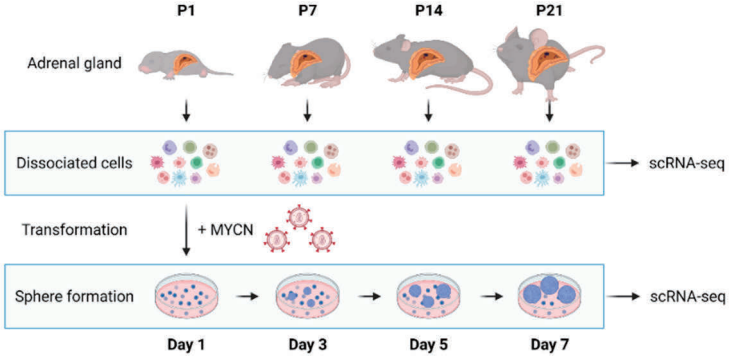
129　神経芽腫の時期特異的な発生機構解明	坪田　庄真

【目的】小児がんの一つである神経芽腫はほとんどが 5 歳未満の幼児～小児期で発症し、発症時年齢とゲノム異常の相関も明らかにされており、その発症には体の発達と関係した時期特異性が存在している。本研究では、*in vitro* 神経芽腫発生モデル、副腎組織と *in vitro* で培養した細胞を対象にシングルセル遺伝子発現解析を行い、神経芽腫発生の時期特異性に寄与する候補遺伝子の同定を目的とし、より詳細な発生機構の解明に基づいた新規治療標的となり得る遺伝子（シーズ）の探索研究へと発展させる基盤作りに挑んだ。

【方法】野生型マウスの副腎組織を酵素処理で単細胞化し、神経芽腫のがん遺伝子である *MYCN* をレンチウイルスで発現させスフェア形成を評価した。マウス副腎組織（生後 1 日、7 日、14 日、21 日齢）および生後 1 日齢マウス副腎由来細胞へ *MYCN* を強制発現させた初代培養細胞（培養 1 日、3 日、5 日、7 日後）を対象にシングルセル遺伝子発現解析を行った。また、ウェスタンブロッティングと免疫染色によりシングルセル解析の結果を検証した。

【結果】生後 1 日の副腎組織由来細胞を培養し、レンチウイルスを用いて神経芽腫のがん遺伝子である *MYCN* を過剰発現させると、増殖性のスフェアが形成された。一方で、1 週齢以降の副腎組織由来細胞へ同様に *MYCN* を導入した結果、週齢を重ねるにつれ形成するスフェアが著しく減少した。すなわち、生後 0 日の副腎組織には MYCN によってがん化する細胞タイプが存在し、神経芽腫の時期特異性を担う遺伝子が発現していることを強く示唆している。次に、マウス副腎組織（生後 1 日、7 日、14 日、21 日齢）および生後 1 日齢マウス副腎由来細胞へ *MYCN* を強制発現させた初代培養細胞（培養 1 日、3 日、5 日、7 日後）を対象にシングルセル遺伝子発現解析を行った（図）。クラスタリング解析とマーカー遺伝子の発現から、髄質細胞、シュワン前駆細胞など組織中に存在する細胞に加え、培養に伴い増殖してくる細胞群（「Sphere?」と定義）を推定した。興味深いことに、「Sphere?」クラスターは典型的な神経芽腫マーカーであるアドレナリン作動性神経関連遺伝子（ADRN marker）の発現は見られ、間葉系遺伝子（MES marker）の発現が高かった。ウェスタンブロッティングと免疫染色で検証した結果、*MYCN* で形質転換したスフェアは ADRN マーカーの発現が顕著であり、MES マーカーの発現は認められなかった。すなわち、シングルセル遺伝子発現解析で推定した「Sphere?」という細胞クラスターは *MYCN* により形質転換した神経芽腫のスフェアではなく、培養で増殖するその他の細胞タイプ（線維芽細胞が有力）である可能性を強く示唆している。当初の予想に反して、シングルセル遺伝子発現解析でスフェアの細胞クラスターを同定できなかった。今回、培養サンプルは浮遊して増えるスフェアに加え、培養ディッシュに張り付いて増える細胞もまとめて解析に供した。おそらく、張り付いて増殖する線維芽細胞の細胞割合がかなり多くなり、スフェア細胞が解析されなかった可能性が高いと考えられる。スフェア細胞だけを回収し再度シングルセル遺伝子発現解析データの取得を行ったため、今後新しく取得したデータと統合し、再度解析を進め、副腎組織中に存在するどの細胞タイプが実際にスフェア形成に寄与しているか明らかにする。

マウス副腎組織及び *MYCN* で形質転換した細胞のシングルセル遺伝子発現解析



129. 神経芽腫の時期特異的な発生機構解明

坪田　庄真

名古屋大学 大学院医学系研究科 分子生物学

Key words：神経芽腫，*MYCN*，スフェア培養，シングルセル遺伝子発現解析

緒　言

小児がんの一つである神経芽腫では、最近の 5 年生存率は 50%程度と改善傾向にあり、分子標的治療（ALK 阻害剤や Aurora Kinase 阻害剤など）の臨床治験も進められているが、未だ患者 QOL の向上や治療抵抗性に資する有効な治療法は確立されていない［1］。大規模ゲノム解析により神経芽腫には様々なゲノム異常が存在していることが明らかになった一方で、同じゲノム異常を持ちながらエピゲノムで制御された異なる表現型を示すサブタイプの存在が明らかになるなど、分子レベルの腫瘍“間”不均一性と細胞レベルの腫瘍“内”不均一性が混在している。また、他のがん種では見られない自然退縮という現象が起きるなど、表現型が極めて多様である。このような多様性の存在が明らかになる一方で、なぜこの多様性が生まれるのか、本質的な疑問である「神経芽腫の発生機構」については多くが謎のままである。神経芽腫はほとんどが 5 歳未満の幼児～小児期で発症し、発症時年齢とゲノム異常の相関も明らかにされており、その発症には体の発達と関係した時期特異性が存在している。発生機構について、神経芽腫で頻繁に増幅している Myc ファミリーの *MYCN*、点変異が見つかっている *ALK* など、幾つかの遺伝子については遺伝子改変動物モデルで神経芽腫を引き起こすことが分かっている［2］。しかし、がん化の時期特異性を担う遺伝子、すなわち神経芽腫を成り立たせる環境については全く分かっていない。

神経芽腫の起源について、最近ヒトやマウス胎児の副腎組織および神経芽腫組織を対象としたシングルセル遺伝子発現解析の論文が報告された［3，4］。その結果、神経芽腫細胞は発生中の交換神経前駆細胞に類似しており、もう一つの起源として考えられていた副腎のクロム親和性細胞とは類似していないことが報告された。このように神経芽腫の起源となりうる細胞が示唆されているが、依然として詳細な起源細胞とその機構は不明である。これまでの先行研究で、神経芽腫モデルである TH-MYCN マウスで発生した神経芽腫細胞を *in vitro* でスフェア培養する培養法を確立した［5］。これを応用し簡易的且つ短期間で神経芽腫の発生を模倣することができるようになった。本研究では、この *in vitro* 神経芽腫発生モデル、副腎組織と *in vitro* で培養した細胞を対象にシングルセル遺伝子発現解析を行い、神経芽腫発生の時期特異性に寄与する候補遺伝子の同定を目的とし、より詳細な発生機構の解明に基づいた新規治療標的となり得る遺伝子（シーズ）の探索研究へと発展させる基盤作りに挑んだ。

方　法

1. *in vitro* 神経芽腫発生モデル

生後 1 日、7 日、14 日、21 日齢の野生型マウス（C57BL/6JJcl）の副腎組織を酵素処理で単細胞化し、先行研究で確立した培地［5］で培養を行った。培養初日に、Venus 蛍光タンパク質のみを発現するコントロールのレンチウイルスと、Venus に 2A ペプチドで融合したヒト *MYCN* 遺伝子（神経芽腫のがん遺伝子）を発現するレンチウイルスを感染させた。培養から 7 日後に形成したスフェアの数・大きさを評価した。

MYCN により形質転換したスフェア細胞 1×10^{6} cells を培地と 1 : 1 で混合したマトリゲルと混ぜ、ヌードマウス（BALB/c-nu）の皮下へ移植した。移植から 4 週間後に形成した腫瘍の大きさ・重さを評価した。また形成

した腫瘍組織切片を HE 染色にて評価した。

2. シングルセル遺伝子発現解析

マウス副腎組織（生後 1 日、7 日、14 日、21 日齢）および生後 1 日齢マウス副腎由来細胞へ *MYCN* を強制発現させた初代培養細胞（培養 1 日、3 日、5 日、7 日後）を対象にシングルセル遺伝子発現解析を行った。組織もしくは培養細胞から酵素処理により単細胞懸濁液を調整し、Chromium Single Cell 3' Reagent Kits V3.1（10x Genomics）を用いてライブラリ調製後、HiSeq（Illumina）によりシーケンシングを行った。Cell ranger（10x Genomics）と Seurat を用いてデータ解析を行った。

3. ウェスタンブロッティングと免疫染色

シングルセル遺伝子発現解析の結果を検証するため、*MYCN* で形質転換したスフェア細胞に加え、神経芽腫細胞株の SH-EP（MES-type）と SH-SY5Y（ADRN-type）、また神経芽腫モデル Th-MYCN マウス由来のスフェア細胞（ADRN-type）をコントロールとし、ADRN マーカー（Th、Dbh）及び MES マーカー（Notch2、Yap）の発現をウェスタンブロッティング及び免疫染色により確認した。

結果および考察

1. *In vitro* 神経芽腫発生モデルの構築

生後 1 日の野生型マウスの副腎組織を酵素処理により単細胞化して培養し、レンチウイルスを用いて神経芽腫のがん遺伝子である *MYCN* を過剰発現させると、増殖性のスフェアが形成された（図 1a）。*MYCN* により形質転換したスフェアは継代可能であり、野生型マウスの皮下へ移植したところ病理学的に疑いのない神経芽腫を形成した（図 1b）。

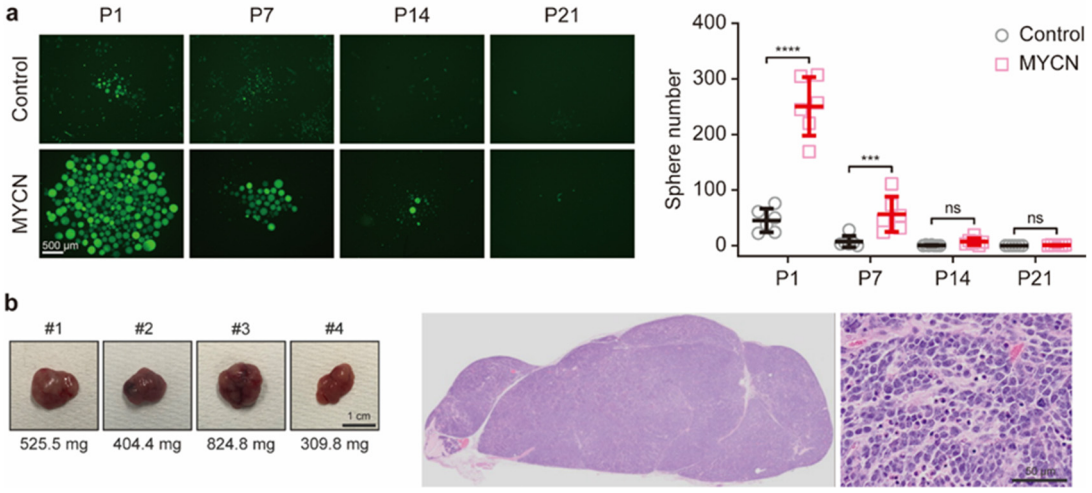


図1. *In vitro*神経芽腫発生モデル

a）生後1日、7日、14日、21日由来副腎細胞を0.5×10^6 cells/wellで播種し、それぞれVenus蛍光タンパク質を発現するControlと*MYCN*を発現するレンチウイルスを感染させ、7日間培養を行った。左図は代表的な蛍光像、右図は形成したスフェア数の定量結果。各6匹ずつ実験を行った。*** $p<0.001$、**** $p<0.0001$（Welch's t test）。

b）ヌードマウスへ移植したスフェア（*MYCN*で形質転換したスフェア）の皮下腫瘍。左図は4匹へ移植し形成した皮下腫瘍、右図はHE染色像。

一方で、1 週齢以降の副腎組織由来細胞へ同様に *MYCN* を導入した結果、週齢を重ねるにつれ形成するスフェアが著しく減少した（図 1a）。この結果から、生後 0 日の副腎組織には MYCN によってがん化する細胞タイプが存在し、神経芽腫の時期特異性を担う遺伝子が発現していることを強く示唆している。これまでに、ES や iPS 由来細胞から交換神経系の前駆細胞を作成したモデル［6］や、ヒト由来の神経堤細胞をマウスへ移植したキメラモデル［7］を用いた研究など報告は幾つか出ているが、神経芽腫発生の時期特異性について着目している研究はなく、この観察および実験手法は本研究を支える最も重要であり独自の基盤となった。

2. シングルセル遺伝子発現解析

生後 1 日齢の副腎組織に含まれる未分化細胞（神経芽腫の起源を含む）を同定し、特異的に発現している遺伝子、すなわち神経芽腫の発生を担う可能性のある遺伝子のリストを作成することを目的とし、マウス副腎組織（生後 1 日、7 日、14 日、21 日齢）および生後 1 日齢マウス副腎由来細胞へ *MYCN* を強制発現させた初代培養細胞（培養 1 日、3 日、5 日、7 日後）を対象にシングルセル遺伝子発現解析を行った（図 2）。

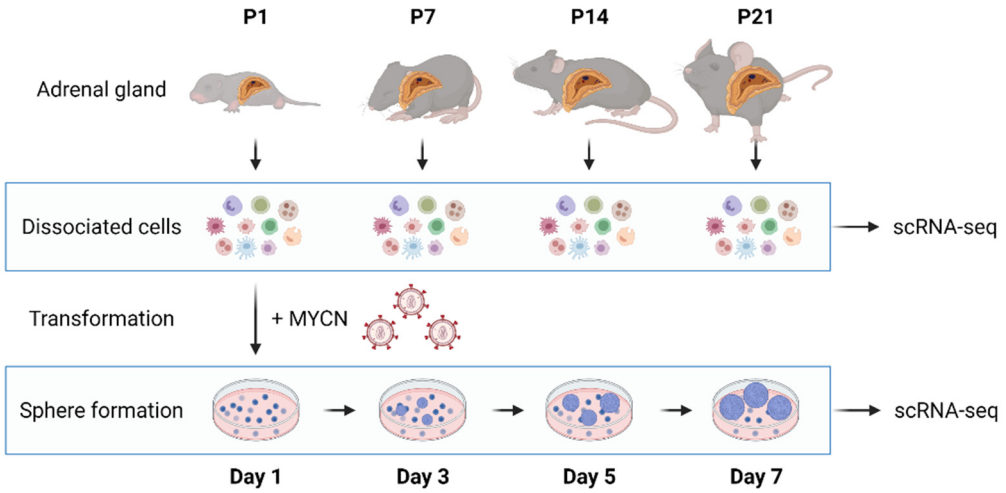


図2. シングルセル遺伝子発現解析の実験デザイン

計 8 サンプルのシングルセル遺伝子発現解析結果を統合し、空ドロップレットの除去、ダブレットの除去、Ambient RNA の検出に基づく混入 RNA の補正など幾つかの Quality control を行い、合計 31,095 細胞のデータを解析した。クラスタリングにより 19 の細胞クラスターに分類した後、各クラスター特異的に発現する遺伝子の抽出、SingleR を用いた細胞タイプの推定やマーカー遺伝子の発現パターンから、各クラスターの細胞タイプ（計 15 クラスター）を同定した（図 3）。その結果、副腎組織サンプルには、皮質細胞、髄質細胞、シュワン前駆細胞、内皮細胞、マクロファージなどのモノサイト、B 細胞、T 細胞、好中球などが存在していた。一方、培養サンプルには、皮質由来細胞、髄質由来細胞、シュワン前駆細胞、一過的な細胞群、培養に伴い増殖してくる細胞群（「Sphere?」と定義）が存在していた。興味深いことに、「Sphere?」クラスターは典型的な神経芽腫マーカーであるアドレナリン作動性神経関連遺伝子（ADRN marker）の発現は見られず（副腎髄質クラスターで最も高い）、間葉系遺伝子（MES marker）の発現が高い（線維芽細胞や内皮細胞と同等に高い）ということが分かった（図 3）。

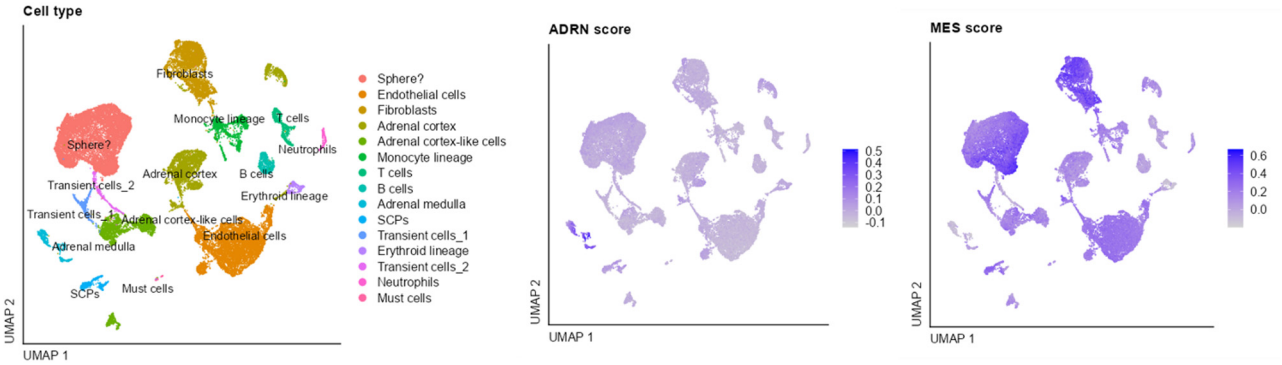


図 3. クラスタリング解析による細胞タイプの同定と ADRN/MES 遺伝子発現スコア解析

3. シングルセル遺伝子発現解析の検証

シングルセル遺伝子発現解析の結果を検証するため、生後 1 日齢マウスの副腎組織由来細胞へ MYCN を導入し形成したスフェア（培養 7 日後）を回収し、ADRN と MES マーカーの発現をウェスタンブロッティングおよび免疫染色にて確認した（図 4）。予想外に、MYCN で形質転換したスフェアは ADRN マーカーの発現が顕著であり、MES マーカーの発現は認められなかった（図 4）。これらの結果は、シングルセル遺伝子発現解析で推定した「Sphere?」という細胞クラスターは MYCN により形質転換した神経芽腫のスフェアではなく培養で増殖するその他の細胞タイプ（線維芽細胞が有力）である可能性を強く示唆している。

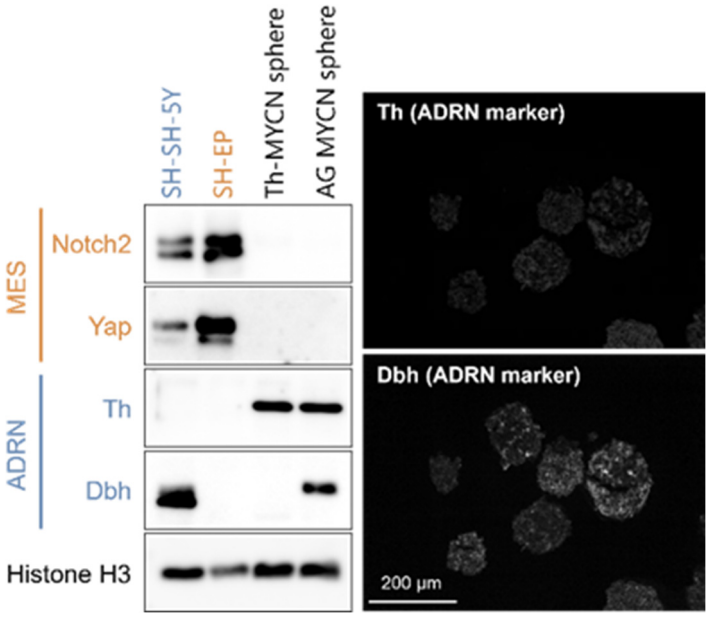


図 4. スフェアにおける ADRN/MES マーカーの発現
各種細胞における ADRN マーカー（Th、Dbh）と MES マーカー（Notch2、Yap）タンパク質の発現をウェスタンブロッティング（左図）と免疫染色（右図）により確認した。

当初の予想に反して、シングルセル遺伝子発現解析でスフェアの細胞クラスターを同定できなかった。今回、培養サンプルは浮遊して増えるスフェアに加え、培養ディッシュに張り付いて増える細胞もまとめて解析に供した。おそらく、張り付いて増殖する線維芽細胞の細胞割合がかなり多くなり、スフェア細胞が解析されなかった

可能性が高いと考えられる。本研究報告書には間に合わなかったが、スフェア細胞だけを回収し再度シングルセル遺伝子発現解析データの取得を行った。新しく取得したデータと統合し、再度解析を進め、副腎組織中に存在するどの細胞タイプが実際にスフェア形成に寄与しているか明らかにする。また、その細胞タイプが副腎の異なる週齢においてどのように変化していくか（数が減るのか、遺伝子発現が変わるのか）を詳細に解析することで、時期特異的な神経芽腫の発生機構解明を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学の佐藤好隆、同医学部医学科所属の学生（山崎凜、山岸美彩、平瀬楓）であり、ここに厚く御礼申し上げます。また本研究のご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, Weiss WA. Neuroblastoma. Nat Rev Dis Primers. 2016 Nov 10;2:16078. doi: 10.1038/nrdp.2016.78. PMID: 27830764.

2） Tsubota S, Kadomatsu K. Origin and initiation mechanisms of neuroblastoma. Cell Tissue Res. 2018 May;372(2):211-221. doi: 10.1007/s00441-018-2796-z. Epub 2018 Feb 14. PMID: 29445860.

3） Jansky S, Sharma AK, Körber V, Quintero A, Toprak UH, Wecht EM, Gartlgruber M, Greco A, Chomsky E, Grünewald TGP, Henrich KO, Tanay A, Herrmann C, Höfer T, Westermann F. Single-cell transcriptomic analyses provide insights into the developmental origins of neuroblastoma. Nat Genet. 2021 May;53(5):683-693. doi: 10.1038/s41588-021-00806-1. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33767450.

4） Kameneva P, Artemov AV, Kastriti ME, Faure L, Olsen TK, Otte J, Erickson A, Semsch B, Andersson ER, Ratz M, Frisén J, Tischler AS, de Krijger RR, Bouderlique T, Akkuratova N, Vorontsova M, Gusev O, Fried K, Sundström E, Mei S, Kogner P, Baryawno N, Kharchenko PV, Adameyko I. Single-cell transcriptomics of human embryos identifies multiple sympathoblast lineages with potential implications for neuroblastoma origin. Nat Genet. 2021 May;53(5):694-706. doi: 10.1038/s41588-021-00818-x. Epub 2021 Apr 8. PMID: 33833454; PMCID: PMC7610777.

5） Tsubota S, Kishida S, Shimamura T, Ohira M, Yamashita S, Cao D, Kiyonari S, Ushijima T, Kadomatsu K. PRC2-Mediated Transcriptomic Alterations at the Embryonic Stage Govern Tumorigenesis and Clinical Outcome in MYCN-Driven Neuroblastoma. Cancer Res. 2017 Oct 1;77(19):5259-5271. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3144. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28807939.

6） Saxena S, Wahl J, Huber-Lang MS, Stadel D, Braubach P, Debatin KM, Beltinger C. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. PLoS One. 2013 May 10;8(5):e64454. doi: 10.1371/journal.pone.0064454. PMID: 23675538; PMCID: PMC3651195.

7） Cohen MA, Zhang S, Sengupta S, Ma H, Bell GW, Horton B, Sharma B, George RE, Spranger S, Jaenisch R. Formation of Human Neuroblastoma in Mouse-Human Neural Crest Chimeras. Cell Stem Cell. 2020 Apr 2;26(4):579-592.e6. doi: 10.1016/j.stem.2020.02.001. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32142683; PMCID: PMC7663823.