

Title	Silencing MYCN by RNA interference induces growth inhibition, apoptotic activity and cell differentiation in a neuroblastoma cell line with MYCN amplification
Author(s)	奈良, 啓悟
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/47539
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏 名	な ら けい こ 奈 良 啓 悟
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 9 6 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学 位 論 文 名	Silencing of <i>MYCN</i> by RNA interference induces growth inhibition, apoptotic activity and cell differentiation in a neuroblastoma cell line with <i>MYCN</i> amplification (RNA 干渉を用いた <i>MYCN</i> 発現抑制— <i>MYCN</i> 増幅神経芽腫に対する増殖抑制効果ならびにアポトーシスと分化誘導)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福 澤 正 洋 (副査) 教 授 青 笹 克 之 教 授 大 菌 恵 一

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

神経芽腫は、神経堤由来の悪性腫瘍で、小児外科領域における悪性固形腫瘍において最も多く、小児がん死亡の約15%を占める。*MYCN* 癌遺伝子の増幅は、神経芽腫における最も強い予後因子とされ、未だ *MYCN* 増幅症例の生存率は 22~33%と予後不良である。その後、トランスジェニックマウスに、*MYCN* を高発現させたところ、神経芽腫が形成されることが報告され、*MYCN* 発現と腫瘍形成との関連性が示唆されている。

そこで本実験では遺伝子発現を特異的かつ効果的に抑制する手法である RNA 干渉を用いて *MYCN* 発現抑制を行い、発現抑制による神経芽腫細胞の変化を観察し、*MYCN* 発現が神経芽腫に与える影響を検討した。

[方法ならびに成績]

小児神経芽腫から樹立された細胞株で *MYCN* 増幅を認める NB-1 を用いた。

一般的に神経系細胞への遺伝子導入は難しいとされているが、細胞継代と遺伝子の導入を同時に行うリバーストランスフェクション法を用い、導入効率を高めた。

RNA 干渉の結果を比較検討するため、4つの群を用意した。すなわち、*MYCN* の配列に特異的な siRNA を導入した群 (*MYCN*-siRNA 群)、また対照群として、ヒトの遺伝子と相補性のない siRNA を導入した群、導入試薬のみを加えた群、また、無処理の群を作成して比較検討した。

RNA 干渉後の *MYCN* mRNA 発現量を測定するために、Real time RT-PCR にて測定したところ、siRNA 導入後 48 時間の時点で *MYCN*-siRNA 群では、他の3群に比し約 30%に抑制された。*MYCN* mRNA 発現低下の経時的変化を観察したところ、mRNA 発現が最も低下するのは導入後 2 日目であった。その後は徐々に回復し、6 日目には、発現抑制は認められなくなった。次に *MYCN* 蛋白の発現レベルを Western blotting 法にて評価したところ、*MYCN*-siRNA 群は、他の群に比べ発現抑制を認めた。また免疫染色では、*MYCN* は核タンパクであることから、対照群では核を中心とした染色が認められたが、*MYCN*-siRNA 群では、核の染色が減弱または消失していた。以上よ

り、RNA 干渉による MYCN 発現抑制が mRNA および蛋白レベルで確認された。

RNA 干渉後の細胞増殖能を検索するために WST-1 assay を用い細胞活性を測定した。MYCN-siRNA 群は、導入後 5 日目より他の 3 群に比し有意な生細胞数の減少が認められ、細胞増殖抑制が観察された。

また、TUNEL 染色を行ったところ、MYCN-siRNA 群では、アポトーシス陽性細胞が約 50% に観察され、他の群に比しアポトーシスが亢進していた。

さらに形態学的変化を観察したところ、MYCN-siRNA 群では、神経突起の多方向への伸長、および細胞・核それぞれの増大が観察され、神経細胞への分化傾向が認められた。

最後に、RNA 干渉後に、神経系の成長・生存因子で神経芽腫の予後良好因子とされる *TrkA*、*C* の発現を Real time RT-PCR にて測定した。MYCN-siRNA 群では、*TrkA*、*C* が有意に亢進していた。*TrkA* は、神経系細胞の分化傾向を示す因子とされ、観察された細胞形態に一致する結果であった。

[総 括]

本実験においては、MYCN 増幅神経芽腫細胞株である NB-1 に対し、RNA 干渉を用いて MYCN 遺伝子の mRNA および蛋白レベルでの発現抑制を行った。

MYCN 発現抑制により神経芽腫細胞の増殖が抑制され、同時にアポトーシスの亢進や細胞の分化誘導が観察された。これらにより、MYCN 遺伝子が神経芽腫の増殖や脱分化といった腫瘍性獲得に重要な因子であることが明らかとなった。

さらに、RNA 干渉を用いた MYCN 発現抑制法は、MYCN 増幅神経芽腫症例に対する有効な治療モデルとなる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

MYCN 遺伝子増幅は神経芽腫の最も強い予後不良因子であることが知られている。本研究では、RNA 干渉にて MYCN 発現抑制を行い、MYCN 発現が神経芽腫にもたらす影響を検討した。MYCN 増幅細胞である NB-1 に、MYCN 配列特異的な siRNA を導入し、RNA 干渉を行った (MYCN-siRNA 群)。MYCN mRNA の発現レベルは対照群に比し抑制され、蛋白レベルでの発現抑制も確認された。MYCN-siRNA 群では、対照群に比し有意に細胞増殖が抑制され、同時にアポトーシスの亢進・細胞の分化傾向が認められた。また、神経芽腫の予後良好因子である *TrkA* および *TrkC* の発現も亢進していた。MYCN 遺伝子が神経芽腫の増殖や脱分化といった腫瘍性獲得に重要な因子であることが明らかになり、また RNA 干渉を用いた MYCN 発現抑制法は、MYCN 増幅神経芽腫症例に対する有効な治療モデルとなる可能性が示唆された。

以上の研究は、学位に値するものと認める。