

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500453

研究課題名(和文)CHDファミリーによる神経幹細胞およびグリオーマ幹細胞制御機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of CHD family in neural stem cells and glioma stem cells

研究代表者

大多 茂樹(OHTA, SHIGEKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20365406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：CHD7がマウス神経幹細胞に発現し、MIFやPAX6により発現制御を受けうることが明らかとなった。また、CHD7の下流にはHes5やN-Mycが存在していることが判明した。CHD7がマウス神経幹細胞の細胞増殖や幹細胞性維持に貢献していることが示されたが、ヒトES細胞由来神経幹細胞の細胞増殖制御にも貢献していることが明らかとなった。CHD7変異マウス胎児脳を解析したとことTbr2/Ki67陽性細胞の減少を見出した。このことは、神経発生初期のニューロン新生においてCHD7が貢献していることを示している。さらに、CHD7がグリオーマ幹細胞の細胞増殖に貢献していることを新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：The expression of CHD7, which is upregulated by MIF and Pax6, has been shown in mouse neural stem cells, with Hes5 and N-Myc identified as downstream signaling molecules. CHD7 regulates cell proliferation and stemness maintenance in mouse neural stem cells, and it also plays a role in the proliferation of human ES cell-derived neural stem cells. CHD7 mutant fetal mouse brains had fewer Tbr2/Ki67 double-positive cells compared to wildtype brains, showing that CHD7 affects neurogenesis in the early developmental mouse brain. Furthermore, CHD7 was highly expressed in glioma stem cells compared to normal astrocytes, and it was shown to regulate cell proliferation, indicating that CHD7 is a promising therapeutic target for the treatment of gliomas.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：再生医療 神経幹細胞 グリオーマ 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) クロマチンリモデリング因子である CHD(chromodomain helicase DNA-binding)ファミリーがどのような発現特異性や機能を神経幹細胞・グリオーマ(グリオーマ幹細胞)で有しているかは不明であった。

(2) クロマチンリモデリング因子の神経新生における機能の詳細は解明されていなかった。

(3) MIF (Macrophage migration inhibitory factor)が神経幹細胞の細胞増殖・幹細胞性維持に貢献することが申請者らにより明らかにされていた。

(4) 神経幹細胞において MIF が制御する因子群に関しては詳細な解析が十分になされていなかった。

2. 研究の目的

(1) 神経幹細胞における CHD7 の機能を明らかにする。

(2) マウス胎児期神経新生における CHD7 の機能を明らかにする。

(3) ヒト神経幹細胞(ヒト ES 細胞由来神経幹細胞)における CHD7 の機能解明を行う。

(4) グリオーマに高発現する CHD ファミリー因子を同定するとともに、その機能をグリオーマ幹細胞も含め明らかにする。

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て、ヒト EGF, FGF2 (PeproTech) および B27 (Life Technologies)を含む Neurobasal 培地(Life Technologies)を用い初代培養を行った。ニューロスフェア形成実験では、神幹・前駆細胞を 96 穴プレートに播種したのち、低密度培養を行った。分化誘導実験では、完全培地から EGF, FGF2 を除き分化誘導を行った。

(2) グリオーマ幹細胞・ヒト ES 細胞由来神経幹細胞培養

使用したグリオーマ幹細胞は Chneiweiss H 博士(パリデカルト大学)より供与された。培養法は Patru²⁾らの報告に従いニューロスフェア培養法を用いた。ヒト ES 細胞由来神経幹細胞は Life Technologies 社より購入し、StemPro NSC SFM 培地を用いて Cellstart (Life Technologies) 基質上で培養した。

(3) CHD7 変異マウス

Whi mouse は European mouse mutant archive より購入した。

(4) 抗体および試薬

Nestin, CHD7 (Abcam, Bethyl laboratories), CNPase, TuJ1(Sigma), GFAP (Biomedical Technologies), Ki67, SOX1, SOX2, Tbr2, MIF (R&D Systems), DAPI (Life Technologies), Laminin B1 (Santa Cruz)

(5) 遺伝子発現解析

Trizol (Life Technologies)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。FastStart Universal SYBR Green Master (Roche), 各設計プライマー、Taqmanprobe (Lifetechnologies), ABIPrism7900HT (ABI)を使用して各遺伝子発現量を解析した。

(6) 遺伝子発現・抑制実験

Human CHD7 cDNA (pF1KE9669, Promega) を pF5A-CMV-neo に組み換えた。pMX-Pax6 (Addgene), pCMV-PAX6 (TransOMIC technology)を購入し実験に供した。遺伝子導入には FugenHD, Viafect (Promega)を使用した。pGIPZshRNA レンチウイルスコントロールベクター(Thermo Scientific)および CHD7 shRNA (GGAGAACCCUGAGUUUGCUG) 発現レンチウイルスベクター、パッケージングベクター psPAX2, エンブローベクター pMD2.G を 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後培養上清よりウイルスを回収した。21K、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 (Promega)を用い解析した。

(8) 免疫組織染色および免疫細胞染色解析

免疫組織染色は、マウス組織をホルマリン固定後、凍結切片として免疫染色解析に供した。免疫細胞染色解析では、細胞をホルマリンで固定したのち、PBS 洗浄後、直ちに免疫染色解析に供した。各 1 次抗体に対して、Alexa488, 568 標識 2 次抗体 (Life Technologies)を用いて可視化するとともに、DAPI を用いて核を染色した。それぞれの画像は共焦点顕微鏡 (LM710, Zeiss) を用いて解析した。

(9) ウェスタンブロット解析

各サンプルは細胞溶解剤 (E-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Thermo Scientific)を用いて、蛋白質を細胞より可溶化したのち、Bradford 法により蛋白定量を行った。SDS-PAGE 法により試料を電気泳動したのち、Hybond-C (GE)メンブレンに転写後、各抗体反応を行ったのち、ECL-Plus (GE healthcare)で化学発光を行いシグナルの検出を行った。

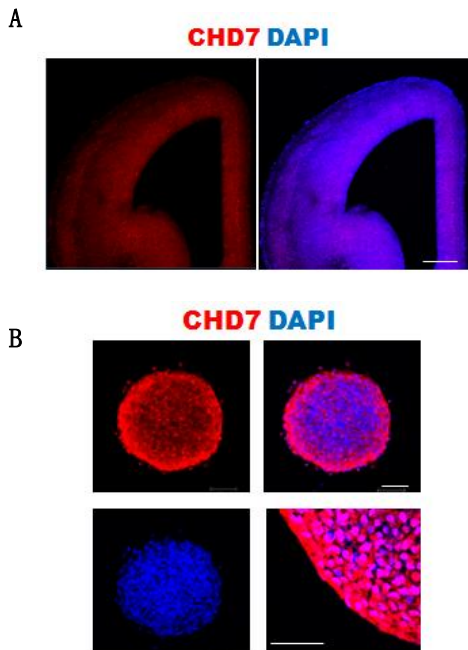
1) Ohta et al., JCS. 125, 3210-20, 2012.

2) Patru C et al., BMC Cancer, 10, 66, 2010.

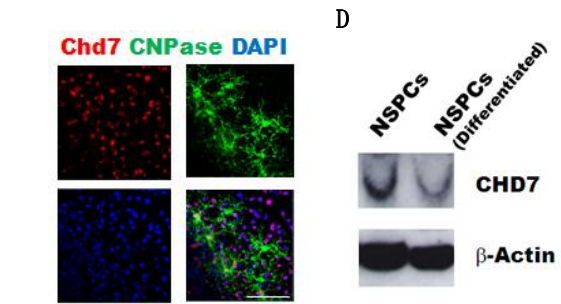
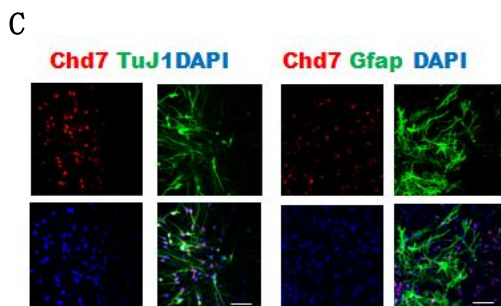
4. 研究成果

(1) Chd7 発現解析

免疫組織化学的手法により Chd7 の発現を、マウス胎生 14 日終脳で行った(図 A)。その結果、神経幹・前駆細胞存在部位として知られる脳室周囲で Chd7 の発現を認めた。さらに、マウス胎生 14 日終脳よりニューロスフェア培養法で得た神経幹・前駆細胞においても細胞免疫染色法により Chd7 の発現を認めた(図 B)。これらの解析結果により、神経幹・前駆細胞に Chd7 が発現していることが示唆された。Scale bar; A, 200 μ m, B, 50 μ m。

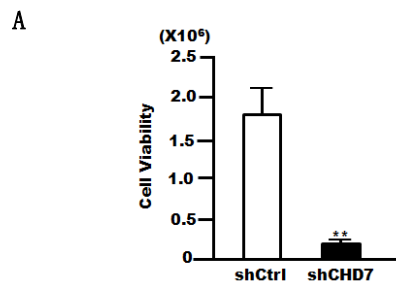


さらに神経幹・前駆細胞(ニューロスフェア)培養液より増殖因子を除き、神経幹・前駆細胞をニューロン・グリア・オリゴデンドロサイト各神経細胞系譜へ分化させた。分化誘導後 3-5 日の分化細胞を観察したところ、ニューロンで特に高い Chd7 の発現を観察した(図 C)。また、神経幹・前駆細胞において、分化誘導後にその発現量は低下していた(図 D)。これらの結果より、Chd7 が神経幹・前駆細胞における未分化維持や細胞増殖に関与していることが予想された。Scale bar; 50 μ m。

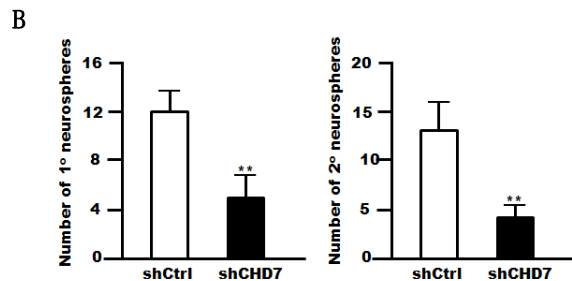


(2) マウス神経幹・前駆細胞における機能解析 (I)

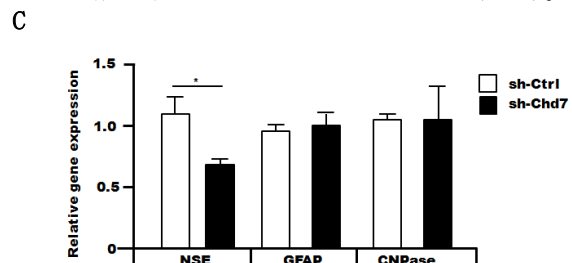
マウス胎生 14 日終脳より初代培養した神経幹・前駆細胞において Chd7 を shRNACHd7 発現レンチウイルスによりノックダウンしたところウイルス感染 5 日後細胞増殖抑制を観察した(図 A)。



さらに、同様に 1 次および 2 次ニューロスフェア形成能を観察したところ、shRNACHd7 による発現抑制によりいずれもニューロスフェア形成能の低下を認めた。以上のことにより、Chd7 が神経幹・前駆細胞の幹細胞性維持に貢献していることが示唆された(図 B)。



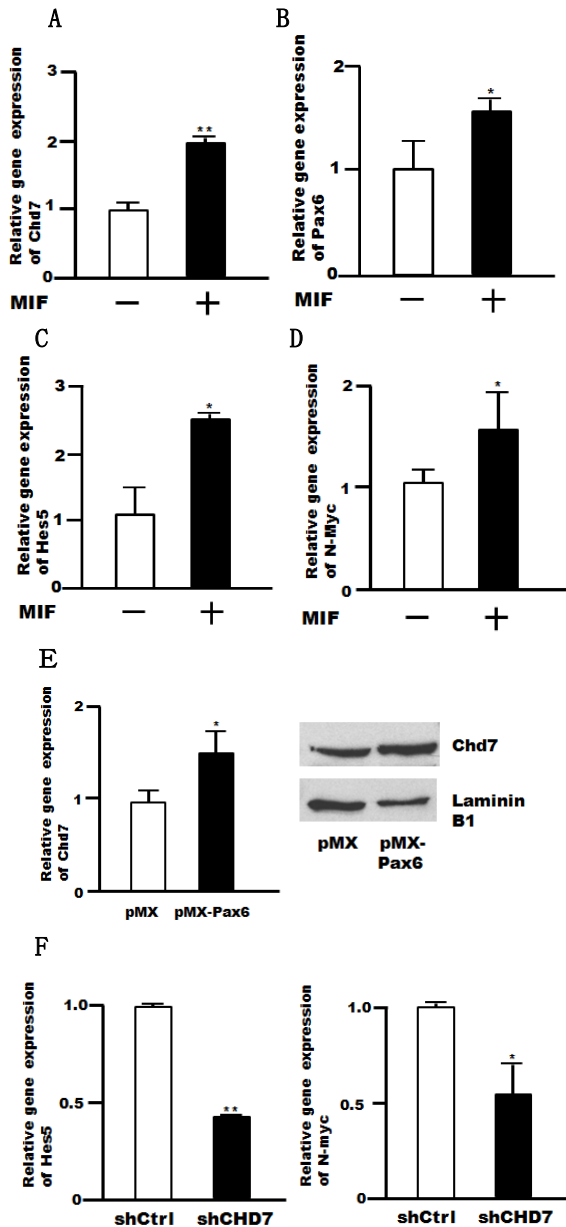
これらに加え、Chd7 を神経幹・前駆細胞で発現低下させた際の分化能の変化を解析したところ、分化誘導後 4 日でニューロンマーカーが減少することが明らかとなった(図 C)。



(3) マウス神経幹・前駆細胞における機能解析 (II)

マウス胎生 14 日終脳より初代培養した神経

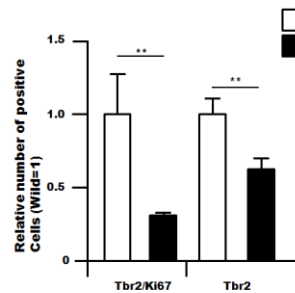
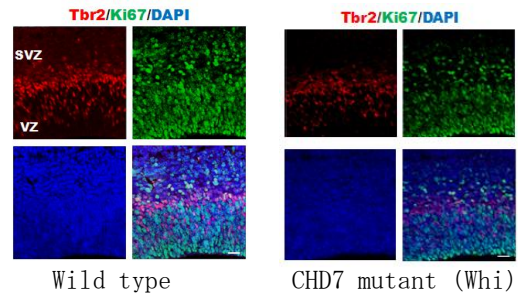
幹・前駆細胞において MIF 刺激(24h)により、Chd7, Pax6, Hes5, N-Myc(図 A-D)の遺伝子発現が亢進されることが明らかとなった。また、レトロウイルスにより Pax6 を過剰発現させたところ Chd7 の発現が亢進することが明らかとなった(図 E, 5DIV)。さらにレンチウイルスにより神経幹・前駆細胞において Chd7 をノックダウンしたところ、Hes5, N-Myc の遺伝子発現低下を認めた(図 F, 5DIV)。これらの知見により MIF → Pax6 → Chd7 → Hes5, N-Myc というシグナル伝達カスケードが存在していることが示された。



(4) マウス胎児脳神経新生における Chd7 の役割

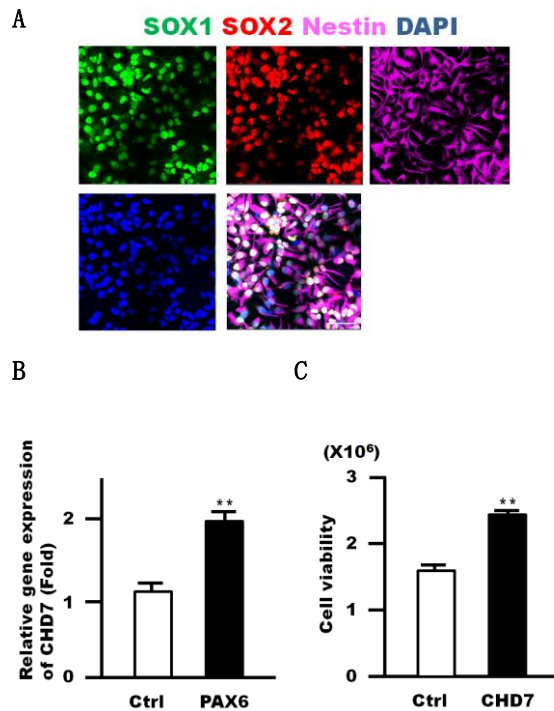
Chd7 変異マウス (Whi) 胎生 14.5 日における Tbr2(Intermediate Progenitor Cells)陽性数の変化を野生型と比較して調べ

たところ、Tbr2/Ki67, Tbr2 各陽性細胞数の有意な減少が認められた。(n=5-6), Scale bar; 20 μ m。



(5) ヒト ES 細胞由来神経幹細胞における CHD7 の機能解析

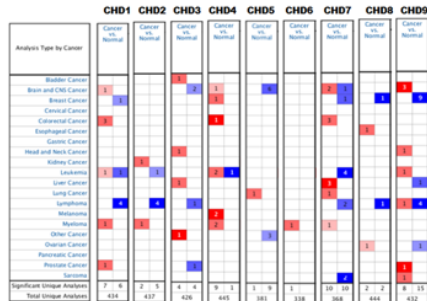
ヒト H9ES 細胞由来神経幹細胞において神経幹細胞マーカー (Sox1, Sox2, Nestin) の発現を免疫染色法により確認した(図 A)。この細胞において PAX6 を過剰発現させたところ CHD7 遺伝子の発現亢進を認めた(図 B, 2DIV)。さらに、CHD7 の過剰発現により細胞増殖を認めた(図 C, 4DIV)。Scale bar; 20 μ m。



(6) グリオーマにおける CHD ファミリーの発現解析

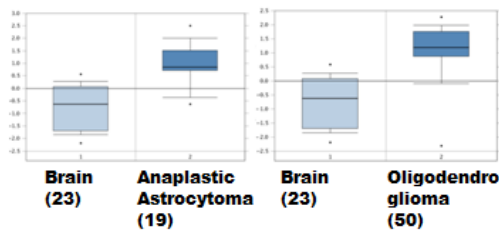
最初に公開遺伝子発現データベース (www.cncomine.org) を用いてグリオーマにおける各 CHD ファミリー遺伝子の発現を解析した。その結果、CHD7, CHD9 がグリオーマで高発現していることが明らかとなった (図 A)。

A



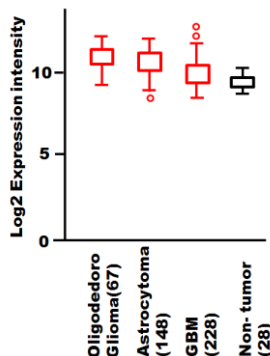
さらに、詳細に同データベースで解析したところ、アストロサイトーマやオリゴデンドログリオーマにおいて有意に CHD7 遺伝子の発現亢進が認められた (図 B)。

B

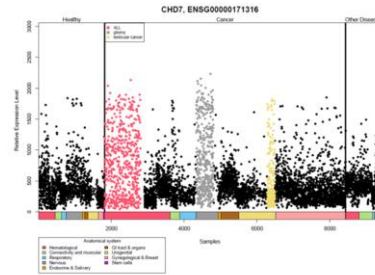


グリオーマにおける CHD7 の高発現は、他の公開データベースでも確認することができた。Rembrandt (caintegrator.nci.nih.gov/rembrandt), Genesapiens (www.genesapiens.org) (図 C, D). また、CHD7 の高発現患者の予後の悪さも明らかとなった (図 E, genome-cancer.soe.ucsc.edu).

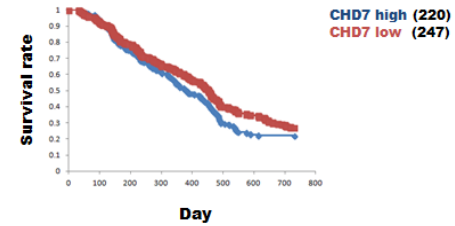
C



D



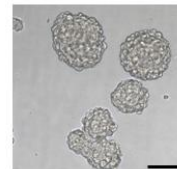
E



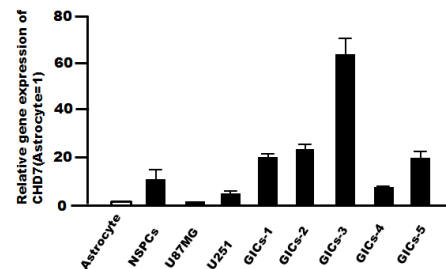
(7) グリオーマ幹細胞における CHD7 の機能解析

グリオーマ幹細胞 (GICs) をグリオーマスフェアとして培養し (図 A)、CHD7 遺伝子の発現を調べたところ正常アストロサイトに比べ CHD7 が高発現していることを見出した (図 B)。そこで、レンチウイルスを用いて CHD7 の遺伝子発現を抑制したところ細胞増殖抑制を認めた (図 C, 5DIV)。この際に p21, p27 遺伝子の発現亢進を認めた (図 D)。Scale bar; 100 μ m。

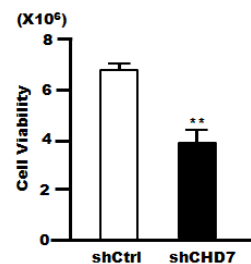
A



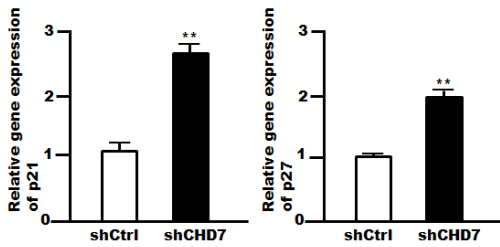
B



C



D



(8)まとめ

クロマチンリモデリング因子である CHD7 がマウスおよびヒト ES 由来神経・前駆細胞の細胞増殖制御に寄与しうることが、今回の研究で明らかとなった。とくにマウス神経・前駆細胞においては Pax6 下流に Chd7 が制御を受けうること、さらにその下流因子として Hes5, N-Myc が存在することが明らかとなった。また、発生初期マウス胎児脳においては、Chd7 の発現低下により IPCs の数が減少することを見出した。このことは、Chd7 が胎児脳において神経新生に寄与していることを示している。さらに、グリオーマにおける CHD7 の特異的な高発現を見いだしたが、グリオーマ幹細胞の細胞増殖に CHD7 が貢献していることが明らかになり、CHD7 が難治性であるグリオーマ治療法開発において、良い分子標的となりうることが示された。今後、CHD7 がどのようなエピジェネティックな分子制御機構を伴いグリオーマ幹細胞で機能しているのか、その解明が待たれる。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ①Ohta S, Kawakami Y, Okano H. Functional analysis of CHD7 in neural stem cells and glioma stem cells. 第57回日本神経化学大会, 2014年9月29-10月1日, 奈良。
- ②Okuno H, Renault-Mihara F, Ohta S, Kurosawa K, Akamatsu W, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Modeling of human neural crest cell disease: neural crest cells derived from CHARGE syndrome patient-iPS cells exhibit abnormal migration in vitro. CiRA International Symposium 2014. Jan. 17. 2014. Suita, Osaka.

- ③ Ohta S, Misawa A, Lefebvre V, Okano H, Kawakami Y, Toda M. Identification of a novel macrophage migration inhibitory factor (MIF)-regulated factor that promotes the survival and maintenance of neural stem/progenitor cells. 第36回日本分子生物学会, 2013年12月3-6日, 神戸。

[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]

6. 研究組織

(1)研究代表者

大多 茂樹 (OHTA SHIGEKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 20365406

(2)研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI YUTAKA)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 50161287

深谷 雷太 (FUKAYA RAITA)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号: 60348670