

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09486

研究課題名（和文）転写因子EVI1によるマルチキナーゼ発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of multikinase expression regulation by transcription factor EVI1

研究代表者

水口 麻子（Mizuguchi, Asako）

宮崎大学・安全衛生保健センター・講師

研究者番号：00647472

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）：本研究において、転写因子EVI1が高発現している悪性神経膠芽腫症例では、予後が悪化することを示した。次に、悪性神経膠芽腫培養細胞を用いた実験において、EVI1がEGFRの転写制御を行っていること、また、その細胞増殖速度に影響を与えることを示した。さらに、EGFRのプロモーター領域のTC-richな配列が、EVI1によるEGFRの転写制御で重要となることを示した。悪性神経膠芽腫培養細胞においてEVI1がEGFRの発現制御を行っていることを報告したのは、本研究が初めてである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性固形腫瘍におけるEVI1の機能について調べられた研究報告は少なく、特に、悪性神経膠腫では稀である。また、本研究で解析したEGFRは、多くの悪性固形腫瘍において治療標的とみなされている重要分子である。EGFRそのものをターゲットとする薬剤は既に存在し臨床応用されているものも複数存在する。しかし、EVI1を新たなターゲットとすることで、既存の薬剤とは異なる作用機序により、EGFR下流のシグナル伝達経路を抑制することが期待される。つまり、本研究の意義は、EVI1が悪性腫瘍の化学療法における新規分子標的となりうることを示した点である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we introduced the high tissue expression of EVI1 in patients with GBM might relate to poor prognosis. Next, we demonstrated that EVI1 regulated EGFR transcription and affected the proliferation of GBM cells. Further, we found that both TC-rich stretches in the EGFR promoter were essential for the EVI1 regulation of EGFR transcription. In this study, we first reported that EVI1 regulated EGFR transcription in GBM cells.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：EVI1 転写因子 グリオーマ 受容体型チロシンキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠芽腫は5年生存率約10%の予後不良な原発性悪性脳腫瘍で、原発性悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高い。新規治療法の開発が急務であり、分子生物学的な特徴に関する解明は治療法開発に必要不可欠である。epidermal growth factor receptor (EGFR)、platelet derived growth factor receptor (PDGFR) の高発現は、悪性神経膠腫における代表的な遺伝子異常であり、また、近年 vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) に対する分子標的薬が、悪性神経膠腫の再発症例に対して臨床で使用されている。EGFR、PDGFR、VEGFR は、受容体型チロシンキナーゼ (RTK) に分類される膜蛋白質である。腫瘍細胞内において RTK はリン酸化カスケード反応を引き起こし、下流の PI3K-Akt-mTOR 経路を活性化する。腫瘍細胞の生存・増殖・浸潤はこの異常なシグナル伝達に依存する為、RTK 阻害によって強い抗腫瘍効果が得られると期待された。しかしながら、悪性神経膠腫患者における抗 RTK 特異抗体薬の臨床試験では、その効果は限定的且つ薬剤耐性を示す結果が多かった。当初、薬剤耐性は標的 RTK に積み重なるゲノム変異に伴う薬剤結合性低下や薬物排出トランスポーターの発現上昇に起因すると考えられた。しかし近年の研究報告で、RTK 単独阻害に伴い、別の RTK 発現量が代償的に増加し、腫瘍細胞増殖能を保とうとする現象も、その一因である事が明らかとなった。(Akhavan, Pourzia et al. 2013, Camorani, Crescenzi et al. 2015) この結果から、抗 RTK 特異抗体薬に対する薬剤耐性獲得の背後に、複数の RTK 発現制御に関わる、より上位の RTK 発現調整機構の存在が示唆された。

## 2. 研究の目的

我々はこの RTK 発現調整上位機構を制御する分子があると考え、本研究では Ecotropic viral integration site-1 (EVI1) に着目した。EVI1 は zinc finger 型転写因子の構造を有しており、白血病の悪性転化、予後増悪をもたらす重要な原因遺伝子のひとつである。研究開始当初、悪性神経膠腫と EVI1 に着目した論文報告は未だ2例と稀であったが、後頭蓋窩上衣腫および悪性神経膠芽腫において EVI1 が高発現していること、生命予後の悪化と関与することが報告されていた。(Koos B *et al.* Clin Cancer Res 2011, Hou *et al.*, Oncotarget 2016) また、我々の研究室では EVI1 に着目して研究を続けており、EVI1 が悪性神経膠芽腫培養細胞において、複数の RTK 発現と関連するという知見を得ていた。そのため、本研究では、悪性神経膠腫における EVI1 の RTK 発現制御機構について解明を目指すこととした。さらに、Chapeau らによる報告(Bard-Chapeau EA *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2012)において、EVI1 が EGFR の発現制御に関与している可能性が示唆されていたことから、RTK の中でも特に EGFR に重点を置いて、EVI1 による発現制御につき解析することとした。

## 3. 研究の方法

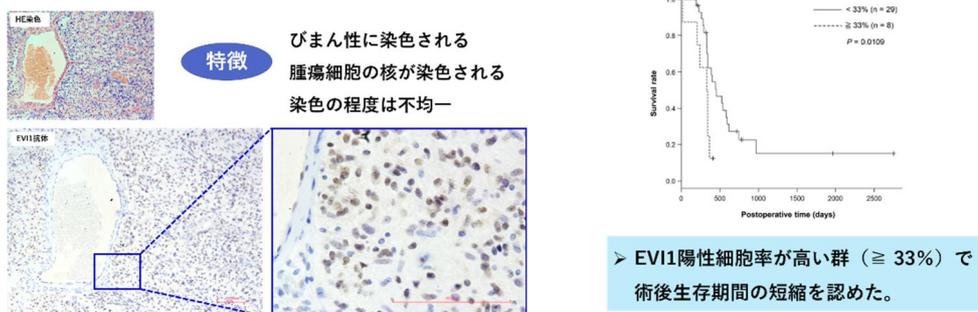
(1) GEO (Gene Expression omnibus; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) より悪性神経膠芽腫

のデータを引用して、EVI1 と EGFR の mRNA 発現量の相関関係の有無を調べた。(2)悪性神経膠腫の臨床サンプルより得た病理組織切片を用いて、抗 EVI1 抗体による免疫組織学的染色を実施し、予後との関連について解析した。(3)悪性神経膠芽腫培養細胞を用いて、siRNA による EVI1 ノックダウン実験を行い、EGFR の発現変動を解析した。(4)EGFR のプロモーターアッセイを行い、EVI1 による EGFR 転写制御において重要な領域を解析した。(5)細胞増殖アッセイにより、EVI-1 が悪性神経膠芽腫培養細胞の表現型に与える影響を調べた。

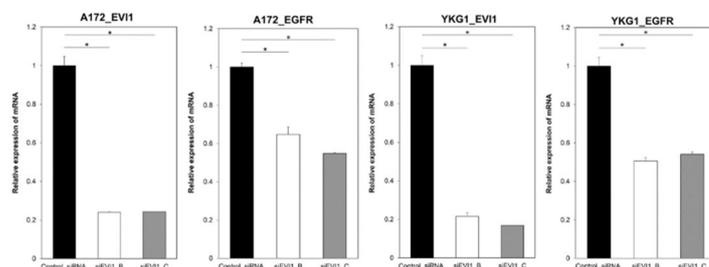
#### 4 . 研究成果

(1)GEO のデータベースから悪性神経膠芽腫に関する 4 シリーズ ( GSE2223, GSE4271, GSE23806, GSE43378 ) のデータをダウンロードし、EVI1 と EGFR の mRNA 発現量につき解析した。その結果、両者は正の相関関係を示した。( GSE2223;  $r = 0.429-0.51$ , GSE4271;  $r = 0.379-0.462$ , GSE 23806 ;  $r = 0.445-0.606$ , GSE43378 ;  $r = 0.461-0.551$ )

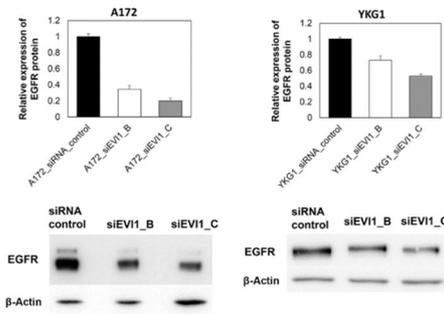
(2)悪性神経膠腫患者を低悪性度群 ( n=27 ) および悪性神経膠芽腫群 ( n=37 ) の 2 群に分け、各群の病理組織切片を抗 EVI-1 抗体で免疫組織染色した。その結果、悪性神経膠芽腫群の 22% ( n=8 ) で抗 EVI-1 抗体陽性細胞率が 33%以上を示した。一方、低悪性度群において抗 EVI-1 抗体陽性細胞率が 33%以上を示した症例はなかった。この 33%をカットオフ値とし、悪性神経膠芽腫患者の術後生存期間を log-rank 検定を用いて解析したところ、抗 EVI-1 抗体陽性率 33%以上の群 ( n=8 ) で、術後生存期間の短縮を認めた。( EVI1 陽性細胞率 33%の群で 1 年生存率 12.5%に対し、33%未満の群では 62.2%)



(3)悪性神経膠芽腫培養細胞 ( A172 および YKG1 ) を用いて、siRNA による EVI-1 ノックダウンを行った。その結果、EVI-1 mRNA の減少に伴い、EGFR の発現量は減少した。

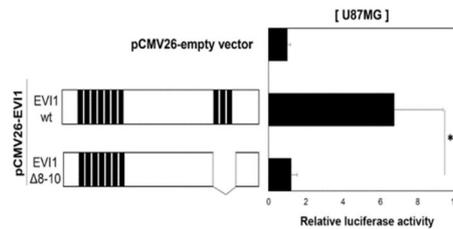
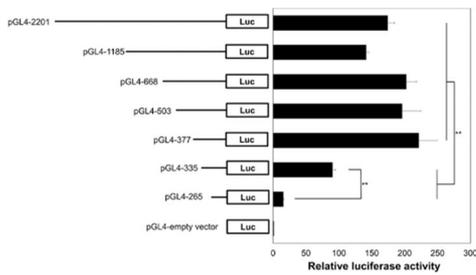


➤ EVI1ノックダウンに伴い、EGFR\_mRNAの発現は抑制された



➤ EVI1ノックダウンに伴い、EGFR\_proteinの発現は抑制された

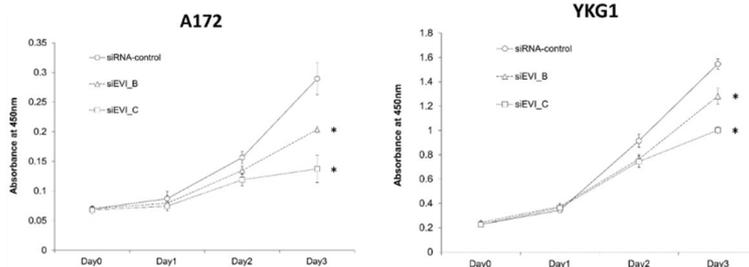
(4)EVI-1 による EGFR 転写制御の際、EGFR プロモーター領域のどの部位が重要であるかを調べる為、悪性神経膠芽腫培養細胞を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、EGFR の翻訳開始点よりも 377bp ~ 266bp 上流部位における 2 か所のポリピリミジン配列 (general motif; TCCTCCTCC) が重要である事、EVI-1 の C 末端側 DNA 結合領域が重要である事が示された。



➤ EGFRプロモーター領域では、ATGの上流377bpまでが特に重要な領域

➤ EVI1によるEGFR転写制御ではC末端側DNA結合ドメインが重要

(5)EVI-1 が悪性神経膠芽腫培養細胞の表現型に与える影響を調べる為、A172 および YKG1 を用いて、細胞増殖アッセイを行った。その結果、EVI-1 ノックダウン群において、細胞増殖速度の低下を認めた。



➤ EVI1ノックダウンによって、細胞増殖速度は低下する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asako Mizuguchi, Shinji Yamashita, Kiyotaka Yokogami, Kazuhiro Morishita, Hideo Takeshima	4. 巻 145
2. 論文標題 Ecotropic Viral Integration Site 1 Regulates EGFR Transcription in Glioblastoma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-oncology	6. 最初と最後の頁 223-231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-019-03310-z. Epub 2019 Oct 15.	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 -

〔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	横上 聖貴 (Yokogami Kiyotaka) (40284856)	宮崎大学・医学部・准教授  (17601)	
研究分担者	山下 真治 (Yamashita Shinji) (40468046)	宮崎大学・医学部・助教  (17601)	
研究分担者	渡邊 孝 (Watanabe Takashi) (90573337)	宮崎大学・医学部・講師  (17601)	

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
---------	---------