

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791378

研究課題名(和文)

ヒト悪性脳腫瘍幹細胞における Musashi 1 の機能制御の解析と抗腫瘍効果の解明
研究課題名(英文)

Musashi1 modulates glioma cell growth caused due to the regulation of cell cycle

研究代表者

武藤 淳 (MUTOH JUN)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30383839

研究成果の概要(和文):

RNA 結合蛋白質である Musashi 1 は中枢神経の成長と幹細胞の自己再生において重要な役割を果たすと報告されている。悪性神経膠芽腫や髄芽腫においても発現しており、その機能を shRNA を用いて knock down させたところ、sphere の増殖が day30 にて control 群と比較し 66% 減少することを認めた。また、NOD-SCID mouse に移植を行った所、Musashi1 knockdown 群 control 群と比較し、生存期間の延長を認めた。抗腫瘍効果の解析として、免疫組織染色、細胞周期 assay などを行い、細胞周期の M 期の延長が起こっており、その結果 Glioblastoma 細胞の生存期間が低下しているものと考えられるという結果が得られた。

研究成果の概要(英文):

The expression of Musashi1 (MSI1), an RNA binding protein that plays a crucial role in nervous system development and stem cell self-renewal. Here, we examined its role in the progression of glioma. The RNAi-based MSI1 knock down (KD) in glioblastoma and medulloblastoma cells resulted in a significantly lower number of colony forming cells on day 30 (66% reduction in colony size), indicative of the inhibitory effect of MSI1-KD on tumor cell growth. Immunocytochemical staining of MSI1-KD glioblastoma cells suggested that these cells ectopically express markers of Meta phase. A 2.2-fold increased number of MSI1-KD cells in the G2/M phase, as detected by fluorescence cell sorting, further confirmed the induction of mitosis and defect of cell survival upon MSI1-KD treatment, although it did not alter the expression of, activated caspase-3. We further showed that the xenografts of MSI1-KD glioblastoma cells had a 96.6% reduction of tumor size measured by bioluminescence imaging system (BLI) and longer survival (49.3 ± 6.1 days) than the control group (33.6 ± 3.6 days; $P < 0.01$). Taken together, these findings and gene analysis suggest that in MSI1-KD in glioma cells results in the prolongation of the cell cycle by accumulating cyclin B and reduced activity of Notch signal pathway accompanying with up-regulation of m-Numb, which could cause the decrease of survival 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	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
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：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：癌、遺伝子、脳疾患

1. 研究開始当初の背景

近年、癌が永続的に存在するためには、『自己複製能』と『増殖分化して子孫となる細胞を作る能力』を持つ癌幹細胞(cancer stem cell)の存在が報告されており、大腸癌(Catherine A et al.,*Nature* 2007)、乳癌(Muhammad AH.,*PNAS* 2003)などで報告がなされている。脳腫瘍 glioma でも癌幹細胞が存在することは報告されている(Singh et al.*Can.Res.*2003,*Nature* 2004)。現在、脳腫瘍の治療は増殖期にある細胞の死滅を狙った細胞傷害性薬剤かあるいは増殖シグナルを特異的に遮断する分子標的薬剤の治療が主流であり、それらは、非癌幹細胞には有効であるが、増殖が遅く自己複製能を有する癌幹細胞に対する効果は低いと考えられている。癌巣除去や薬剤投与治療した後も癌幹細胞が残存していることが再発の原因であることが考えられ、腫瘍形成の根本となる癌幹細胞を標的とした治療法の出現が望まれている。

脳腫瘍 glioma における癌幹細胞であるが、表面抗原 CD133 の陽性細胞群に含まれていることが報告されており、『自己複製能』『増殖能』『分化能』を有することが示されている(Singh et al. *Can.Res.*2003; Singh et al. *Nature* 2004)。また、CD133 は glioblastoma を始め悪性度の低い low grade glioma にも発現しており、悪性度と発現量が比例している。この CD133 は、胎生期に存在する神経幹細胞の発現マーカーとしても知られているが、同じく神経幹細胞の指標として知られている Musashi1 の癌組織中の発現細胞と CD133 の発現細胞が90%以上一致していることが報告されている(Thon et al.,*Mol.Cel.Neuro.*2008)。そこで、申請者は癌幹細胞の性質を詳細に調べ

る上で Musashi1 に着目した。

2. 研究の目的

Musashi1 は、神経系の幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質であり、下流の標的配列 [(G/A)UnAGU] を有する RNA に結合すること、下流標的遺伝子の一つである m-Numb の翻訳を抑制することが申請者の協力者である慶應義塾大学医学部生理学教室岡野・今井らの報告により明らかになっている (Imai et al *Mol.CellBiol.* 2001, Okabe et al.,*Nature* 2001)。m-Numb は、Notch シグナルの antagonist であり、その発現および活性化は Notch シグナルを低下させることが知られている。Musashi1 による m-Numb の翻訳抑制は、in vitro の実験結果と musashi 遺伝子欠損マウスの解析から、Notch シグナルを亢進させることにより神経幹細胞の未分化性の維持に寄与していると考えられている(Sakakibara et al. *PNAS* 2002)。さらに、Musashi1 は神経幹細胞のみならず、脳腫瘍組織中の MIB1 陽性の幹細胞成分に発現しており、臨床的側面にも応用性が見られる可能性があることが示されている。(Toda et al.,*Glia* 2001; Kanemura et al., *Differentiation* 2001)。また、Musashi1 が細胞周期のレギュレーターである p21^{waf1} の mRNA の翻訳抑制することが示され (Battelli et al.,*Mol.Cell.Neuroscience* 2005)、Musashi1 が glioma の細胞増殖制御にも関わっていることを予想した。そこで申請者は、脳腫瘍 (glioma) において musashi1 遺伝子に対する siRNA を使用し、Musashi1 の機能を低下させた場合の癌幹細胞の機能評価に重点をおき、腫瘍の増殖能、悪性度について、検証する経緯に至った。

3. 研究の方法

(1)脳腫瘍 glioblastoma と medulloblastoma の細胞株から癌幹細胞を選別的培養する系を確立する。

癌幹細胞を樹立方法として、現在までに、細胞表面マーカーである CD133 や CD15 などで FACS sorting する方法と、aggregation 能力の強い癌細胞の影響をできるだけのごくために、96well plate の中で、10000 個/ml の細胞を sphere 培地の中に浮遊培養を行い、その sphere を継代培養行うことで sphere の中に癌幹細胞群を選択していく方法があるが、後者を行い、細胞塊を得た。

(2)癌幹細胞における *musashi1* の siRNA による knockdown を行い、細胞増殖性評価を行う。aggregation の影響を除いた評価をするために、半 gel 状の sphere 培地の中で浮遊培養を行う

(3)*musashi1* 遺伝子の knock down による細胞増殖性の低下と細胞周期因子との関連性を調べる

propidium iodide(PI)染色を施して FACS を利用すると、細胞核 DNA 量の測定により、細胞周期分布の解析ができる。さらに、リン酸化 Histone H3、Casepase3 に対する免疫細胞染色を行い、細胞周期チェックポイントが正常に機能しているかを検証する。細胞周期因子である cyclin 群の western blot による定量を行う。

(4)NOD-SCIDmouse (非肥満性糖尿病型重症免疫不全マウス)へ移植による腫瘍増殖性の評価

EF₁ プロモーターの制御下で CBR (コメツキムシの Luciferase)、Venus(YFP 変異蛍光蛋白質)を恒常的に発現させる DNA を遺伝子導入し、非侵襲的にトレース可能な細胞を使用し微弱な Luciferase の生物発光を検知できる IVIS(Bioluminescence imaging system[®])装置を使用して、NOD-SCID マウス (非肥満性糖尿病型重症免疫不全マウス)の脳の右線条体に (bregma より外側 2mm, 前方へ 1mm, 脳表より深さ 3mm の部位)に、*musashi1* に対する siRNA を施した癌幹細胞群を移植することで、脳腫瘍の増殖性および宿主個体の致死性を評価する。

4. 研究成果

(1)悪性神経膠芽腫の cell lines と患者検体より採取した腫瘍から sphere 培養で得られた細胞において *Musashi1* とその相同 family である *Musashi2* の発現を確認した。また lentivirus

を用いて shRNA を導入した。悪性神経膠芽腫細胞 U251MG と髄芽腫細胞 Daoy に対して *Musashi1* と *Musashi2* の knock down を western blot で確認した。

(2)U251MG 細胞に shRNA を用いて *Musashi1* を knock down した細胞を NOD SCID mouse の右線条体に 50000 個移植した。EF₁ プロモーターの制御下で CBR (コメツキムシの Luciferase)、Venus(YFP 変異蛍光蛋白質)を恒常的に発現させる DNA を遺伝子導入し luciferase を投与し IVIS(Bioluminescence imaging system[®])装置を使用して腫瘍の増殖性を live で評価を行った。Control 群(33.6 ± 3.6 days)に比較し、*Musashi1* knock down 群は(49.3 ± 6.1 days; $P < 0.01$) と生存期間の延長を認めた。

(3)sphere culture で継代培養を行っている U251MG 細胞に cell cycle assay を行った所、G2/M 期の細胞の割合が *Musashi1* knockdown 群で増加したとともに、SG2/M 期の細胞を緑に蛍光発色する fucci system を利用して、timelapse assay を行ったところ、*Musashi1* knockdown 群では SG2/M 期の細胞が増加していた。免疫細胞染色を行ったところ M 期の marker である phosphohistone H3(PH3)で染色される細胞も *Musashi1* knockdown 群で増加して見られた。

(4)細胞死に関する評価を行った。*Musashi1* knockdown 群において、TUNEL 染色と Activated caspase 3 染色を行ったが、陽性細胞数においては有意な差は得られなかった。ただ、propidium iodide(PI)染色を施して FACS で解析すると、PI 陽性細胞、つまり死細胞の数は、*Musashi1* knockdown 群で差が見られた。また scencesence 状態を示す SA Gal 染色を行ったところ、control 群に比較して *Musashi1* knockdown 群は有意な差を認めることができなかった。

(5)*Musashi1* knockdown することによって

細胞周期に何らかの影響を及ぼす物と予測し、細胞周期調節因子について western blot で評価した。Musashi1 knockdown 群において、M 期の regulator である cyclin B1 の発現は亢進していたが、G0,G1 期に關与する cyclinD1 の発現は変化が見られなかった。また Musashi1 の下流因子として解明されている Numb,Notch について解析すると Musashi1 knockdown において Numb は発現亢進しており、Notch は低下していた。その他 PTEN,p16 についても評価を行った。

以上の結果より、Musashi1 は cell cycle にも何らかに關与しており knockdown を行うことで、細胞周期を延長し、主に M 期に滞在する可能性があり、また cell survival にも關与し、その mechanism としては、mitotic catastrophe が關与している可能性があることが示唆されたと我々は考える。

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) 査読すべて有

1. Muto J, Hirose Y, Ikeda E, Yoshida K, Kawase T Glial fibrillary acidic protein positivemalignant brain tumor with rhabdoid features in an adult. Case report and review” Neurol Med Chir (Tokyo) in press 2011
2. Kagami H, Muto J, Nakatsukasa M, Inamaasu J: Infected acute subdural hematoma associated with invasive pneumococcal disease. Neurol Med Chir (Tokyo) 368-370;51(5);2011
3. Muto J, Yoshida K, Momoshima S,Kazuno M, Kazuno T Intracranial epidermoid tumor with changes in signal intensity on magnetic resonance imaging because of non-hemorrhagic pathology Neurol Med Chir (Tokyo) 936-8;50(10);2010
4. Muto J, Kawase T, Yoshida K. Meckel's Cave Tumors: Relation to the Meninges and Minimally Invasive Approaches for Surgery -Anatomical and Clinical Studies-

Neurosurgery. Sep;67(3 Suppl Operative):ons291-8; discussion ons298-9.2010

5. Miwa T, Yoshida K, Shidoh S, Kano T, Muto J, Kawase T. Spontaneous regression after standard transsphenoidal surgery in a huge pituitary adenoma with epidural extension. Neurol Med Chir (Tokyo). Sep;49(9):421-3.2009
6. Muto J, Oi S Intradural arteriosynangiosis in pediatric moyamoya disease: modified technique of encephalo-duro-arterio-synangiosis with reduced operative damage to already growing revascularization. Child Nervous System May;25(5):607-12.2009

[学会発表](計16件)

Oral presentation

1. Muto J, Imai T, Mabuchi Y, Okada Y, Matsuzaki Y, Kawase T, Yoshida K, Okano H:Musashi1 modulates glioma cell growth caused due to the regulation of cell cycle. The 10th congress of the Japanese society for regenerative medicine (Tokyo, JAPAN) (Japanese) Mar. 2 2011
2. Hara K, Muto J, Inoue S, Kaneko N, Adachi K, Toyota F, Hikishima S, Ito T, Sawamoto K, Kawase T, Yoshida K, Okano H. Development and analysis of transient middle cerebral artery occlusion model on Common marmoset : The 10th congress of the Japanese society for regenerative medicine. (Tokyo, JAPAN) (Japanese) Mar. 2 2011
3. Muto J, Ohira T, Yazaki T, Yoshida K: The analysis of Five cases of aqueduct stenosis treated successfully by Endoscopic Third Ventriclectomy after shunt malfunction 2nd International Federation of NeuroEndoscopy

- conference.(Tokyo, JAPAN) (English)
December 12,2010
4. Hara K, Muto J, Inoue S, Kaneko N, Adachi K, Toyota F, Hikishima S, Ito T, Sawamoto K, Kawase T, Yoshida K, Okano H. Development and analysis of transient middle cerebral artery occlusion model on Common marmoset : 68th The Japanese Society for Neurosurgery. (Japanese) Oct. 29 2010
 5. Muto J, Yazaki T, Nakamura S, Asamoto S ;How to use the DFDD in anterior approach in cervical fixation, 68th The Japanese Society for Neurosurgery. (Japanese) Oct 28,2010
 6. Muto J, Kawase T, Yoshida K The surgical limitations and pitfalls via transcranial approach to Middle fossa dumbbell type tumors The 22nd Annual meeting of Japanese Society for skull base surgery. (Kurume, JAPAN) (Japanese) July 15,2010
 7. Hara K, Muto J, Inoue S, Kaneko N, Adachi K, Toyota F, Hikishima S, Ito T, Sawamoto K, Kawase T, Yoshida K, Okano H. Development and analysis of transient middle cerebral artery occlusion model on Common marmoset : The 10th congress of the Japanese Society for Regeneration (Hiroshima JAPAN) (Japanese) Mar 11, 2010
 8. Muto J, Horiguchi T, Sasaki H, Suga S,Sato S,Kawase T Preoperative prediction of the usefulness of the anterior clinoidectomy in IC-PC aneurysm clipping: 9th International Conference on Cerebrovascular surgery (Nagoya JAPAN) (English) Nov 13,2009
 9. Muto J, Kawase T, Hara K, Ohira T, Yoshida K; Skull base epidermoid -The capsule must be removed totally?- 68th The Japanese Society for Neurosurgery. (Japanese)(Tokyo, JAPAN) Oct 3,2009
 10. Hara K, Muto J, Inoue S, Kaneko N, Adachi K, Toyota F, Hikishima S, Ito T, Sawamoto K, Kawase T, Yoshida K, Okano H. Development and analysis of transient middle cerebral artery occlusion model on Common marmoset : The 10th Annual meeting of the Japan Society of Molecular Neurosurgery (Tokyo JAPAN) (English)Sep 19, 2009
 11. Muto J, Imai T, Kawase S,Shibata S, Matsuzaki U, Kawase T, Okano H; The Expression of Musashi1 and Mechanism of anti-tumor effects in the cancer stem cell of Human Malignant Brain Tumor : The 10th Annual meeting of the Japan Society of Molecular Neurosurgery (Tokyo JAPAN) (English)Sep 19, 2009
 12. Muto J, Kawase T, Ohira T, Yoshida K; Skull base epidermoid, 1st Swiss-Japanese neurosurgical conference(Zurich Swiss) (English) Jul 23,2009
 13. Muto J, Kawase T, Hara K, Ohira T, Yoshida K. Skull base epidermoid -The capsule must be removed totally?- 9th Congress of the European Skull Base Society, (Rotterdam Netherland) (English) Apr 18,2009
- Poster presentation**
14. Muto J, Horiguchi T,Sasaki H, Suga S,Sato S,Kawase T: Preoperative prediction of the usefulness of the anterior clinoidectomy in IC-PC aneurysm clipping The Stroke 2010, (Morioka JAPAN) (Japanese) Apr 15,2010
 15. Muto J, Imai T, Kawase S,Shibata S, Matsuzaki U, Kawase T, Okano H. The expression of Musashi1 in glioma stem cell and the mechanism of suppressing tumor growth in the human brain tumor. Stem cell research (Tokyo JAPAN) (Japanese) May 25,2009

16. Muto J, Imai T, Kawase S, Shibata S,
Matsuzaki U, Kawase T, Okano H. The
expression of Musashi1 in glioma stem cell and
the mechanism of suppressing tumor growth in
the human brain tumor. 8th The Japan society of
Regenerative medicine (Okayama JAPAN)
(Japanese) Mar 5, 2009

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 淳 (MUTOH JUN)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30383839

(2) 研究分担者；

なし

(3) 連携研究者

なし