

博士論文 (要約)

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

田邊 諒

博士論文の要約

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ホメオボックス転写因子の発現が BMP シグナルにより誘導されることを見出した。この転写因子の結合部位が *PROM1* 遺伝子のプロモーターP1 領域に予測されたため、クロマチン免疫沈降法により当該転写因子が *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。当該転写因子による *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当該転写因子結合部位を同定した。

当該転写因子には主に 2 つのスプライシングアイソフォーム a および b が存在する。両者はホメオボックスドメインを共有しているが、C 末端側の領域に両者の構造的な違いがある。当該転写因子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。当該転写因子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。当該転写因子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。当該転写因子に対する 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。次に当該転写因子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 によりアイソフォーム b のみをノックダウンした。両アイソフォームをノックダウンした場合と同様に、アイソフォーム b 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、アイソフォーム b 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、当該転写因子のアイソフォームのうち少なくともアイソフォーム b 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。

当該転写因子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。当該転写因子のアイソフォーム a 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 とともに当該転写因子のアイソフォーム b 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、当該転写因子のアイソフォーム a の過剰発現では大きく変化しないのに対して、当該転写因子のアイソフォーム b の過剰発現によって顕著に減少した。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 の腫瘍形成が当該転写因子のアイソフォーム a の過剰発現により促進されたのに対し、当該転写因子のアイソフォーム b の過剰発現により遅延した。この結果により、当該転写因子のアイソフォームのうちアイソフォーム b 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 における当該転写因子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、各 DNA メチル基転移酵素をそれぞれ shRNA でノックダウンした。DNA メチル基転移酵素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、DNA メチル基転移酵素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 DNA メチル基転移酵素が必要であることが示唆された。

当該転写因子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。この相違は当該転写因子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。当該転写因子のアイソフォームのうちアイソフォーム b 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、当該転写因子のアイソフォーム b と DNA メチル基転移酵素が相互作用するかどうかを検証した。共免疫沈降により DNA メチル基転移酵素は当該転写因子のアイソフォームのうちアイソフォーム a と結合しなかった一方でアイソフォーム b と結合することが示唆された。当該転写因子のアイソフォーム b と DNA メチル基転移酵素との相互作用が *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、当該転写因子の過剰発現と同時に DNA メチル基転移酵素のノックダウンをした。当該転写因子のアイソフォーム b の過剰発現による *PROM1* の発現抑制が DNA メチル基転移酵素のノックダウンにより見られなくなった。また、当該転写因子のアイソフォーム b の過剰発現による CD133 陽性率の減少が DNA メチル基転移酵素のノックダウンにより抑制された。これにより、当該転写因子のアイソフォーム b は DNA メチル基転移酵素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当該転写因子のうちアイソフォーム b スプライシングアイソフォームが DNMT3A と相互作用し、*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ことが考えられる。以上より、当該転写因子のアイソフォーム b 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。