

## 論文の内容の要旨

The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in maintaining the stemness of glioma initiating cells

(グリオーマ幹細胞の幹細胞性維持に働くクロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体の解析)

平松 寛明

### 【序論】

グリオブラストーマは代表的な悪性脳腫瘍であるグリオーマの中でも特に悪性度が高く、すべてのがんの中でも非常に予後の悪いがんとして知られている。外科手術や放射線療法、化学療法などを組み合わせた治療が行われているが、現在でもその平均生存期間は診断から約1年程度である。

がんは不均一な細胞集団であり、その中にはがん幹細胞と呼ばれる自己複製能と分化能とを併せ持った細胞が存在すると考えられている。グリオブラストーマにおいてもグリオーマ幹細胞が存在し、再発や転移、治療抵抗性と関わっていると考えられている。グリオーマ幹細胞は超低接着プレートを用いて血清非含有培地中で sphere を形成させて培養することにより、高い造腫瘍活性や幹細胞マーカーの発現等を維持できることが知られている。一方、この細胞をウシ胎児血清 (FBS) 含有培地中で接着培養すると遺伝子発現パターンは大きく変化して、分化が誘導されると共に幹細胞性は消失する。

クロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体は ATP 依存的にヌクレオソームの構造を変化させ、エピジェネティカルな遺伝子発現の制御において極めて大きな役割を担う。この複合体は 10

以上のサブユニットからなり、ATPase 活性を持つ触媒サブユニットとして Brm または BRG1 のいずれか一方を 1 分子ずつ持つことが知られている。さらに、その構成タンパク質は細胞の種類や分化過程に応じて変動することも知られている。

本研究は SWI/SNF 複合体の構成タンパク質やこれらと強い結合性が知られているタンパク質がグリオーマ幹細胞の幹細胞性の維持にどのように関わっているのかを解明し、グリオーマ幹細胞を標的とした治療における新たな分子標的を探索することを目的とした。

## 【方法・結果】

3 種類のヒトグリオーマ幹細胞株 (TGS-01、TGS-04、TGS-05) を使用して、FBS 非含有培地中で超低接着プレートを用いて sphere 培養した細胞と、それぞれを FBS 含有培地中で接着培養した細胞から抽出した RNA サンプルを用い、FBS による分化誘導によって発現の変動する mRNA を qRT-PCR 法により探索した。その結果、*BRG1* を含むいくつかの SWI/SNF 複合体の構成タンパク質や、これと強く結合するタンパク質をコードする遺伝子が幹細胞性の消失に伴い顕著な発現低下を示した。このような遺伝子のうち特に *X* と *Y* に注目した。*BRG1* および *X*、*Y* と幹細胞性との関係を調べるために、*BRG1* および *X*、*Y* に対する shRNA の発現ユニットを搭載したレンチウイルスベクターをグリオーマ幹細胞株 TGS-01 に導入し、shRNA 発現細胞を 1 cell/well で 96 well 超低接着プレートに播種して sphere assay を行い、その sphere 形成率を計測した。その結果、いずれの遺伝子の knockdown によっても sphere 形成活性が著しく減少し、幹細胞性が大きく損なわれることが分かった (図 1)。この減少は各々の shRNA に抵抗性のある cDNA を同時に導入することによって rescue できることから (図 1)、*BRG1* および *X*、*Y* は確かにグリオーマ幹細胞の幹細胞性の維持に関わっていることが示された。*X*、*Y* の knockdown は TGS-04、TGS-05 細胞でも同様に sphere 形成活性を減少させた。また、*X* の過剰発現は *Y* の knockdown による sphere 形成活性の減少も部分的に rescue することができた (図 1)。*X*、*Y* と造腫瘍活性との関係を調べるために、*X* または *Y* を knockdown した細胞を用いてヌードマウスの頭蓋内への移植 (異種同所性移植モデル) を行ったところ、コントロール細胞と比較して劇的な生存率の延長がみられた (図 2)。これら *X*、*Y* が幹細胞性の維持に関わる機構を調べるため、共免疫沈降法によりグリオーマ幹細胞中において結合するタンパク質の探索を行ったところ、SWI/SNF 複合体の構成タンパク質だけでなく、グリオーマ幹細胞の幹細胞性の維持に必須とされるタンパク質を含む別の複合体との結合も確認され、より大きな複合体として働いていることが示唆された。この大きな複合体は proximity ligation assay 法を用いて細胞内でも確かに存在することを確認した。*X* の knockdown は sphere assay において *Y* に対して dominant な効果を示し、ヌードマウスでの異種同所性移植モデルにおいてもより強い効果を示したことから、この大きな複合体中での *X* の役割を調べるために、*X* を knockdown した細胞を用いて proximity ligation assay を行った。その結果、*X* は SWI/SNF 複合体とグリオーマ幹細胞の幹細胞性の維持に必須とされる転写因子およびその共役因子からなる複合体間のアダプターとして機能していることが明らかとなった。

### 【考察・展望】

本研究において新たに発見されたSWI/SNF複合体を含む複数の複合体が形成するより大きな複合体はグリオーマ幹細胞の幹細胞性の維持に必須の役割を持つことが示唆された。また、この複合体形成に重要なアダプタータンパク質であるX、およびYはグリオブラストーマの治療における新たな分子標的となりうることを示された。さらに、この大きな複合体はグリオーマ幹細胞のみでしか存在しないことから、この複合体形成を阻害する戦略はグリオーマ幹細胞をより特異的な標的とした治療法開発において極めて有望であると考えられる。

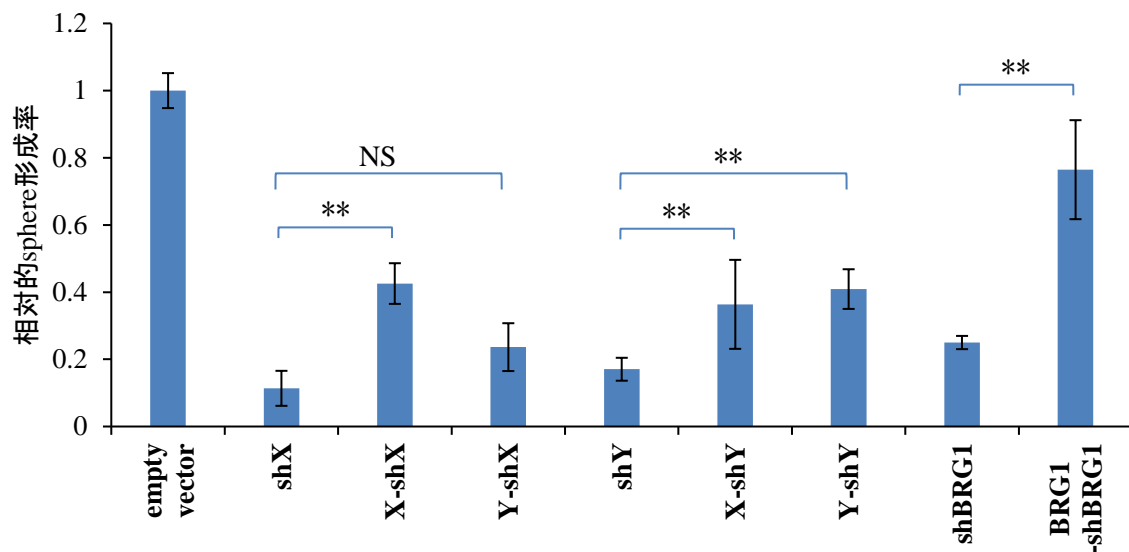


図 1. TGS-01 の X、Y、BRG1 の knockdown 細胞 (shX、shY、shBRG1) や、その rescue 細胞 (X-shX、Y-shX、X-shY、Y-shY、BRG1-shBRG1) での相対的 sphere 形成率。NS = 有意差なし、\*\* $p < 0.01$

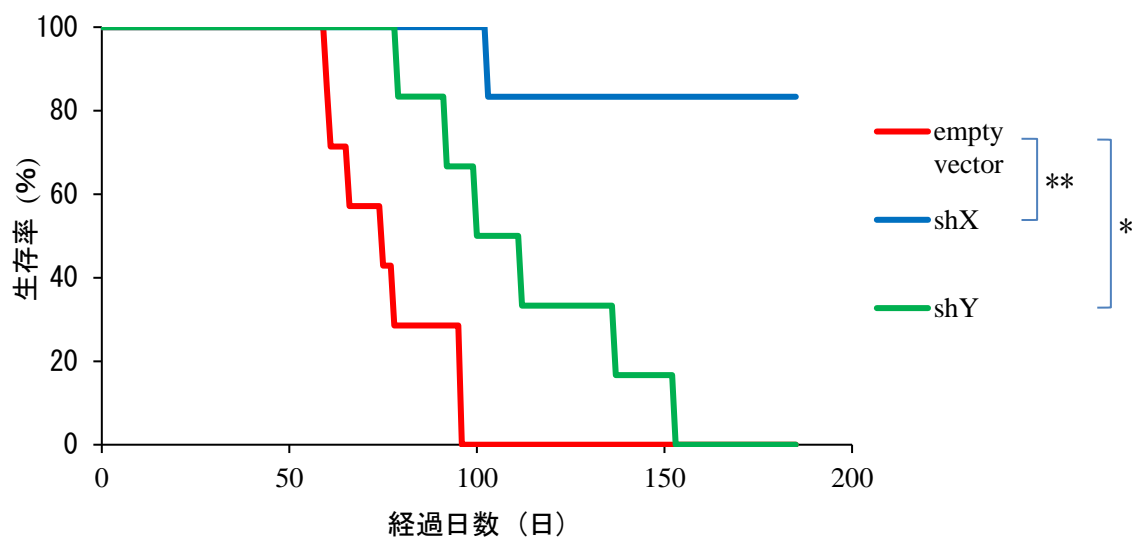


図 2. TGS-01 の X、Y の knockdown 細胞 (shX、shY) を頭蓋内に同所移植したヌードマウスにおける Kaplan-Meier 生存曲線。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$