

## 論文の内容の要旨

論文題目 脳腫瘍幹細胞における BMP シグナルの分化誘導機構の解析

氏名 田邊 諒

神経膠芽腫は成人の脳腫瘍において最も悪性度の高い固形腫瘍であり、治療効果を改善する方法は確立されていない。神経膠芽腫の発症、進展、再発や治療抵抗性において中心的な役割をしている細胞集団として、脳腫瘍幹細胞の存在が考えられている。脳腫瘍幹細胞は CD133, OLIG2, SOX2 などの神経幹細胞および神経前駆細胞マーカーを発現する細胞集団として特徴づけられており、脳腫瘍幹細胞を単離する上で細胞表面に発現される CD133 が指標として広く用いられている。

脳腫瘍幹細胞の腫瘍原性を抑制する因子として bone morphogenetic protein (BMP)が報告されているが、その分子機構は十分に解明されていない。神経膠芽腫患者の検体から樹立した脳腫瘍幹細胞 TGS-01 および TGS-04 においては、BMP-4 によりスフェア形成が阻害されるのに伴い脳腫瘍幹細胞マーカーの CD133, OLIG2 および SOX2 の発現が減少する。その一方で、正常な神経幹細胞の幹細胞性に関わることが報告されている paired related homeobox 1 (PRRX1)の発現が BMP シグナルにより誘導されることを見出した。PRRX1 はホメオボックス転写因子であり、CD133 をコードする *PROM1* 遺伝子のプロモーターP1 領域に PRRX1 の結合部位が予測されたため、クロマチン免疫沈降法により PRRX1 が *PROM1* 遺伝子のプロモーターP1 に結合していることを確認した。PRRX1 による *PROM1* プロモーターP1 の制御を確認するために *PROM1* プロモーターP1 とその変異体を用いてレポーターアッセイを行い、*PROM1* プロモーターP1 を負に制御する上で不可欠な PRRX1 結合部位を同定した。

PRRX1 には主に 2 つのスプライシングアイソフォーム pmx-1a および pmx-1b が存在する。両者はホメオボックスドメインを含む 1 番目から 199 番目のアミノ酸配列を共有しているが、C 末端領域に両者の構造的な違いがある。245 アミノ酸で構成される pmx-1b アイソフォームは C 末端領域に機能未知の OAR ドメインを有するのに対して、217 アミノ酸で構成される pmx-1a アイソフォームは OAR ドメインを持たない。PRRX1 の機能を解析するために、shRNA でまず 2 つのアイソフォーム両方をノックダウンした。PRRX1 のノックダウンにより BMP-4 の存在下でも脳腫瘍幹細胞のスフェア形成能および *PROM1* の発現が維持された。同様に CD133 陽性の脳腫瘍幹細胞集団が増加した。PRRX1 の発現が腫瘍形成能に関わるかどうかを評価するために、BALB/c nu/nu マウスの頭蓋内同所移植モデルを用いた。PRRX1 shRNA を発現する TGS-01 を移植すると、コントロール群に比べて *in vivo* での腫瘍形成が促進されており、マウスの生存期間が有意に短縮した。次に PRRX1 のアイソフォーム間で機能的な違いがあるかどうかを検討するために、shRNA により pmx-1b アイソフォームのみをノックダウンした。両アイソフ

フォームをノックダウンした場合と同様に、pmx-1b アイソフォームのみのノックダウンによってスフェア形成、*PROM1* の発現上昇および CD133 陽性の脳腫瘍幹細胞集団の増加が BMP-4 の存在下でも観察された。さらに BALB/c *nu/nu* マウスの頭蓋内同所移植モデルにおいても同様に、pmx-1b アイソフォームに対する shRNA を発現する TGS-01 はコントロール群に比べて *in vivo* での腫瘍形成能が高く、マウスの生存期間を有意に短縮させた。したがって、PRRX1 のアイソフォームのうち少なくとも pmx-1b が脳腫瘍幹細胞のがん幹細胞性の制御および腫瘍形成能に必要であることが示唆された。

PRRX1 の各アイソフォームを脳腫瘍幹細胞に過剰発現させて幹細胞性および腫瘍形成能を評価した。PRRX1 pmx-1a の過剰発現により TGS-01 ではスフェア形成が阻害されるのに対して、TGS-04 ではスフェア形成が観察された。一方、TGS-01 と TGS-04 ともに PRRX1 pmx-1b の過剰発現によりスフェア形成が阻害された。また、*PROM1* の発現および CD133 陽性の細胞集団は TGS-01 と TGS-04 のいずれにおいても、PRRX1 pmx-1a の過剰発現では大きく変化しないのに対して、PRRX1 pmx-1b の過剰発現によって顕著に減少した。腫瘍形成能に関してもアイソフォーム間で相違が観察されており、BALB/c *nu/nu* マウスの頭蓋内同所移植モデルではコントロール群に比べて TGS-01 の腫瘍形成が PRRX1 pmx-1a の過剰発現により促進されたのに対し、PRRX1 pmx-1b の過剰発現により遅延した。この結果により、PRRX1 のアイソフォームのうち pmx-1b が脳腫瘍幹細胞のがん幹細胞性と腫瘍形成能を抑制することが示唆された。

*PROM1* プロモーターP1 における PRRX1 の結合部位の近傍には CpG アイランドが存在するとともに、この CpG アイランドは CD133 陽性の脳腫瘍では低メチル化状態が保たれていることが報告されている。これらのことを踏まえ、メチル化特異的 PCR により BMP-4 の刺激で *PROM1* プロモーターP1 のメチル化が亢進することを確認した。CpG のメチル化に寄与する DNA メチル基転移酵素を同定するために、3 種類の DNA メチル基転移酵素 *DNMT1*, *DNMT3A* および *DNMT3B* をそれぞれ shRNA でノックダウンした。*DNMT1* および *DNMT3B* のノックダウンでは *PROM1* の発現に影響がなかったのに対し、*DNMT3A* のノックダウンにより *PROM1* の発現が上昇し、BMP-4 による *PROM1* の発現減少が抑制された。また、*DNMT3A* のノックダウンにより CD133 陽性の細胞集団が増加し、BMP-4 の存在下でも維持された。これらの結果より、BMP シグナルにより *PROM1* の発現を抑制する上で *DNMT3A* が必要であることが示唆された。

PRRX1 はアイソフォームを問わず *PROM1* プロモーターP1 に結合しうるにも関わらず、*PROM1* の転写制御の点でアイソフォーム間に相違が見られた。この相違は PRRX1 のアイソフォーム間の構造的な違い、すなわちアイソフォーム間の結合パートナーの違いから生じていることが考えられる。PRRX1 のアイソフォームのうち pmx-1b の過剰発現により *PROM1* プロモーターP1 のメチル化が亢進したことをメチル化特異的 PCR で確認したため、PRRX1 pmx-1b と

DNMT3A が相互作用するかどうかを検証した。共免疫沈降により DNMT3A は PRRX1 のアイソフォームのうち pmx-1a と結合しなかった一方で pmx-1b と結合することが示唆された。PRRX1 pmx-1b と DNMT3A との相互作用が *PROM1* の転写制御の上で機能的に重要かどうかを確認するために、PRRX1 の過剰発現と同時に *DNMT3A* のノックダウンをした。PRRX1 pmx-1b の過剰発現による *PROM1* の発現抑制が *DNMT3A* のノックダウンにより見られなくなった。また、PRRX1 pmx-1b の過剰発現による CD133 陽性率の減少が *DNMT3A* のノックダウンにより抑制された。これにより、PRRX1 pmx-1b は DNMT3A との相互作用を介して *PROM1* 遺伝子をエピジェネティックに抑制することが示唆された。

以上より、BMP シグナルにより発現誘導された PRRX1 のうち pmx-1b スプライシングアイソフォームが DNMT3A と相互作用し、CD133 をコードする *PROM1* プロモーターをエピジェネティックに発現抑制をすることが示唆された。その結果として CD133 陽性率が減少し、脳腫瘍幹細胞の幹細胞様の性質および腫瘍形成能が阻害されると考えられる。以上より、PRRX1 pmx-1b および DNMT3A の発現と機能を制御することが脳腫瘍を治療する上での標的になる可能性が示唆された。