

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501325

研究課題名(和文)小脳髄芽腫の細胞多様性と細胞系譜

研究課題名(英文)The cell diversity and the cell lineage in Shh-type medulloblastoma.

研究代表者

杉谷 善信(Sugitani, Yoshinobu)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：80360569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、小脳髄芽腫は双極性の細胞形態をとる癌幹細胞から複数の樹状突起様構造を有する多極性の顆粒細胞様ニューロンまでを含む様々な分化度の細胞で構成されるヘテロな細胞集団であり、癌幹細胞が正常の小脳顆粒前駆細胞と良く似た分化段階を経て形成されることが示された。この髄芽腫細胞の分化度と一致した発現様式を示すmiRNA-Xについて、樹立した髄芽腫癌幹細胞株及びPtc1コンディショナルノックアウトマウスを用いて機能解析を行った結果、miRNA-Xが髄芽腫癌幹細胞の分化を誘導していることが示された。以上の結果は、miRNA-Xの補充療法または発現誘導が髄芽腫癌幹細胞の根絶に有効であることを示す。

研究成果の概要(英文)：Our immunohistochemical analyses and genetic lineage study showed that the medulloblastoma (MB) were composed of the MB cells of varied differentiation status, and that the cancer stem cells took the bipolar cell morphology and often differentiated into neurons with multiple dendrites like normal immature cerebellar granule neurons. We found that in MB, the expression patterns of miRNA-Xs that we have identified as the gatekeeper in MB development, were well correlated with the differentiation state of MB cells. Mis-expression of miRNA-X induced the differentiation of MB stem cell lines (in vitro), and the simultaneous inhibition of miRNA-Xs with Ptc1 cKO in granule cell progenitor cells induced the cancer stem cell-dominant MB (in vivo).

These results indicate that miRNA-Xs must be involved in making the hierarchy of MB cells, promising their application to eradicate the cancer stem cells for MB cure.

研究分野：分子神経発生学、脳腫瘍生物学

キーワード：脳腫瘍 小脳髄芽腫 miRNA 癌幹細胞 shh シグナル Patched-1 ニューロン分化 神経前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍には治療標的となりうる癌幹細胞は存在するのか？治療標的として癌幹細胞を考える際、癌幹細胞を頂点とした癌細胞の階層性が前提条件となる。しかし研究開始当初、この階層性は愚か小脳腫瘍(髄芽腫)を構成する癌細胞の多様性・種類すら不明であった。

2. 研究の目的

Ptc1 遺伝子ノックアウトマウスに発生する小脳髄芽腫をモデルシステムとして、その小脳腫瘍を構成する癌細胞の多様性と階層性の有無を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Ptc1 ヘテロマウスに発生する小脳髄芽腫について、分化・増殖マーカーを用いた免疫組織学的(IHC)解析ならびに分子遺伝学的に散発性蛍光標識した小脳髄芽腫細胞の3D形態(3D-CM)解析を行った。さらに髄芽腫細胞の分化度と一致した発現様式をとる miRNA-X について、樹立した髄芽腫癌幹細胞株を用いて miRNA-X のトランスフェクションによる分化誘導能試験及び Ptc1 コンディショナルノックアウトマウスを用いての Ptc1 及び miRNA-X の二重阻害によって誘導される小脳髄芽腫の細胞構成について免疫組織学的解析を行った。

4. 研究成果

未分化顆粒前駆細胞マーカー Atoh1 陽性の小脳髄芽腫細胞を Cre/lox システムを用いて低濃度タモキシフェン投与によって散発性に恒久的 GFP 標識を行い、その髄芽腫細胞さらに娘細胞について経時的に 3D-CM 解析を行った。その結果、GFP 標識直後においては双極性および単極性形態の細胞がドミナントであり、その細胞形態は胎生期あるいは生後の正常な顆粒前駆細胞とよく酷似していることが明らかになった。また少数ながら多極性の大型細胞の存在も認められた。GFP 標識 120 時間後には、GFP 標識クローン内の一部の娘細胞が、顆粒細胞ニューロンと似た未熟型 dendrite 構造を有するニューロン様細胞となることを明らかにした。以上の結果は IHC 解析の結果とよく一致しており、小脳髄芽腫では少なくとも一部の髄芽腫(幹)細胞が、正常

の小脳顆粒細胞の発生とよく似た分化シークエンスをとることによって、癌細胞の多様性・階層性を形成していることが示めされた。

この知見に基づいて本研究代表者の一連の研究(平成 22-23 年度 挑戦的萌芽研究「miRNA の迅速かつ安価な in vivo 解析技術の開発と脳腫瘍への応用」)から、Ptc1 を欠損した生後の小脳顆粒前駆細胞及び前がん細胞の分化に働く miRNA-X に着目した。小脳髄芽腫における miRNA-X の発現パターンを解析した結果、上述の髄芽腫細胞の分化度と一致した発現パターンをとっていることが示された。そこで次に髄芽腫細胞の分化度、細胞多様性及び階層性の形成に、この miRNA-X が関与しているか否かを明らかにするために、Ptc1 ヘテロマウスに発生した小脳髄芽腫より髄芽腫癌幹細胞株を樹立(9株)し、これに対して miRNA-X のトランスフェクションを行い、その分化誘導能を解析した。その結果、トランスフェクション 4.5-6 日後に、Sox2 癌幹細胞マーカー陽性細胞がほぼ消失し、Dcx 陽性の分化型増殖細胞へ分化することが示された。さらに Ptc1 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、核移行型 Cre リコンビナーゼ発現ベクターならびに miRNA-X 機能阻害カセットを挿入したトランスポゾンベクターを生後 7 日小脳顆粒前駆細胞へ in vivo エレクトロポレーションにより導入し、Ptc1 及び miRNA-X の二重阻害された小脳髄芽腫の細胞構成について免疫組織学的解析を行った。その結果、髄芽腫癌幹細胞マーカー Sox2 陽性の細胞がドミナントである小脳髄芽腫が形成されていることが示された。以上の結果は、miRNA-X が髄芽腫癌幹細胞の分化に働き、髄芽腫の細胞多様性ならびに階層性の形成に働いていることが示された(投稿準備中)。

本研究結果は同時に、miRNA-X の補充療法あるいは発現誘導が髄芽腫癌幹細胞の根絶治療に極めて有効であることを意味する。

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5件)

Iizuka T, Kamiya K, Gotoh S, Sugitani Y, Suzuki M, Noda T, Minowa O, Ikeda K. Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness. *Hum. Mol. Genet.* 2015 Jul 1;24(13):3651-3661.

Kidokoro Y, Karasawa K, Minowa O, Sugitani Y., Noda T, Ikeda K, Kamiya K. Deficiency of Transcription Factor Brn4 Disrupts Cochlear Gap Junction Plaques in a Model of DFN3 Non-Syndromic Deafness. *PLoS One.* 2014 9(9); e108216

Kamiya K, Yum SW, Kurebayashi N, Muraki M, Ogawa K, Karasawa K, Miwa A, Guo X, Gotoh S, Sugitani Y., Yamanaka H, Ito-Kawashima S, Iizuka T, Sakurai T, Noda T, Minowa O, Ikeda K. Assembly of the cochlear gap junction macro-molecular complex requires connexin 26. *J. Clin. Invest.* 2014 124(4); 1598-1607

Yumoto T, Nakadate K, Nakamura Y, Sugitani Y, Sugitani-Yoshida R, Ueda S, Sakakibara S. Radmis, a novel mitotic spindle protein that functions in cell division of neural progenitors. *PLoS One.* 2013 Nov. 8 8(11); e79895

Massa F, Garbay S, Bouvier R, Sugitani Y, Noda T, Gubler MC, Heidet L, Pontoglio M, Fischer E. Hepatocyte nuclear factor 1beta controls nephron tubular development. *Development.* 2013 Feb;140(4):886-96.

〔学会発表〕(計8件)

Sugitani Y., Sugitani-Yoshida R., Yaginuma K., Nakai S., Ogawa M., Minowa O., Noda T. The temporal-codes of neural stem cells underlying the cell diversity and the tumorigenesis in mice. (招待講演)
第48回日本発生生物学会
2015.6.5 つくば

杉谷 善信、杉谷(吉田)玲子、中井 茂康、美野 輪 治、小川 正晴、野田 哲生
大脳新皮質の細胞多様性の形成に必須な Brn 転写因子の作用形式
第37回日本分子生物学会年会
2014.11.25 横浜

Sugitani Y., Yaginuma K., Noda T. Molecular basis underlying the multi-step process in spontaneous medulloblastoma development.
第73回日本癌学会学術総会
2014.9.27 横浜

Sugitani Y., Sugitani-Yoshida R., Nakai S., Ogawa M., Minowa O., Noda T. Different functional modes of Brn factors contribute to generate diverse projection neurons and glial cells in neocortex.
Gordon Research Conference, Neural Development 2014
2014.8.14 Newport, USA

Sugitani Y., Yaginuma K., Noda T. Molecular basis underlying the multi-step process in spontaneous medulloblastoma development.
第36回日本分子生物学会年会
2013年12月3日~2013年12月6日 神戸
Sugitani Y., Yoshida R., Nakai S., Ogawa M., Minowa O., Noda T.

Different functional modes of Brn factors contribute to generate diverse projection neuron phenotypes in neocortex.

第35回日本分子生物学会年会

2012年12月11日～2012年12月14日 福岡

Sugitani Y., Yaginuma K., Noda T.

Nmyc- targeting miRNAs provide the genetic robustness of cerebellar granule neuron differentiation against Ptc1 loss.

第71回日本癌学会学術総会

2012年09月19日～2012年09月21日 札幌

Sugitani Y., Yoshida R., Nakai S., Ogawa M., Minowa O., Noda T.

Different functional modes of Brn factors contribute to generate diverse projection neuron phenotypes in neocortex.

Gordon Research Conference, Neural Development 2012

2012年08月12日～2012年08月17日 USA

Newport

〔図書〕(計0件)

〔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〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉谷 善信 (SUGITYANI, Yoshinobu)

(公財)がん研究会・がん研究所・研究員

研究者番号：80360569

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし