

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790347

研究課題名（和文） 神経分化破綻による脳腫瘍発生機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of brain tumor development by neuronal differentiation fail

研究代表者

柴崎 晶彦（SHIBAZAKI MASAHIKO）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：20445109

研究成果の概要（和文）：

(1) 腫瘍発生機構の初期段階における REST の役割を解析するために、その活性化指標として β III-tubulin の発現を用いた。 β III-tubulin は通常は神経細胞特異的であるが、非神経系細胞においても細胞周期依存的に発現の増減が見られることを見出した。細胞周期を同調した細胞を用いた解析の結果、mRNA レベルでは G2/M 期に β III-tubulin の mRNA の蓄積が見られること、クロマチンレベルでの機構であることが明らかとなった。細胞周期依存的に β III-tubulin プロモーター領域に REST がスイッチングすることで制御している可能性が示唆された。

(2) Nucleus accumbens associated 1, NACC-1 は BEN/POZ ドメインを持つ脳神経特異的転写抑制因子の一種であり、幾つかの腫瘍での高発現が予後の不良と関連することが示されている。しかし腫瘍形質における詳細な機構は不明である。一方、HDAC6 は細胞質に存在し、チューブリンの脱アセチル化に関与する因子であり腫瘍の転移能と関連する。NACC-1 は HDAC6 の機能調節を介して細胞運動能、浸潤能に関与することを示した。

(3) microRNA は 50nt 以下の短い安定な非翻訳 RNA の一種であり、生体中には数千種類もの分子種がある。その多くは、標的 mRNA の 3'UTR 部位に特異的に相補結合し翻訳抑制する。microRNA-211 が神経堤細胞腫瘍において減少していること、microRNA-211 の標的として PRAME (Preferentially expressed antigen of melanoma) の可能性があることを示した。

以上の機構の破綻が、脳腫瘍を初めとした各種腫瘍のイニシエーターになっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

(1) The expression of β III-tubulin is generally restricted to neurons, but its mRNA is often expressed at a low level in non-neuronal cells. Here, we present evidence that β III-tubulin expression occurs in a cell cycle-dependent manner. Both mRNA and protein of β III-tubulin accumulated around the G2/M stage of the cell cycle. Furthermore, the cell cycle-dependent expression of β III-tubulin was mediated by the neural-restrictive silencing factor NRSF/REST through its binding to the NRSE/RE-1 element that is present in the first intron of the β III-tubulin gene. These results demonstrate a novel role of β III-tubulin in cell cycle progression in tumor cells.

(2) Post-transcriptional acetylation-modification of cortactin (CTTN) via the nucleus accumbens-associated 1 (NACC1)-histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylation system were investigated. The acetylation status of CTTN modulated by the NACC1-HDAC6 deacetylation system induces acceleration of cell migration activity via an actin-dependent cellular process, possibly contributing to aggressive behavior (invasion/metastasis) of the tumor cells.

(3) MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs whose aberrations are involved in the initiation and progression of human cancers. We focused on one commonly downregulated miRNA (miR-211), and analyzed its relationship to the expression of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) protein, which is a potential target of miR-211. These results suggest that downregulation of miR-211 may be partly involved in aberrant expression of the PRAME protein in melanoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理

1. 研究開始当初の背景

正常な神経分化では、数万のトランスクリプトームの中からジェネティック/エピジェネティックな機構を利用し、特定の遺伝子セットを発現することで、時間的・空間的に厳密かつ正確な分化制御がなされている。一方、多くの脳腫瘍は神経幹細胞由来の未分化細胞であり、膠芽腫や髄芽腫はその端的な例といえる。すなわち自律性増殖と並び、未分化状態の維持はがん細胞の生物学的特性にいい関与しており、無秩序な幹細胞状態の維持は腫瘍化の原因の一つと考えられる。未分化腫瘍の特徴として高増殖・高浸潤能が挙げられ、一般に悪性度が高く予後不良である。幾つかの腫瘍では、このような分化制御の職段階が破綻した結果、未分化腫瘍に形質転換している可能性がある。

(1) RESTの腫瘍への関与について

REST (Repressor Element-1 silencing transcription factor)は神経特異的遺伝子群の発現を抑制する因子であり、神経分化に伴ってユビキチン化により消失することが知られている。RESTの標的遺伝子として神経特異的チューブリンβIII-tubulinがあり、これはPaclitacel等の抗がん剤耐性との関連が示唆されている。また、RESTの安定性を制御するユビキチンリガーゼβ-TrCPは細胞周期制御との関連が知られている。さらにβ-TrCPの基質としてRESTの他、腫瘍形質に強く関連するβ-cateninやc-myc等も知られている。

以上からRESTの存在状態を制御する経路に何らかの破綻があった場合、神経幹細胞状態が維持され、腫瘍化に繋がる可能性、さらにはβIII-tubulinによる抗がん剤の耐性獲得に繋がる可能性が想定された。

(2) NACC-1の腫瘍への関与について

Nucleus accumbens associated 1, NACC-1はBEN/POZドメインを持つ脳神経特異的転写抑制因子の一種であり、幾つかの腫瘍で

の高発現が予後の不良と関連することが示されている。しかし腫瘍形質における詳細な機構は不明である。一方、HDAC6は細胞質に存在し、チューブリンの脱アセチル化に関与する因子であり腫瘍の転移能との関連が示唆されている。本研究室ではこれまでにNACC-1は細胞質にも存在すること、またHDAC6と一部局在することを確認している。すなわちNACC-1はHDAC6の機能調節に関与している可能性が示唆されている。

以上から、転写抑制因子として作用するとされるNACC-1が細胞質において新規の機能を持つ可能性が想定された。

(3)腫瘍特異的microRNAの検索について
microRNAは50nt以下の短い安定な非翻訳RNAの一種であり、生体中には数千種類もの分子種あると言われている。その多くは、標的mRNAの3'UTR部位に特異的に相補結合し、翻訳抑制する。

以上から、腫瘍特異的なmicroRNAとその標的遺伝子を同定することは、治療の標的になり得ると想定した。

2. 研究の目的

本研究では、神経幹細胞の分化異常と腫瘍化の関係を検討するにあたり、(1)神経分化抑制因子REST、さらには(2)神経特異的転写抑制因子NACC-1の安定性制御と、その破綻が腫瘍化に繋がる可能性、さらに(3)腫瘍形質に関連するmicroRNAについて基礎的な検討を行う。以上の経路が脳腫瘍をはじめとした幾つかの腫瘍の治療標的となり得るか知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではおもに培養細胞株を用い、以下の手法を用い解析を行った。

ヒト培養細胞株

HeLa, HEK293, HMVI, HMVII細胞株を

D'MEM 培地、10%FBS 存在下にて培養した。
遺伝子導入法

Lipofectamin 法にて行った。

細胞周期同調法

各細胞株を Aphidicolin(2 μ g/ml)もしくは Hydroxyurea (2mM)で 24 時間処理し S 期に同調後、通常培地にて経時的変化を検討した。また、Monastrol (100 μ M)もしくは Nocodazole (50ng/ml)で 16 時間処理し M 期に同調後、通常培地にて経時的変化を検討した。

定量PCR

TaqMan プローブを用い、ABI7500 システムにて定量 PCR を行った。

ウエスタン法

RIPA バッファーもしくは細胞核抽出バッファーでタンパク質を抽出後、SDS-PAGE ゲルにて泳動し、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンはブロッキング後抗体反応をし、化学発光法にて検出した。

フローサイトメーター

細胞を CycleTEST™Plus キットで染色処理後、FACSCaliberにて測定した。

免疫組織染色

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.2%TritonX-100 で処理した。その後 5%FCS でブロック処理し、抗体反応後 Alexa 試薬で蛍光標識した。

クロマチン免疫沈降法

細胞をホルムアルデヒドで固定後、Luo らの方法に従って行った (Luo et al., Cell 92:463-473, 1998)。

4. 研究成果

(1) REST の腫瘍への関与について

①細胞周期依存的な REST 標的遺伝子の発現変動

細胞周期を同調した培養細胞株で REST 標的遺伝子の一種であり、抗がん剤である paclitacel への耐性に関与する β III-tubulin の発現変動が認められた。また、monastrol により M 期に同調した細胞において β III-tubulin のタンパク質レベルでの蓄積が確認された。

②REST 標的遺伝子のエピジェネティックな制御

REST は CoREST を介しクロマチン修飾因子の一種である HDAC1/2 と相互作用することで、遺伝子の発現抑制に関与することが知られている。TSA により HDAC1/2 を抑制することにより REST 標的遺伝子である β III-tubulin の発現が上昇すること、また REST と CoREST が相互作用する C 末端側を欠損した dominant negative により REST 標的遺伝子が増加することから上記でみられた細胞周期依存的な REST 標的遺伝子の

発現変動はクロマチンレベルでの機構であることが確認された。

③クロマチンレベルでの細胞周期依存的な REST のスイッチング

REST の標的遺伝子プロモーター上での相互作用を ChIP アッセイ法を用い検討した。REST 標的遺伝子である β III-tubulin のプロモーター上には REST の認識配列(RE-1 配列)が存在し、ヒト、マウス、ラットで高度に保存されている。その領域には REST が存在することを確認したうえで (図 3 B), 細胞周期を同調し、その存在量を定量 PCR 法で検討した。その結果、 β III-tubulin プロモーター上の REST の存在量はおもに M 期において最少になることが明らかとなった。

④REST と β -catenin 系の相関

REST の安定性を制御するユビキチンリガーゼ β -TrCP は細胞周期制御との関連が知られている。さらに β -TrCP の基質として REST の他、腫瘍形質に強く関連する β -catenin も知られている。本研究においても図 4 に示すとおり、REST と β -catenin のタンパク質レベルでの存在量について相関が示唆されている。

以上から、Wnt-catenin 経路への REST 制御系の関与の可能性と腫瘍化との強い関連が示唆されている段階である。今後、 β -TrCP の活性も含めた REST の存在制御機構を示す研究を行う予定である。

(2) NACC-1 の腫瘍への関与について

①NACC-1 の細胞運動、浸潤能への関与

NACC-1 のノックダウンにより細胞運動能、浸潤能がともに低下することを見出した。

②NACC1-HDAC6 系による Cortactin の脱アセチル化制御

Cortactin(CTTN)はアクチン系ストレスファイバーを中心とした足場形成タンパク質群の一種であり細胞運動能に関与する。HDAC6はCTTNを脱アセチル化することで細胞接着の程度を制御している。NACC-1はCTTNさらにはHDAC6と相互作用していることが確認された。

以上から、NACC-1はHDAC6と相互作用しその脱アセチル化活性を制御しており、すなわちHDAC6の標的タンパク質であるCTTNの活性制御にも繋がっていることが示された。本来、NACC-1神経特異的転写抑制因子として知られているが、新たな機能を示す知見である。

(3) 腫瘍特異的 microRNA について

①microRNA-211 が神経堤細胞腫瘍において減少していることを見出した。

②microRNA-211 の標的として PRAME (Preferentially expressed antigen of melanoma)であること、microRNA-211 の強制発現により PRAME のタンパク質レベルでの発現量が減少することを確認した。

以上から microRNA-211 は神経堤細胞由来の腫瘍で特異的高発現が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Ishikawa Y, Tsunoda K, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. **Int J Oncol.**, 2012, *in press*. 査読有
- (2) Shibazaki M, Maesawa C, Akasaka K, Kasai S, Yasuhira S, Kanno K, Nakayama I, Sugiyama T, Wakabayashi G, Masuda T, Mori N. **Int J Oncol.**, 2012, 40: 695-702. 査読有
- (3) Kakizawa S, Shibazaki M, Mori N. **Neurobiol Aging.**, 2012, 33: 535-545. 査読有
- (4) Sakurai E, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Oikawa H, Sato M, Tsunoda K, Ishikawa Y, Watanabe A, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T. **Int J Oncol.** 2011, 39: 665-672. 査読有
- (5) Tsunoda K, Oikawa H, Tada H, Tatemichi Y, Muraoka S, Miura S, Shibazaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. **J Invest Dermatol.**, 2011, 131: 1710-1719. 査読有
- (6) Ebina M, Shibazaki M, Kudo K, Kasai S, Kikuchi H. **Biochem Biophys Acta.**, 2011, 1809: 176-183. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

前沢千早、柴崎晶彦、安平進士、葛西秋宅
日本分子生物学会総会 3P-0561, 2011, 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴崎 晶彦 (SHIBAZAKI MASAHIKO)

研究者番号 : 20445109

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :