

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09013

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた神経系腫瘍発生機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of neuronal tumorigenesis using mouse models

研究代表者

磯貝 恵理子 (Isogai, Eriko)

千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノムセンター 実験動物研究部・上席研究員

研究者番号：40300917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞の維持と腫瘍形成に関与するMeis1は神経系腫瘍で増幅しており、幹細胞でMeis1が欠損したマウス(KO)では胎生期脳の異常と神経前駆細胞の増殖減少が観察された。胎仔脳の幹細胞でMeis1をKOすると分化に伴う幹細胞の移動の減少が見られた。Meis1を高発現させた神経幹細胞株を免疫不全マウス脳に移植すると脳腫瘍の悪性化が起こった。これに関連する遺伝子を探索するため細胞移植後の腫瘍からRNAを抽出し遺伝子発現解析を実施した結果、脳腫瘍や神経分化に関わる遺伝子が同定された。以上からMeis1の脳の発生と脳腫瘍の悪性化への寄与が示唆され、脳腫瘍発生機構の解明につながる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞の維持と腫瘍形成に関与するMeis1は中枢および末梢神経系の発生に重要な働きをするとともに水頭症の発症に関与している。本研究ではさらにMeis1が脳発生や脳腫瘍の発生及び悪性化に関与することが示唆された。従って、Meis1やその下流の遺伝子が関わるネットワークを明らかにすることで、発症機構が未だ不明な神経芽種、脳腫瘍や先天性水頭症など神経系腫瘍や神経疾患の解明に発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Meis1 that is involved in maintenance of stem cells and tumorigenesis, is amplified in neuronal tumors. In Meis1 knockout mice (KO), abnormal embryonic brain was observed and proliferation of radial glial cells was decreased. When Meis1 was knocked out in neural stem cells of embryonic brain, migration of neural stem cells was impaired during cortical development. Intracranial injection of neural stem cell line overexpressing Meis1 promoted brain tumor malignancy. To search genes that play important roles in the malignant brain tumor, RNA-seq was done using RNA prepared from the tumors developed after intracranial transplantation of cells. Genes that are involved in glioblastoma and neuronal differentiation were identified. These results suggest that Meis1 could play roles in developmental process of brain and brain tumor malignancy and hence the analysis may help elucidate the mechanism of brain tumor development.

研究分野：神経発生、神経系腫瘍を含む神経系疾患

キーワード：マウスモデル 神経系腫瘍 神経発生

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は交感神経系小児固形腫瘍のひとつであり、神経堤細胞の分化過程の異常により生じる。当研究所ではこれまでに、神経芽腫の予後に関連する遺伝子を同定した(Ohira M et al.

図1 Development of hydrocephalus in transgenic mice expressing *Lmo3* and/or *Hen2*

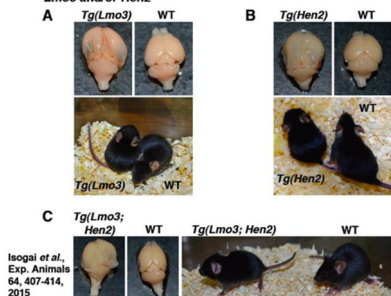
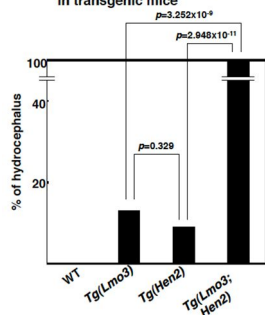


図2 Frequencies of hydrocephalus in transgenic mice



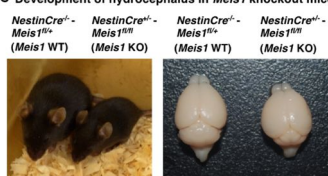
Oncogene, 22:5525-36, 2003)。これらの遺伝子のうち

我々は、神経発生関連遺伝子であるLMO3(LIM-Only protein 3)とHEN2(nescient helix loop helix 2:Nhlh2)が、神経幹細胞、神経発生に重要な働きをするHES1によるMASH1の転写制御に干渉して神経細胞の増殖を亢進させ、神経芽腫の発生と悪性化に関与することを示した(Isogai E. et al., PLoS ONE 6:e19297, 2011)。そこで、これらの生体内での機能を検討するため、*Lmo3*、*Hen2*の各遺伝子

を発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを作製したところ、出生後早期に水頭症が起った(Isogai E. et al., Experimental Animals Vol. 64, No.4, 2015, 図1)。その発生頻度はバックグラウンド系統であるC57BL/6Jマウスの頻度(<0.01%)より高かった(図2)。先天性の水頭症は脳の発生異常で引き起こされる。*Lmo3*、*Hen2*の水頭症Tgマウスでは、大脳皮質と神経幹細胞ニッチであるventricular zone (VZ)の厚みが減少した。非常に似た形質がRobo1/2 ノックアウト(KO)マウスにおいて大脳発生時にVZ progenitorsのHes1発現量が減少した結果

起ることが報告されている。更に、Notch signalingとその下流で発現が誘導されるHes1、このHes1により発現が制御されるMash1は、神経堤細胞や交感神経系の発生のほか、中枢神経においても、神経幹細胞、脳の発生に関与することが知られており、この発生異常は水頭症、glioblastoma、medulloblastoma等の神経疾患につながることを示されている。以上のことから、Hes1 およびそれを取り巻く分子が機能的修飾を受け、交感神経以外に中枢神経系においても正常な神経発生が干渉され発生異常と疾患を引き起こす原因となることが考えられる。一方、我々は、Meis1(myeloid ecotropic insertion site1)が幹細胞の維持および悪性腫瘍の形成に関与することを報告している(Okumura K. et al., PLoS ONE 9:e102111, 2014)。このMeis1は小脳の発生に重要な役割を果たし、神経芽腫細胞やmalignant peripheral nerve sheath tumors、medulloblastomaで増幅している。Meis1により発現が制御されるHes5は、脳の幹細胞で高発現するとgliogenesisを亢進する。更に我々は、*Meis1*を幹細胞でKOしたマウスで水頭症が発症することを観察している(図3)。Meis1やHes1の下流では、p27kipが機能して細胞増殖と生存に関与することも報告されており、Meis1とLmo3、Hen2、Hes1が同様な機構を介して神経系腫瘍の発症に寄与することが予想される。

図3 Development of hydrocephalus in *Meis1* knockout mice



## 2. 研究の目的

本研究所では、神経堤細胞由来の小児交感神経系固形腫瘍である神経芽腫の検体を多数用いた遺伝子プロファイル解析により、神経芽腫発生・増悪に関わる複数の遺伝子群の同定と解析

について報告した(Ohira M & Nakagawara A, Cancer Sci, 2010; Chen Y et al., Nature 455:971-4, 2008他)。これらの遺伝子ライブラリーの中にはALSの原因となるSOD1を修飾するNEDL1、neurite outgrowth を調節するNogoファミリーなど中枢神経系疾患に関わるものが多く発現しており、分子機構を共有していることが強く示唆される。LMO3やHEN2も中枢および末梢神経系の発生に重要な働きをするNotch signalingのHES1と結合して、神経細胞増殖に対するHES1の機能を修飾し、*Lmo3-Tg*、*Hen2-Tg*マウスでは水頭症が発症する。一方、*Meis1*もまたNotch signalingに関与して中枢および末梢神経系の発生に重要な働きをするとともに水頭症の発症に関与している。従って、これらの遺伝子が関わるネットワークを明らかにすることで、発症機構が未だ不明な神経芽種、脳腫瘍や先天性水頭症など神経系腫瘍や神経疾患の解明に発展することが期待される。

### 3．研究の方法

(1) これまでに、間脳中脳後脳、神経管背側と神経管から遊走してくる神経堤細胞に発現する*Wnt1* promoter/enhancer (Joseph NM et al, 2004; Echelard Y et al, 1994) 下で*HA-Lmo3*または*FLAG-Hen2*を発現させたTgマウスを作製した。これらのマウスでは出生後早期に水頭症が発生する。抹消および中枢神経の幹細胞に発現している*Nestin*のpromoter下でCre recombinaseを発現させたTgマウス(*Nestin-Cre*マウス)と、*Meis1*のfloxマウスを使って、幹細胞特異的に*Meis1*をKOしたマウスを作製した。これらのマウスでも出生後早期に水頭症が生じた。形質がみられたマウスは、脳について形態を検討し、免疫染色法などにより関連遺伝子の発現と増殖・分化との関連性を解析した。胎生期、新生仔マウスでは経時的に、脳の増殖・分化・細胞死について検討した。増殖についてはBrdUの取り込みの他、増殖細胞のマーカーKi67、分化については神経細胞のマーカーNeuN、グリア細胞のマーカーglial fibrillary acidic protein (GFAP)、細胞死についてはCleaved Caspase3を免疫染色で検出した。特に胎生期の脳については、構造、幹細胞、前駆細胞、神経細胞について、マーカー分子(*Pax6*、*Tbr2*、*NeuroD2*等)を免疫染色を用いて経時的に解析した。

(2) 胎仔脳室へのin utero electroporation法により、*Meis1*を脳の幹細胞でKOし、大脳皮質発生課程における神経細胞の分化に伴う細胞移動への効果を検討した。

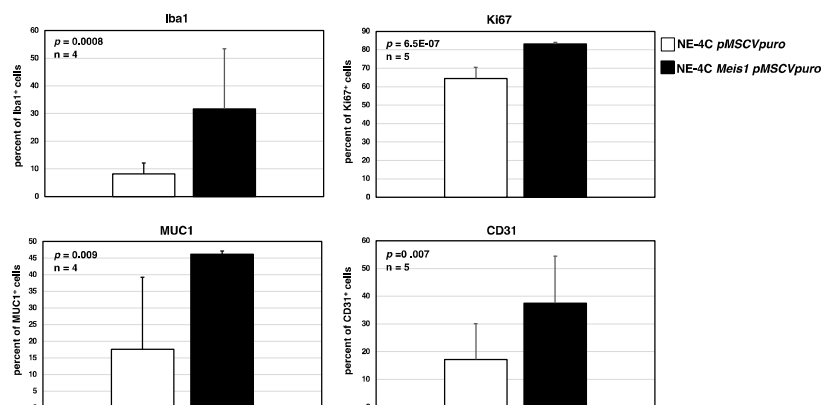
(3) *Meis1*を高発現させたマウス神経前駆細胞を免疫不全マウスの体幹部皮下あるいは大脳に移植し腫瘍形成への効果を検討した。関連する遺伝子を探索するため、細胞移植後に腫瘍が形成された脳からRNAを抽出して遺伝子発現解析を行い、*Meis1*高発現株移植脳腫瘍とコントロール細胞株移植脳腫瘍で比較検討した。

### 4．研究成果

幹細胞で *Meis1* をノックアウトしたマウスでは、大脳皮質の厚みの減少が観察され、胎生期 E18.5 において大脳皮質の異常が生じていた。神経発生が進行している E14.5 では野生型 (WT) と比較して radial glial cells が KO で有意に減少していた。intermediate progenitors と神経細胞には有意差がなかった。そこで E14.5 で大脳皮質への BrdU の取り込みを検討したところ、KO では有意に減少し細胞増殖能の異常が考えられた。大脳皮質の異常が発生過程における細胞のアポトーシスにより起こっている可能性もあるので、cleaved caspase3 抗体による免疫染色

により細胞死を検討したが有意差はなかった。従って *Meis1* KO では radial glial cells の増殖能が低下し、神経発生の異常が生じると考えられた。E13.5 に *in utero* electroporation 法により脳の神経幹細胞で *Meis1* を KO し、神経幹細胞から神経細胞に分化する過程で起こる細胞の移動を E15.5 まで追跡したところ、有意な移動度の減少が *Meis1* の KO で観察され、大脳皮質の発生過程における神経幹細胞の分化を伴う移動に *Meis1* が関連する事が示唆された。*Meis1* は正常発生と腫瘍発生に関わる遺伝子であることから、大脳における腫瘍形成への関連性を検討するため、*Meis1* 高発現マウス神経前駆細胞株 NE-4C を、免疫不全マウスの脳に移植し腫瘍形成への効果をコントロール細胞と比較して観察し、*Meis1* と脳腫瘍の関連性について検討した。増殖細胞 (Ki67) 、macrophage/microglia (Iba1) 、endothelial cell (CD31) 、Epithelial Membrane Antigen (MUC1) 、幹細胞 (Nestin) 、神経上皮性腫瘍 (Vimentin) について免疫染色を行ったところ、*Meis1* 高発現細胞移植後の腫瘍では、増殖細胞、macrophage/microglia、CD31 陽性血管内皮細胞、Epithelial Membrane Antigen 陽性悪性腫瘍細胞が有意に増加していた (図4) 。同じ細胞株を皮下に移植し5週間腫瘍の大きさを測定した結果、脳内への移植とは逆にコントロール細胞で *Meis1* 高発現細胞と比較して有意に腫瘍体積の増加が観察された。同様に *in vitro* における細胞増殖能はコントロール細胞で *Meis1* 高発現細胞と比較して有意に高かった。従って、*Meis1* は脳内において macrophage/microglia の遊走、血管新生、腫瘍の増殖、悪性化に關与している事が示唆された。どのような分子が脳内で機能して悪性腫瘍を形成するか検討するために、*Meis1* 高発現株あるいはコントロール細胞株移植脳腫瘍から RNA を抽出し、RNA-Seq、リアルタイム PCR により遺伝子発現解析を実施した。その結果候補遺伝子として DNA methyltransferase 3b (Dnmt3b)、Wnt7a の関与が示唆された。Dnmt3b は悪制度の高い glioblastoma での高発現が報告されている。更に Wnt7a は神経分化に寄与する。以上の事から、大脳発生に関わる *Meis1* が脳腫瘍発生に關与することが示唆された。これら遺伝子が關与する脳腫瘍悪性化機構の解析は難治性脳腫瘍の発症機構解明にもつながると考えられる。

図4 *Meis1* is involved in invasion of microglia, proliferation, malignancy and angiogenesis in the brain tumor formed after intracranial transplantation of mouse neural stem cells



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, Eriko Isogai, Yuichi Wakabayashi	4. 巻 13
2. 論文標題 The Japanese Wild-Derived Inbred Mouse Strain, MSM/Ms in Cancer Research.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1026 -1039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13051026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Megumi Saito, Naoko Kagawa, Kazuhiro Okumura, Haruka Munakata, Eriko Isogai, Tatsuo Fukagawa, Yuichi Wakabayashi	4. 巻 111
2. 論文標題 CENP-50 is required for papilloma development in the two-stage skin carcinogenesis model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2850-2860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, Yasuhiro Yoshizawa, Yuki Ito, Eriko Isogai, Kimi Araki, Yuichi Wakabayashi	4. 巻 39
2. 論文標題 Pak1 maintains epidermal stem cells by regulating Langerhans cells and is required for skin carcinogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4756 - 4769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-1323-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Saito Megumi, Okumura Kazuhiro, Isogai Eriko, Araki Kimi, Tanikawa Chizu, Matsuda Koichi, Kamiyo Takehiko, Kominami Ryo, Wakabayashi Yuichi	4. 巻 139
2. 論文標題 A Polymorphic Variant in p19Arf Confers Resistance to Chemically Induced Skin Tumors by Activating the p53 Pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1459-1469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.12.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eriko Isogai, Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, Yurika Tokunaga and Yuichi Wakabayashi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Meis1 plays roles in cortical development through regulation of cellular proliferative capacity in the embryonic cerebrum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, Eriko Isogai, Yurika Tokunaga, Yoshinori Hasegawa, Kimi Araki, Yuichi Wakabayashi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Functional Polymorphism in Pak1-3' Untranslated Region Alters Skin Tumor Susceptibility by Alternative Polyadenylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2022.02.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、荒木 喜美、若林雄一
2. 発表標題 マウス系統間のPak1-3' UTRのSNPsは発現減少と腫瘍抑制に関連する
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、荒木 喜美、若林雄一
2. 発表標題 順遺伝学に基づくMSMマウスの発がん抵抗性の解明
3. 学会等名 第34回発癌病理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、若林雄一
2. 発表標題 日本産野生由来近交系マウスMSMを用いた皮膚がん修飾因子の同定
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯貝恵理子、奥村和弘、斎藤慈、吉澤康博、田村優希、若林雄一
2. 発表標題 Meis1の脳皮質発生への関連性の検討
3. 学会等名 第32回モロシヌス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Megumi Saito, Kazuhiko Okumura, Eriko Isogai, Kimi Araki, Yuichi Wakabayashi
2. 発表標題 The genetic polymorphism in p19Arf confers resistance to tumor progression.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiko Okumura, Megumi Saito, Eriko Isogai, Kimi Araki, Yuichi Wakabayashi
2. 発表標題 Identification of responsible genes for Stmm1a locus conferring resistance to early-stage chemically induced skin tumors.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤慈、奥村和弘、磯貝恵理子、荒木喜美、若林雄一
2. 発表標題 がん抑制遺伝子p19Arfに存在する非同義置換多型の腫瘍悪性化における役割
3. 学会等名 第31回モロシヌス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥村和弘、齋藤慈、磯貝恵理子、若林雄一
2. 発表標題 副甲状腺ホルモンPTHの腫瘍増殖抑制効果
3. 学会等名 第27回癌病態治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤慈、奥村和弘、磯貝恵理子、若林雄一
2. 発表標題 がん抑制遺伝子p19Arfに存在する非同義置換多型の機能解析
3. 学会等名 第27回癌病態治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥村和弘、齋藤慈、磯貝恵理子、三浦郁生、若菜茂晴、山口碧、設楽浩志、多屋長治、木南凌、若林雄一
2. 発表標題 順遺伝学的手法により明らかとなったマウス副甲状腺ホルモンの腫瘍抑制効果
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 齋藤慈、奥村和弘、磯貝恵理子、若林雄一
2. 発表標題 がん抑制遺伝子p19Arfに存在する非同義置換多型の機能解析
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/index.html">http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/index.html</a>
---

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	若林 雄一  (Wakabayashi Yuichi)  (40303119)	千葉県がんセンター(研究所)・がんゲノムセンター 実験動物研究部・部長    (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------