可能性が推定された。この仮説を検証するために、**CFC1 overexpression** 細胞株に対して **Activin A** を付加したところ、**mock** では誘導された神経芽腫細胞の分化が **CFC1 overexpression** 細胞においては抑制され、**Activin A** シグナルの下流である **Smad2** のリン酸化も、**CFC1 overexpression** 細胞では抑制されていることが確認された。

【考察】

神経芽腫の幹細胞性に着目し、**sphere** 細胞とその他のがん細胞との比較を行い、**CFC1** 遺伝子を抽出した。**CFC1** は発生段階での左右軸形成、心臓の器官形成に関わることが証明されているが、がんとの関連は明らかにはなっていなかった。細胞株での **overexpression** /**knockdown** 実験により、**CFC1** が神経芽腫においてがん幹細胞性を亢進することが確認された。

CFC1 のファミリー遺伝子である **TDGF1(Cripto, CR-1)** はこれまで各種成人がんの悪性化と関係していること、受容体結合分子として

TGFβファミリーである Nodal シグナルの伝達に必須であることが分かっていたが、本研究によって、神経芽腫においては *CFC1* が、Nodal と同じく TGFβファミリーである Activin A シグナルを阻害することによって神経芽腫細胞の分化を抑制し、がん幹細胞性を亢進することを初めて証明した。

【結論】

神経芽腫細胞において、*CFC1* 遺伝子は Activin A シグナルの阻害を介してがん幹細胞性を亢進することが確認された。細胞膜表面分子である *CFC1* の阻害は、神経芽腫においてがん幹細胞標的治療の候補となりうる。