

審査の結果の要旨

氏名 田邊 諒

本研究は脳腫瘍幹細胞の分化において重要と考えられる BMP シグナルの分化誘導機構を明らかにするため、神経膠芽腫患者由来の腫瘍細胞 TGS-01 および TGS-04 を用いて、BMP シグナルが脳腫瘍幹細胞の特性を制御する分子メカニズムの解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. BMP-4 により脳腫瘍幹細胞マーカーと考えられている CD133 の発現が転写レベルで抑制されていた一方、ホメオボックス転写因子の PRRX1 の発現が誘導されていた。クロマチン免疫沈降法により CD133 のプロモーターに PRRX1 が結合しうることが示唆され、CD133 のプロモーターおよびその変異体を用いたレポーターアッセイを行ったところ PRRX1 が CD133 のプロモーター活性を負に調節しうることが示唆された。
2. PRRX1 を shRNA によりノックダウンしたところ、CD133 の転写レベルが上昇しており、細胞集団における CD133 の陽性率が上昇していた。BALB/c *nu/nu* マウスを用いた頭蓋内同所移植モデルにより生体内における神経膠芽腫細胞の腫瘍形成能を評価したところ、PRRX1 のノックダウンにより腫瘍の進展が促進されることが示唆された。
3. PRRX1 が有する 2 つのスプライシングアイソフォーム pmx-1a および pmx-1bのうち、pmx-1b アイソフォームのみを shRNA によりノックダウンしたところ、CD133 の転写レベルの上昇および生体内における腫瘍形成能の亢進が認められた。
4. PRRX1 のアイソフォームをそれぞれ過剰発現したところ、pmx-1a の過剰発現では CD133 の発現に変動が見られない一方、pmx-1b の過剰発現により CD133 の転写レベルが減少していた。また頭蓋内同所移植モデルにおいて腫瘍形成能を評価したところ、pmx-1a を過剰発現した神経膠芽腫細胞では腫瘍の進展が促進された一方で、pmx-1b を過剰発現した神経膠芽腫細胞では腫瘍の形成がコントロール細胞に比べて遅れていた。これらのことから pmx-1b の機能が脳腫瘍幹細胞の制御において重要である可能性が示唆された。
5. メチル化特異的 PCR により CD133 のプロモーターにおけるメチル化状態を評価したところ、pmx-1b の過剰発現系においてプロモーターのメチル化が亢進していた。shRNA によるメチル基転移酵素のノックダウンにより、CD133 の転写制御に重要なメチル基転移酵素として DNMT3A を同定した。共免疫沈降法により DNMT3A が PRRX1 の pmx-1b アイソフォームと相互作用する可能性が示唆された。
6. PRRX1 の過剰発現と DNMT3A のノックダウンを同時に行ったところ、pmx-1b の発現

により減少する CD133 の転写レベルが DNMT3A のノックダウンにより回復することが認められ、pmx-1b が CD133 の転写抑制をする上で DNMT3A の機能が必要であることが示唆された。

以上から、本論文は神経膠芽腫患者由来の腫瘍細胞 TGS-01 および TGS-04 において、BMP シグナルにより発現誘導される転写因子 PRRX1 の pmx-1b アイソフォームがメチル基転移酵素 DNMT3A を介して CD133 の転写を抑制することを明らかにした。本研究は脳腫瘍幹細胞における BMP シグナルの分化誘導機構の詳細を解明する上で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。