

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07115

研究課題名(和文) MIFによる神経幹細胞制御機構の統合的理解

研究課題名(英文) Integrated analysis to understand the regulatory mechanism of neural stem cells by MIF

研究代表者

大多 茂樹(Ohta, Shigeki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20365406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス神経幹細胞において、MIF下流のシグナルカスケードとして、MIF-CHD7-TPT1-ZFH4を同定した。ZFHX4は、マウス胎児脳では脳室周囲で発現していた。マウス神経幹細胞で、ZFHX4を発現抑制したところ、細胞増殖抑制を見出した。さらに、Cas9システムを用いて、ZFHX4ノックアウトを新たに作製した。マウス胎児脳において、ZFHX4ノックアウトマウスではTbr2陽性細胞数の減少を見出した。さらに、ZFHX4がグリオーマで高発現するとともに、グリオーマ幹細胞においても細胞増殖を制御することも明らかとなった。これらのことは、ZFHX4がグリオーマ治療の分子標的になることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MIFがマウス神経幹細胞、ヒトES細胞由来神経幹細胞、グリオーマ幹細胞において、細胞増殖能を担うという発見を、その分子論的基盤を明らかにすることにより、より精緻なものとすることができた。とくに、MIF下流で新たに機能する因子として、ZFHX4を同定した。マウス胎児脳では、ヒト胎児脳同様に脳室周囲でのZFHX4の発現を見出した。ZFHX4が中間前駆細胞の発現制御を担うことが明らかとなったが、成体脳では海馬で発現することから、当該因子の高次脳機能における機能解明の重要性が明らかとなった。さらに、ZFHX4がグリオーマ幹細胞の細胞増殖に関わることから、治療薬開発に寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we newly identified a MIF signaling cascade, MIF-CHD7-TPT1-ZFH4 in mouse NSPCs in vitro. In mouse embryonic brain, Zfh4 was expressed in the ventricular zone of the cortex. Moreover, we generated a Zfh4 knockout mouse using a Cas9 system. In Zfh4 knockout fetal mouse, the number of Tbr2-positive cells in the cortex was decreased compared to wild type. In addition, ZFH4 was highly expressed in glioma and regulated the cell proliferation of glioma cancer stem cells in vitro. Taken together, ZFH4 may be a new candidate for a molecular targeting drug to treat glioma.

研究分野：神経発生学

キーワード：MIF 神経幹細胞 ZFH4 グリオーマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) MIF (Macrophage migration inhibitory factor)がマウス神経幹・前駆細胞の細胞増殖能を有すること、およびその幹細胞性維持に貢献することが明らかとなっていた。
- (2) マウス神経幹・前駆細胞やヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞において、MIF 下流に CHD7(Chromodomain helicase DNA- binding 7), SOX6 (SRY-Box Transcription Factor 6), TPT1 (Tumor Protein, Translationally-Controlled 1) などが存在し、細胞増殖を制御していることが明らかとなっていた。
- (3) マウス神経幹・前駆細胞やヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞において、TPT 1 下流で機能する因子は不明であった。
- (4) マウス神経幹・前駆細胞において、MIF 刺激において Zfhx4 の遺伝子発現上昇を見出していた。

2. 研究の目的

- (1) マウス神経幹・前駆細胞およびヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞における MIF 下流のシグナル因子の伝達機構を統合的に解明する。
- (2) マウス胎児脳における ZFH4 の発現様式を明らかにする。
- (3) マウス神経幹・前駆細胞およびヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞における ZFH4 の機能解明を行う。
- (4) マウス胎児脳における ZFH4 の機能を明らかにする。
- (5) グリオーマ幹細胞における ZFH4 の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) マウス神経幹・前駆細胞培養、ニューロスフェア形成実験および分化実験法
すでに報告した方法¹⁾に従い、マウス胎生 14 日終脳より神経幹・前駆細胞をニューロスフェア培養法により、ヒト EGF, FGF2 (Pepro Tech)および B27 (Thermo Fisher Scientific)を含む Neurobasal 培地 (Thermo Fisher Scientific)を用いて初代培養を行った。
- (2) グリオーマ幹細胞・ヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞培養
使用したグリオーマ幹細胞は慶應義塾大学医学部で樹立された²⁾。培養法は EGF, FGF2, LIF 存在下、ニューロスフェア培養法を用いた²⁾。ヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞は Thermo Fisher Scientific 社より購入し、StemPro NSC SFM 含有培地を用いて CELLstart (Thermo Fisher Scientific)細胞マトリックス上で培養した。
- (3) ZFH4 ノックアウト作製
ZFH4 の第 3 および第 4 イントロン上配列を標的とした sgRNA を発現するベクター、CAS9、および flox 配列を有する相同組換え用ドナーベクターを、前核期卵の雄性前核に導入した。上記卵を偽妊娠 ICR マウス卵管に移植し、個体を得た。
- (4) 遺伝子発現解析
Trizol (Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞から RNA を抽出後、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo)を使用して cDNA 合成を行った。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (Toyobo), Taqman Probe (IDT, ABI), StepOne- Plus(ABI)を使用して各遺伝子発現量を定量した。
- (5) RNA シークエンシング
RNA より NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit(NEB)を用いて cDNA ライブラリーを作成し、次世代シークエンサー HiSeqX を用いて 150bp ペアエンドの解析を実施した。
- (6) 遺伝子発現・抑制実験
shRNA-ZFH4 およびコントロールレンチウイルスベクター(Sigma), パッケージングベクター-psPAX2 (Addgene), エンベロープベクター-pMD2.G (Addgene) を 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に培養上清よりレンチウイルスを回収した。21,000 回転、2 時間の超遠心によりウイルス液を濃縮した。
- (7) 細胞増殖アッセイ
細胞の生存率は CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega)を用い解析した。
- (8) ISH (In Situ Hybridization)
マウス Zfhx4 cDNA を pBluescript ベクターに挿入後、DIG(digoxigenin)ラベル cRNA を作製した。マウス胎児脳凍結切片と当該プローブをハイブリダイゼーションさせた後、AP 標識抗 DIG 抗体で反応させ、BCIP/NBT 基質で発色させた。

<引用文献>

- 1) Ohta S et al., JCS. 125, 3210-20, 2012.
- 2) Fukaya R et al., Cancer Res., 76. 2813-23.2016.

4. 研究成果

- (1) マウス神経幹・前駆細胞における MIF シグナルカスケードの解明

マウス胎児脳より培養した神経幹・前駆細胞および ES 細胞由来神経幹・前駆細胞をもちいて、各因子をレンチウイルスにより過剰発現させたり、発現抑制させたのち、それらの遺伝子発現変化を調べることにより、MIF 下流のシグナルカスケードを図 1 のように明らかにした。さらに、マウス神経幹・前駆細胞において、MIF 制御下に ZFHX4 が存在することを新たに明らかにした (図 2)。

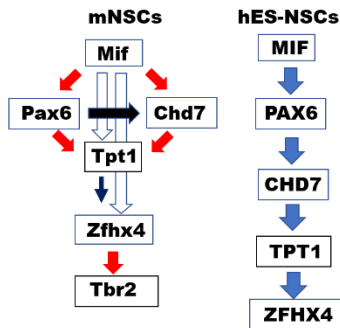


図 1 . マウス神経幹・前駆細胞および ES 細胞由来神経幹・前駆細胞における MIF 下流シグナル

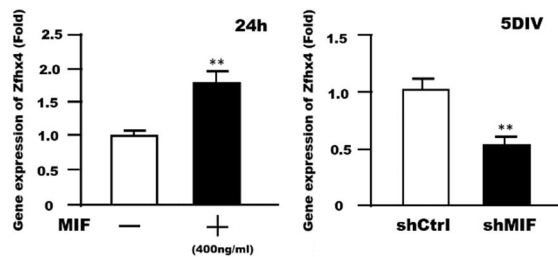


図 2 . マウス神経幹・前駆細胞において Zfhx4 は MIF により発現制御を受ける。MIF を添加もしくは shRNA-MIF により MIF の発現抑制させるとにより、Zfhx4 の遺伝子発現が増加もしくは抑制された

(2) ZFHX4 のマウス胎児脳における発現

マウス胎児脳 (胎生 15 日) における ZFHX4 の発現を ISH により明らかにした。ヒト胎児脳で報告されたように、脳室周囲に発現することが明らかとなった (図 3)。

(3) マウス神経幹・前駆細胞における ZFHX4 制御因子の解明

マウス神経幹・前駆細胞において、レンチウイルスにより、shRNA-Zfhx4 を発現させて遺伝子発現抑制させた際の遺伝子発現変化を RNA シークエンスにより解析した。その結果、Nestin の発現抑制が認められるとともに、MKI67 の発現抑制が認められた (図 4)。さらに、レンチウイルスで shRNA-Zfhx4 をマウス神経幹・前駆細胞で発現させたところ、細胞増殖抑制を認めた (図 5)。



図 3 . マウス胎児脳における ZFHX4 の発現

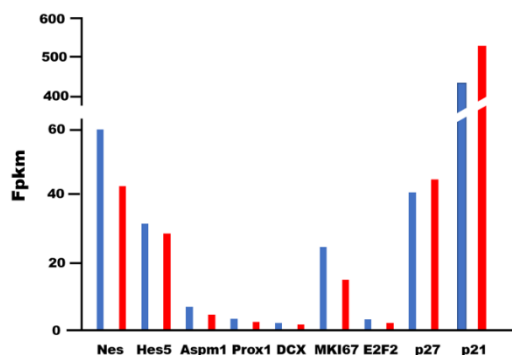


図 4 . RNA シークエンス解析結果. マウス神経幹・前駆細胞において ZFHX4 により発現抑制を受ける遺伝子群

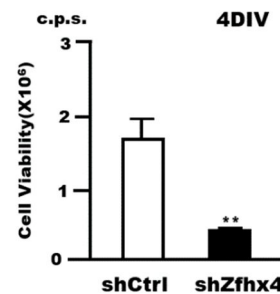


図 5 . マウス神経幹・前駆細胞における Zfhx4 発現抑制による細胞増殖抑制

(4) ZFHX4 ノックアウトマウスの表現型解析

ゲノム編集技術により、ZFHX4 ノックアウトマウスおよび Flox マウスを作製した (図 6)。ZFHX4 ノックアウトマウスの胎生 15 日脳において Tbr 2 (中間前駆細胞マーカー) の発現抑制を認めた (図 7)。この結果は、培養マウス神経幹・前駆細胞において、ZFHX4 を遺伝子発現抑制させた際に、Tbr2 の遺伝子発現抑制が認められたことを反映すると考えられる (未発表)。

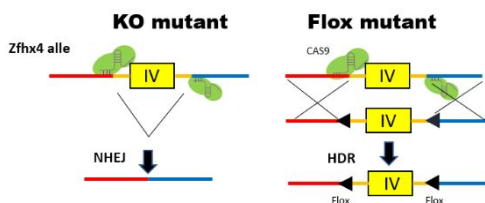


図 6 . Zfhx4 ノックアウトマウス作製ストラテジー

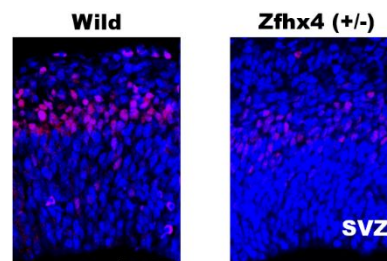


図 7 . Zfhx4 ノックアウトマウス胎児脳における表現型

(5) グリオーマ幹細胞における ZFHX 4 の機能解析

グリオーマにおいて ZFHX 4 が正常脳より高発現することや、ZFHX 4 高発現患者における生存期間の短縮が、in silico データベース (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es/>) 解析により認められた (図 8)。また、樹立した複数のグリオーマ幹細胞において正常神経幹細胞と比較して、ZFHX 4 の高発現を認めた (未発表データ)。そこで、グリオーマ幹細胞において、ZFHX 4 の発現抑制をレンチウイルスをもちいて shRNA-ZFHX 4 を発現させることにより行い、細胞増殖に与える効果を検証した。その結果、ZFHX 4 の発現抑制により細胞増殖抑制を受けることが明らかとなった (図 9)。

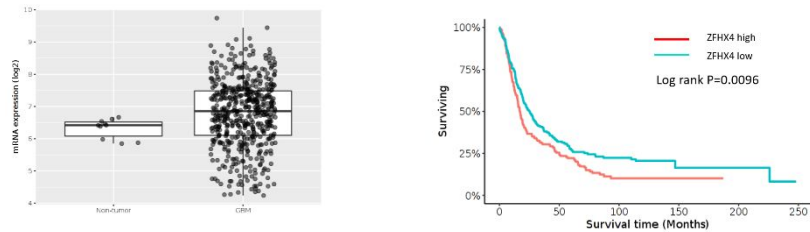


図 8 . グリオーマにおける ZFHX4 の発現および生存期間に与える影響

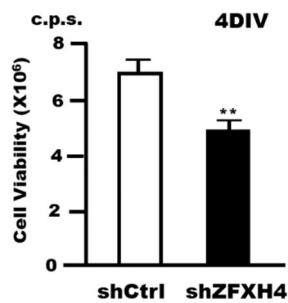


図 9 . グリオーマ幹細胞における ZFHX4 発現抑制による細胞増殖制御

(6) まとめ

マウス神経幹・前駆細胞, ES 由来神経幹・前駆細胞, グリオーマ幹細胞において、MIF 下流で多様な因子が機能して、細胞増殖能や幹細胞性を調整していることが明らかとなった。これらの知見は、全くオリジナルな研究成果によるものである。本研究では、MIF 下流因子として新たに ZFHX 4 を新たに同定した。ZFHX 4 はヒト胎児脳においてラジアルグリア細胞・中間前駆細胞で発現していることが知られているが、マウス胎児脳においても、中間前駆細胞に発現し、その発現制御に関与していることが示唆された。ZFHX 4 は成体マウス脳では海馬でも発現している (未発表データ)。今後、高次脳機能における ZFHX 4 の役割解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okuno H, Renault Mihara F, Ohta S, Fukuda K, Kurosawa K, Akamatsu W, Sanosaka T, Kohyama J, Hayashi K, Nakajima K, Takahashi T, Wysocka J, Kosaki K, Okano H.	4. 巻 6
2. 論文標題 CHARGE syndrome modeling using patient-iPSCs reveals defective migration of neural crest cells harboring CHD7 mutations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 elife	6. 最初と最後の頁 e21114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.21114	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 Ohta S, Kawakami Y, Okano H.	4. 巻 8
2. 論文標題 MIF: functions in brain and glioma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 46706-46707
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.18632/oncotarget.18489	査読の有無 無
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 Ishihara E, Takahashi S, Fukaya R, Ohta S, Yoshida K, Toda M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of KLRC2 as a candidate marker for brain tumor-initiating cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurol Res .	6. 最初と最後の頁 1043-1049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1080/01616412.2019.1672390.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ohta S, Okano H, Kawakami Y.
2. 発表標題 Functional analyses of TPT1 in neural stem/progenitor cells and glioma initiating cells.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohta S, Tokumitsu A, Sone T, Sakamoto A, Kawakami Y, Okano H.
2. 発表標題 TPT1 regulates the proliferation and/or survival of neural stem/progenitor cells and glioma stem cells
3. 学会等名 第60回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohta S, Kawakami Y, Okano H.
2. 発表標題 Functional analyses of TPT1 in neural stem/progenitor cells and glioma initiating cells
3. 学会等名 2017 ISN-ESN meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohta S, Tokumitsu A, Sone T, Sakamoto A, Kawakami Y, Okano H.
2. 発表標題 MIF modulates the proliferation of neural stem/progenitors cells and glioma initiating cells
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohta S, Morimoto Y, Tokumitsu A, Sone T, Sakamoto A, Toda M, Kawakami Y, Okano H.
2. 発表標題 Analysis of the regulatory mechanism underlying brain tumor-initiating cell proliferation by MIF
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	廣田 ゆき (HIROTA YUKI)		