

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10868

研究課題名(和文) 膠芽腫におけるHDAC7発現の機能的意義の解明と標的療法の確立

研究課題名(英文) Functional significance of HDAC7 expression in glioblastoma

研究代表者

吉本 幸司 (Yoshimoto, Koji)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：70444784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞を用いた解析では、臨床検体での解析同様にHDAC7はmesenchymal typeの腫瘍で悪性化に関与していることが明らかにできた。また細胞内局在の解析では、HDAC7はほとんどは核内に局在しているが、一部は細胞質にも局在していることが分かった。特に強制発現させた腫瘍では、細胞質に分布する割合が増加していた。HDAC7は構造的に核移行シグナルを有しており、核-細胞質間を移動することが報告されているため、HDAC7が核内から細胞質に移動することが、機能的に重要な役割を果たしていることを示唆する結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は集学的な治療を行っても依然完治が難しい疾患である。HDAC7は、膠芽腫が悪性性質を獲得する上で重要な役割を果たしている可能性がある分子として我々が見出したヒストン脱アセチル化酵素である。前述したように、現在ではヒストン脱アセチル化以外のHDAC7の機能も報告されているが、どのような機序で膠芽腫の悪性性質を獲得しているのかは分かっていない。本研究成果により膠芽腫の悪性性質獲得の機序を解明することで、膠芽腫の新たな治療標的を同定できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to elucidate the HDAC7 function in the acquisition of malignant features of GBM. In vitro analysis using glioma initiating cells showed that HDAC7 plays an important role in the acquisition of malignant feature of mesenchymal glioblastoma. In addition, immunofluorescence staining analysis using HDAC7 specific antibody demonstrated that HDAC7 located not only in nucleus but also in the cytoplasm, indicating that HDAC7 shuffle between the nucleus and cytoplasm.

HDAC7 overexpressed glioma cells showed more frequent cytoplasmic location. These results suggest that HDAC7 localization is associated with functional significance.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 HDAC7

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のトランスクリプトーム解析によると、膠芽腫は4つのタイプに分けられるが、間葉系マーカーを強く発現する mesenchymal タイプ、神経発生に関連する遺伝子群が高発現している proneural タイプが代表的なサブタイプと考えられる。mesenchymal タイプは特に aggressive な性格を持ち、再発腫瘍では proneural タイプから mesenchymal タイプに変化していることが多く、間葉系性質(mesenchymal) の獲得が膠芽腫の悪性腫瘍としての形質獲得に関与していると考えられる。これまでの先行研究において、クロマチン修飾遺伝子の中でヒストンのアセチル化を調整する histone deacetylase(HDAC)の中で、HDAC7 の発現が mesenchymal マーカーの発現と有意に相関していることを見出し、臨床検体を持いた蛋白レベルでの解析でもこの相関は有意であることを報告した(Murata, Yoshimoto et al, J Neurooncol 2015)。これらの結果から HDAC7 の機能に着目して、間葉系性質獲得における意義とそのメカニズムを解明するものである。

HDAC はヒストンのアセチル化を調節するヒストン修飾遺伝子であり、主には構造から class I, II, IV に分類され、サブタイプごとの機能が異なっている。HDAC7 は class II に分類され、ヒストンのアセチル化を制御し、遺伝子発現の調節を行う。またシグナル伝達系に参与する非ヒストン蛋白であるさまざまな転写因子(TF)の調節も行うことが知られているが、核移行シグナルを有するため核と細胞質の間を移動することで、細胞内での局在により機能制御されている。

2. 研究の目的

以上の結果から、HDAC7 の機能に着目して、膠芽腫の間葉系性質獲得におけるメカニズムとその意義を解明することを目的とした。

- (1) In vitro の膠芽腫モデルを用いて HDAC7 の発現を解析する。
- (2) In vitro の膠芽腫モデルを用いて HDAC7 の発現を細胞内局在(核または細胞質)とその動態を明らかにする。
- (3) In vitro の膠芽腫モデルを用いて HDAC7 の強発現モデルを作成し、HDAC7 発現の機能的な意義を解析する。

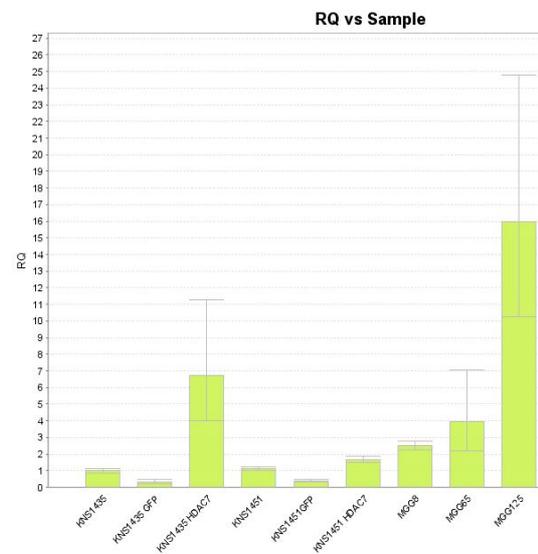
3. 研究の方法

- (1) 膠芽腫患者から摘出された腫瘍細胞の培養細胞株である5つのグリオーマ幹細胞様細胞(KNS1435, KNS1451, MGG8, MGG65, MGG125)について HDAC7 の遺伝子発現を q-PCR 法で解析した。
- (2) HDAC7 の発現制御が幹細胞能にどのような影響を与えるか解析するために、KNS1451 と KNS1435 にそれぞれ HDAC7 を強制発現させた細胞とノックダウンした細胞を作成した。
- (3) KNS1451 と KNS1435 を用いて HDAC7 のノックダウンにより細胞増殖能が変化するかを検討した。
- (4) KNS1435, KNS1451, MGG8, MGG65 と HDAC7 を共発現させた KNS1435HDAC7, KNS1451HDAC7 を用いて HDAC7 の細胞内局在を解析した。

4. 研究成果

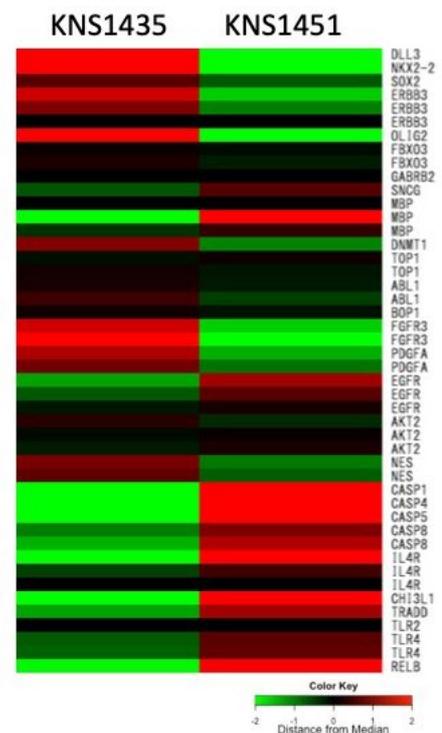
(1) 細胞ごとの HDAC7 の遺伝子発現量の解析結果

KNS1435, KNS1451, MGG8, MGG65, MGG125, KNS1435, HDAC7, KNS1451HDAC7 の HDAC7 を解析したところ MGG 細胞の発現が全体的に高値であった。HDAC7 の強発現細胞については、2-7 倍程度の発現量の上昇を認めた。左に q-PCR 法の結果を示す (縦軸が HDAC7 の発現量)。MGG 細胞では MGG8, MGG65, MGG125 の順に発現量が高く、特にメッセンジャーのレベルでは MGG125 が最も発現が高かった。



(2) HDAC7 の発現抑制による細胞への影響

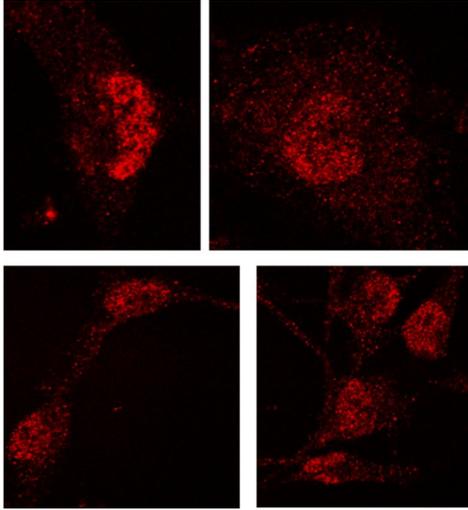
それぞれの幹細胞マーカーである CD44, CD133, Nest in の発現を q-PCR 法で解析した結果、HDAC7 のノックダウンにより KNS1451 において CD133 の発現が著明に低下した。KNS1451 において CD44, Nest in の発現に変化は見られなかった。KNS1435 においては HDAC7 をノックダウンしても CD133, CD44, Nest in の発現に変化は認められなかった。MTT アッセイによる増殖能の解析では、HDAC7 のノックダウンした場合、KNS1451 でのみ増殖能の低下が認められたが、KNS1435 では変化が認められなかった。



以上の結果から、HDAC7 は KNS1451 細胞で腫瘍の悪性化に関与していると考えられた。なお、右図のように KNS1435 と KNS1451 のトランスクリプトーム解析を行うと KNS1435 は proneural type であり、KNS1451 は mesenchymal type であることが分かる。これにより HDAC7 が mesenchymal type について重要な役割を果たしていることが推測される。

(3) HDAC7 の細胞内局在の解析

KNS1435, KNS1451, MGG8, MGG65, KNS1435HDAC7, KNS1451HDAC7 を用いて HDAC7 の特異抗体を用いて細胞内局在を解析した。



KNS1451	KNS1451O/E HDAC7
KNS1435	KNS1435O/E HDAC7

上の図の結果から HDAC7 はほとんどは核内に局在しているが、一部は細胞質にも局在していることが分かった。特に強制発現させた腫瘍では、細胞質に分布する割合が増加していた。実際 HDAC7 は構造的に核移行シグナルを有しており、核-細胞質間を移動することが報告されている。以上のことは HDAC7 が核内から細胞質に移動することが、機能的に重要な役割を果たしていると考えられ、今後はこの点に着目して研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤木 洋二郎 (AKAJI YOJIRO) (10570773)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	空閑 太亮 (KUGA DAISUKE) (40759932)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	西村 中 (NISHIMURA ATARU) (90452755)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	飯原 弘二 (IIHARA KOJI) (90270727)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	