

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成21年度～平成22年度

課題番号：21790380

研究課題名（和文） 新規癌抑制遺伝子DACH1が制御する転写ネットワークの解析

研究課題名（英文） Transcriptional network regulated by a candidate tumor suppressor gene DACH1

研究代表者：

渡辺 亮（WATANABE AKIRA）

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：60506765

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、脳腫瘍発生のメカニズムを明らかにすることである。申請者らはDNAコピー数解析で脳腫瘍においてホモ欠失を示すDACH1を同定した。脳腫瘍細胞株にDACH1の発現を誘導することで、腫瘍増殖能及び形成能の低下を示した。また、マイクロアレイ解析によってFGF2がDACH1の下流遺伝子の一つであることを示し、スフェロイドアッセイによって、脳腫瘍ではDACH1の欠失によるFGF2の発現亢進が腫瘍増大をひき起こす、すなわちDACH1の欠失による異常な神経分化誘導が神経膠腫の発生機序の一つであることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Loss or reduction in function of tumor suppressor genes contributes to tumorigenesis. Here, by allelic DNA copy number analysis, we report homozygous deletion in glioblastoma multiformes (GBMs) at chromosome 13q21, where *DACH1* gene is located. We found decreased cell proliferation by forced expression of DACH1. Exogenous bFGF, a target gene of DACH1, rescues spheroid-forming activity and tumorigenicity of the U87-DACH1-high cells, suggesting that loss of DACH1 increases the number of tumor-initiating cells through transcriptional repression of bFGF. These results illustrate that DACH1 is a novel tumor suppressor, which does not only suppress growth of tumor cells but also regulates bFGF-mediated tumor-initiating activity of glioma cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌幹細胞・DACH1・脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景
悪性腫瘍の発生・進展には、変異やDNAコ

ピー数異常が深く関わっており、腫瘍特異的なゲノムDNA構造の異常を検出することで、

病態と関連する遺伝子の同定が可能になる。神経膠腫は脳腫瘍の中で最も予後の悪い腫瘍で生存期間中央値は1年である。神経細胞の支持や栄養を司る神経膠細胞より発生すると考えられているが、詳細は明らかになっていない。また、現在までに *EGFR1*, *TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *RB* 等の変異や DNA コピー数異常が報告されているが、これらの分子が関わる腫瘍化の分子メカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DNA コピー数解析より腫瘍細胞で特異的に見られる DNA コピー数変化を検出し、腫瘍関連遺伝子の同定を行い、神経芽腫の発症のメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 材料

全ての臨床検体は東京大学医学部附属病院、東京大学先端科学技術センターの倫理委員会承認を得たものを用いていた。細胞は ATCC より購入した U87MG 及び U251 を用いた。

(2) 方法

① SNP ジェノタイプングアレイ DNA コピー数解析は 50K SNP genotyping array (Affymetrix) を用いて行った。検体のゲノム DNA (250ng) を制限酵素 XbaI により切断した後、XbaI 特異的なアダプターを付加し、この DNA 断片をアダプター特異的なプライマーを用いて増幅させた。20 μ g の PCR 産物を DNaseI で断片化した。断片化した PCR 産物をビオチンでラベルし、25mer オリゴヌクレオチドアレイにハイブリダイゼーションした。

② MassARRAY ゲノム DNA 2.5ng を鋳型として、SNP を含む特定領域に対して PCR を行った。伸長用プライマー、iPLEX Buffer Plus, iPLEX terminationmix, iPLEX enzyme を用いて、SNP 位置直前に伸長用プライマーをハイブリダイズさせ xddNTP/dNTP mixture を含む反応液により伸長反応を行った。MALDI-TOF 質量分析計によって、質量数とそれに対応する遺伝子型タイプングした。

③ 安定細胞株の樹立 pcDNA6/TR ベクターを神経膠芽腫の細胞株である U87 にトランスフェクションした。トランスフェクションから 72 時間後にブラストシジン (Invitrogen) 5 ng/ml を加え、pcDNA6/TR ベクターに組み込まれたブラストシジン耐性遺伝子を利用した薬剤耐性マーカーによる細胞の選択を開始し、3 週間培養を行った。

④ WST アッセイ 1 ウェルあたり細胞を 5000 個になるように播き、ドキシサイクリン添加後 96 時間、144 時間後に WST-8 溶液(同仁)を添加し 4 ウェルの測定を行い、その平均の

値を結果として使用した。

⑤ ソフトアガーアッセイ 6 ウェルプレートに安定発現株のクローンを 2000 個加えた 0.36%アガー上で培養した。細胞は 1 μ g/ml のドキシサイクリンを投与した安定発現株を用いた。37°C で 3 週間培養した後、コロニー数をカウントした。ドキシサイクリンを加えたもの、加えないものをそれぞれ 3 ウェルの測定を行い、その平均の値を結果として使用した。

⑥ マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

ドキシサイクリンの添加有無における U87MG に DACH1 を導入した U87-TR-Da 細胞を血清存在下 (DMEM) で培養したもの、および bFGF と EGF を含む無血清培地 (NBE) で培養したものについて Affymetrix 社の U133plus2 で遺伝子発現解析を行った。

⑦ in vivo 腫瘍増大アッセイ 雄の Balb/c マウスの皮下に 5 \times 10⁶ 個の U87-TR-Da 細胞を移植した。腫瘍形成が確認できた時点で、ドキシサイクリン (1mg/ml) を含む水を投与した。

⑧ 造腫瘍能アッセイ ドキシサイクリン存在化で培養した U87-TR-Da 細胞を細胞の個数を変えて皮下に移植した。

⑨ 脳室における腫瘍形成能の測定

Balb/c マウスに 0.7 \times 10⁵ 個の細胞を移植した。DACH1 の発現の影響はドキシサイクリン存在化で培養した U87-TR-Da 細胞を用いて行った。FGF の発現による造腫瘍能の測定は、U87 細胞に DACH1 及び bFGF2 をレンチウイルスで発現させた細胞を用いて行った。

4. 研究成果

本研究では、SNP タイピングアレイを用いた 8 例の神経膠腫における網羅的なコピー数解析を行った。染色体 13q21 において両アレルが欠失している領域を同定した (図 1)。さらに、28 例の神経膠腫を用いて MassARRAY を用いた詳細な SNP タイピング解析を行い、3 例がホモ欠失を示し、その領域を 388Kbp に絞り込み、その領域に存在する唯一の遺伝子として *DACH1* を同定した (図 2)。

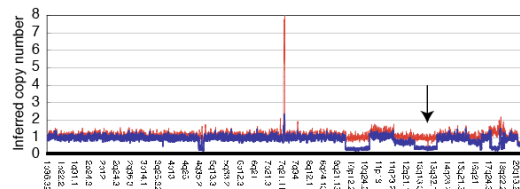


図 1 神経膠腫における DNA コピー数解析

DACH1 の発現が低下している脳腫瘍細胞株 U87 に DACH1 を導入した細胞株では、DACH1 の発現によって *in vitro* における細胞増殖が抑制された (図 3A, B)。ゼノグラフィトモデルを用いて DACH1 の発現が *in vivo* における腫瘍形成能を低下させることを明らかにした (図 3C-E)。

脳腫瘍細胞は FGF2 を含む無血清培地で幹細胞

胞の特徴であるスフェロイドを形成する。そこで、U87-TR-Da 細胞を無血清培地で培養した後にドキシサイクリンを添加し、DACH1 の

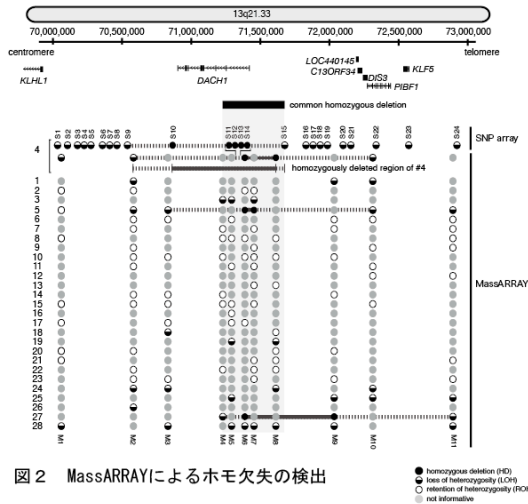


図2 MassARRAYによるホモ欠失の検出

発現誘導を行った。血清存在下ではDACH1の発現が細胞の形態に影響を与えなかったが、無血清培地ではDACH1の発現がない細胞では

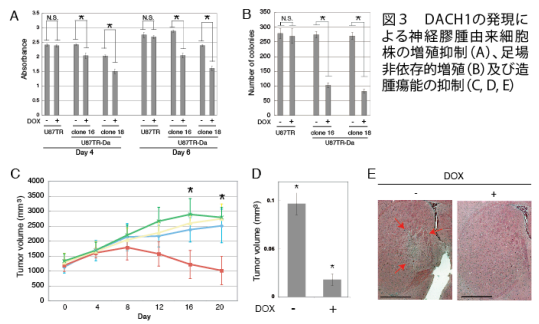


図3 DACH1の発現による神経膠腫由来細胞株の増殖抑制(A)、足場非依存的増殖(B)及び造腫瘍能の抑制(C, D, E)

スフェロイド形成が見られ、DACH1の発現によって細胞の形態は分化が誘導されていることを示唆する観察が得られた(図4A)。そ

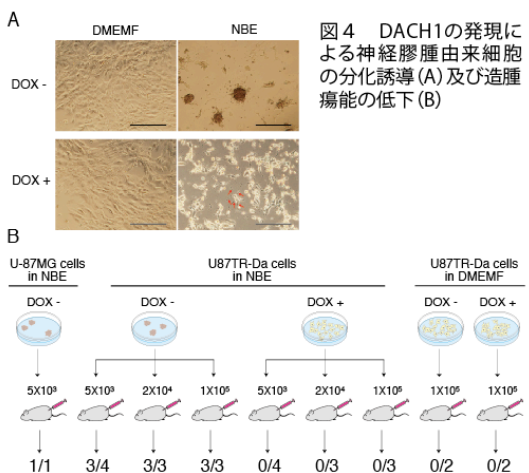


図4 DACH1の発現による神経膠腫由来細胞の分化誘導(A)及び造腫瘍能の低下(B)

こで、血清非存在下で培養されたスフェロイドを形成するU87-TR-Da細胞が腫瘍幹細胞様の性質を示すかゼノグラフトモデルを用い

た実験で検証した。血清の有無、およびDACH1の発現の有無といったU87-TR-Da細胞の個数を変えて皮下移植し、腫瘍形成能を測定した。その結果、ドキシサイクリンでDACH1の発現を誘導した細胞はより多くの細胞の移植によって腫瘍を形成し、スフェロイドを形成するDACH1の発現のない細胞はより少ない数の細胞の移植で腫瘍が形成された(図4B)。すなわち、DACH1の発現は腫瘍幹細胞の数を減少させることが示唆された。

次にマイクロアレイによるDACH1の下流遺伝子の探索を行った。U87-TR-DaにおけるDACH1の発現によってFGF2の発現が抑制されることが示された(図5A, B)。また、DACH1がFGF2のプロモータ領域に結合することが示され、FGF2の発現はDACH1によって直接的に抑制を受けていることが明らかとなった。FGF2は血清非存在下で腫瘍幹細胞の培養に必須な因子であることから、DACH1の発現喪失がFGF2依存的な腫瘍幹細胞の機能に影響を与えていることが示唆された。腫瘍幹細胞はbFGF(FGF2)が添加された無血清培地でスフェロイドを形成する。また、より少数の細胞で腫瘍を形成することが知られている。そこで、DACH1がFGF2依存的なスフェロイド形成に与える影響を検証した。ドキシサイクリン添加によってDACH1の発現を誘導したU87-TR-Da細胞はスフェロイドの数が減少するがbFGFの添加によってスフェロイドの形成が回復した(図5C)。また、脳室腫瘍移植実験によって、DACH1の発現株に対するFGF2を遺伝子導入が腫瘍形成能を回復させることを明らかにした。すなわち、DACH1の発現低下がFGF2の発現を亢進することで腫瘍形成に貢献することが示唆された。

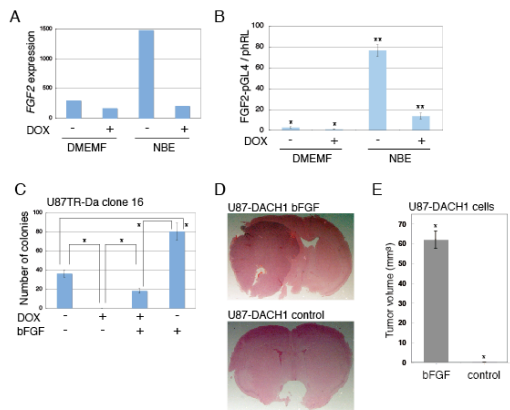


図5 DACH1によって抑制されるbFGFの発現(A, B)とbFGF2の過剰発現によって回復されるスフェロイド形成(C)及び造腫瘍能(D, E)

このように本研究では脳腫瘍で特異的にゲノム欠失を示す新規癌抑制遺伝子DACH1を同定し、DACH1の制御する分化誘導に異常がきたして神経膠腫が発生するメカニズムを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

(1) **Watanabe A.**, Ogiwara H., Ehata S., **Mukasa A.**, Ishikawa S., Maeda D., Ueki K., Ino Y., Todo T., **Yamada Y.**, **Fukayama M.**, **Miyazono K.**, **Aburatani H.**

A homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., in press. 査読有

(2) Ehata S, Johansson E, Katayama R, Koike S, **Watanabe A.**, Hoshino Y, Katsuno Y, Komuro A, Koinuma D, Kano MR, Yashiro M, Hirakawa K, **Aburatani H.**, Fujita N, **Miyazono K.**

Transforming growth factor- β decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells.

Oncogene, 30, 1693-705 (2011). 査読有

(3) Seki M., **Watanabe A.**, Enomoto S., Kawamura T., Ito H., Kodama T., Hamakubo H., **Aburatani H.**

Human ROBO1 is cleaved by metalloproteinases and gamma-secretase and migrates to the nucleus in cancer cells.

FEBS Lett., 584, 2909-15 (2010). 査読有

(4) Johansson E., Komuro A., Iwata C., Hagiwara A., Fuse Y., **Watanabe A.**, Morishita Y., **Aburatani H.**, Funa K., Kano M.R., **Miyazono K.**

Exogenous introduction of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 reduces accelerated growth of TGF- β -disrupted diffuse-type gastric carcinoma.

Cancer Sci., 101, 2398-403 (2010). 査読有

〔学会発表〕(計1件)

① **渡辺 亮**

第68回 日本癌学会学術総会 口頭発表
新規腫瘍抑制遺伝子 DACH1 は脳腫瘍幹細胞の分化を誘導する

2009年10月・横浜

〔図書〕(計2件)

(1) **渡辺 亮**, **山田 泰広**

実験医学増刊「エピジェネティクスと疾患」
28, 2552-2557 (2010)

査読なし

(2) **Yamada Y.**, **Watanabe A.**

Epigenetic codes in stem cells and cancer stem cells.

Adv. Genet., 70, 177-99 (2010). 査読有

〔産業財産権〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

渡辺 亮 (WATANABE AKIRA)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号: 60506765

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

油谷 浩幸 (ABURATANI HIROYUKI)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究者番号: 10202657

宮園浩平 (MIYAZONO KOHEI)

東京大学・医学部・教授/学部長

研究者番号: 90209908

深山正久 (FUKAYAMA MASASHI)

東京大学・医学部・教授

研究者番号: 70281293

斎藤延人 (SAITO NOBUHITO)

東京大学・医学部・教授

研究者番号: 60262002

武笠 晃丈 (MUKASA AKITAKE)

東京大学・医学部・特任講師

研究者番号: 90463869

山田泰広 (YAMADA YASUHIRO)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点教授

研究者番号: 70313872