

【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

