

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09393

研究課題名(和文) 脳腫瘍幹細胞の非対称性分裂におけるエピジェネティクス制御機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetics regulation mechanisms in asymmetric division of brain tumor stem cells

研究代表者

中原 由紀子 (Nakahara, Yukiko)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：50380770

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)：腫瘍組織の中には腫瘍幹細胞が存在し、腫瘍幹細胞が一度の細胞分裂で同じ腫瘍幹細胞と分化が進んだ細胞を生み出す『非対称分裂』をすることで、自己複製能と多分化能のバランスをとり、様々な環境に適応する。本研究ではクエン酸代謝関連酵素であるIDH変異型幹細胞株やヒストンH3K27変異型幹細胞株を用いて、脳腫瘍幹細胞の最大の特徴である非対称性分裂の機構解明を行った。グリオーマ幹細胞細胞株およびグリオーマ患者由来細胞株を対象に、遺伝子相違による非対称性分裂の違いを検討した。腫瘍幹細胞性を特定の遺伝子発現で定量化した。各細胞株間での非対称性分裂の違いはなく、遺伝子発現の違いに相関関係は示されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、腫瘍の代謝に関連するIDH遺伝子とエピゲノム異常の両者を橋渡す位置に存在するTETという分子に着目してきた。低酸素条件下でTET活性がさがりDNAメチル化によりがん抑制遺伝子の発現が低下する。DNAメチル化に加え抑制性ヒストン修飾であるH3K27me3が共存することで、強固な遺伝子不活機構として作用する。TETはES細胞において細胞分化関連遺伝子発現のON-OFFを担っており、ES細胞と同じ非対称性分裂能をもつ腫瘍幹細胞も同様の生存維持機構を有している可能性がある。腫瘍幹細胞の分裂機構を解明し、腫瘍幹細胞を分化誘導できれば、腫瘍組織の腫瘍幹細胞数を制御できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Tumor stem cells exist in tumor tissues and adapt to various environments by "balancing self-renewal and multilineage differentiation capacities through "asymmetric division," in which a single cell division generates the same tumor stem cell and highly differentiated cells. In this study, we used the IDH mutant stem cell line, which is an enzyme related to citrate metabolism, and the histone H3K27 mutant stem cell line to elucidate the mechanism of asymmetric division, which is the most distinctive feature of brain tumor stem cells. We examined differences in asymmetric division due to genetic differences in glioma stem cell lines and glioma patient-derived cell lines. Tumor stemness was quantified by specific gene expression. There were no differences in asymmetric division between the cell lines, and no correlation was demonstrated between differences in gene expression.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioma stem cell asymmetric cell division

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫における不均一性をもたらす腫瘍幹細胞の非対称性分裂 腫瘍の不均一性をもたらしているのが、腫瘍幹細胞の存在である。腫瘍幹細胞が、自己複製能と多分化能を有する腫瘍幹細胞とそこから派生し分化した各段階に分化した腫瘍細胞で構成されるヘテロな集団であると考えられるようになってきた。この腫瘍の不均一性は化学療法や放射線治療に対する抵抗性に関わることが指摘されており、腫瘍を縮小させることに主眼を置いて開発されてきた既存の治療では限界がある。悪性腫瘍の革新的な治療を考えていく上で、腫瘍の不均一性は非常に重要な要素であり、不均一性の根源である腫瘍幹細胞を標的とした治療は最適であると考えられる。そのひとつの方法として、腫瘍幹細胞の幹細胞としての性質 (stemness) を失わせることができれば、腫瘍を分化した細胞集団に導くことになり、既存の治療法の効果を高めることにもなるばかりか、最終的には全腫瘍細胞を死滅させるという道が開けるのではないかと。腫瘍幹細胞は、非対称分裂と対称分裂を使い分けることで、自己複製能と多分化能のバランスをとり、様々な環境に適応している。したがって、腫瘍幹細胞の分裂機構を明らかにすることは腫瘍幹細胞を標的とした治療の開発につながると考えられた。

IDH 遺伝子変異と抑制性ヒストン修飾である H3K27 トリメチル化 (H3K27me3) IDH 変異によって oncometabolite と呼ばれる 2-ヒドロキシグルタル酸(2-HG)が産生され腫瘍化する。2-HG はゲノム DNA 脱メチル化酵素である ten- eleven translocation (TET)の活性を低下させる。これまでの研究で TET 蛋白は正常脳に発現しているが、がん細胞では 2-HG の蓄積により TET 酵素活性が低下し、ゲノム DNA のメチル化異常が促進されることから、tumor suppressor gene としての機能を有していることが分かっている。H3K27M 変異は、H3K27 のトリメチル(H3K27me3)を減少させ、腫瘍化に関与しているとされている。近年、IDH 野生型細胞に R132 変異をトランスフェクションすると、H3K27me3 が増加することが示された。ES 細胞の分化において、分化制御遺伝子のプロモーター領域に、H3K27me3(転写抑制)と H3K4me3 (転写活性化)が共存する“bivalent domain”が形成され、その両者のバランスにより分化制御遺伝子の発現が制御されている。これまで我々が注目してきた TET 蛋白はこのヒストン修飾に関与している分子である(Verma, Nature genetics 50; 83-95, 2017)。

2. 研究の目的

本研究は、不均一性の原因である腫瘍幹細胞の分化誘導療法の応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。腫瘍組織の中には腫瘍幹細胞が存在し、腫瘍幹細胞が一度の細胞分裂で同じ腫瘍幹細胞と分化が進んだ細胞を生み出す『非対称分裂』をすることで、自己複製能と多分化能のバランスをとり、様々な環境に適応する。この腫瘍幹細胞の分裂機構を解明し、腫瘍幹細胞を分化誘導できれば、腫瘍組織の腫瘍幹細胞数を制御できる可能性がある。

3. 研究の方法

1) 各細胞株のゲノム遺伝子異常の解析 Sanger Sequence による脳腫瘍関連遺伝子変異の検出 stemness 関連遺伝子発現の相違 腫瘍幹細胞マーカー (CD133, Musashi, Nanog, Nestin, Sox2, KLF4) の遺伝子発現をウェスタンブロットティング、qRT-PCR で定量化する。2) 非対称性分裂の定量化 非対称性分裂関連遺伝子の発現解析 Label retaining 法による非対称性分裂の観察 非対称性分裂の定量化 3) 非対称性分裂の頻度の異なる細胞株間および IDH 変異型細胞株、H3K27M 変異型細胞株におけるエピゲノム制御 TET 蛋白の発現および活性を定量化 TET 蛋白をウェスタンブロットティング、qRT-PCR で定量化する。TET 酵素反応の基質である 5-mc、産生物である 5-hmc を測定し、TET 酵素活性を比較する。TET と H3K27me3 の結合 抗 TET 抗体、抗 H3K27me3 抗体をもちいて、クロマチン免疫沈降アッセイを行う。

4. 研究成果

膠芽腫細胞株 (U87MG, U251, U251nu/nu, T98G) およびすでに細胞株として樹立され、異なる遺伝子異常プロファイリングをもつグリオーマ幹細胞細胞株 (MGG4, MGG8, MGG119, MGG152) および悪性神経膠腫患者の腫瘍組織から単離・培養した患者由来腫瘍幹細胞を対象とした。遺伝子相違による非対称性分裂の違いを検討した。各細胞株に対し、脳腫瘍関連遺伝子 (IDH1, IDH2, H3F3A, HIST1H3B, p53, ATRX, TERT, BRAF) の変異の有無について、Sanger sequence 法を用いて評価した。腫瘍幹細胞株のうち、MGG119 と MGG152 が IDH1 遺伝子変異を有していた。Saga027 株は H3K27M 変異を有していた。患者由来腫瘍幹細胞については腫瘍摘出標本の免疫染色を行い、シークエンスの結果と矛盾しないことを確認した。悪性神経膠腫摘出腫瘍組織から培養した、接着細胞群とスフェロイド形成細胞群を用いた。それぞれの細胞群に対し、腫瘍幹細胞マーカーである CD133, CD44, SOX2, KLF4 について qRT-PCR を行った。スフェロイド形成細胞群で腫瘍幹細胞マーカーの発現が高いことを予想していたが、その傾向があるものの有意な結果は得られなかった。TET1, 2, 3 の mRNA 発現を qRT-PCR で測定した。TET1 と TET3 の発現量は細胞株によって異なり、逆相関を示していた。TET 1 発現量は、IDH1 遺伝子の変異との関連はなかった。マ

ウス正常大脳およびこれまでのヒト臨床摘出標本に対し、抗 TET1 抗体を用い蛍光免疫染色により、TET1 の細胞内局在について評価した。非対称性分裂の頻度について、各細胞群で蛍光免疫染色法を用いて可視化を試みた。抗体は α -Tubulin, Pancadherin, NuMA, DAPI を用いた。接着細胞群に対しフェロイド形成群で有意に非対称性分裂の頻度が高いことが予想されたが、フェロイド形成群で有意に非対称性分裂の頻度が高いことが証明できなかった。

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	阿部 竜也 (Abe Tatsuya) (40281216)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	伊藤 寛 (Ito Hiroshi) (50795375)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	

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