

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462275

研究課題名(和文) 神経幹細胞、神経膠芽腫癌幹細胞における転写因子Evi1 の機能解明

研究課題名(英文) Function of Ecotropic Viral Integration Site 1 (EVI1) gene in neural precursor cells and human glioma cells

研究代表者

横上 聖貴 (Kiyotaka, Yokogami)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：40284856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： EVI1は、脳神経の形成過程や、脳腫瘍(退形成上衣腫や神経膠芽腫)との関連が示唆されているが詳細は不明であった。本研究では、マウスを用いて神経発生における関与を解明した。EVI1ヘテロ欠損マウスから摘出した神経幹細胞は、ワイルドタイプの神経幹細胞に比較して、Notch 経路の異常を来し、未分化性を保つことが困難となった。

次に脳腫瘍ヒトグリオーマ細胞では、EVI1 は、このepidermal growth factor receptor (EGFR) の転写調節に関与し、腫瘍の増大や悪性化をもたらしていた。またEGFR の発現を通してグリオーマ幹細胞の維持に関与していることを証明した。

研究成果の概要(英文)： Ecotropic viral integration site 1 (EVI1) gene encodes a transcription factor, containing ten zinc finger motifs. Abnormal expression of EVI1 is found in 5-10% of patients with acute myeloid leukemia, and is also associated with poor outcome of patients with glioblastoma and ependymoma. EVI1 maintains the self-renewal capacity of hematopoietic stem cell. However, it is unclear how EVI1 acts in normal brain development and in brain tumor development. In this study we found that EVI1 (-/-) neural precursor cells (NPCs) differentiated to neuron and glial cells earlier than wild type. Notch signals were altered in EVI1(-/-) NPCs. In glioblastoma, we found that EVI1 transcriptionally regulates the EGFR gene expression. Because EGF signaling in glioma initiating cells (GICs) is necessary to maintain the stemness, EVI1 has a pivotal role to maintain the GICs through EGFR gene expression.

研究分野：脳神経外科

キーワード：EVI1 EGFR neural precursor cell glioma glioma initiating cell NOTCH

1. 研究開始当初の背景

Ecotropic viral integration site-1(Evi1) 遺伝子はマウス白血病ウイルス由来骨髄性白血病から単離された転写因子で、3番染色体 q26 領域のゲノム異常(3q21q26 症候群)を含む成人骨髄性白血病 (AML) の 7-10%で高発現する予後不良因子として知られている。EVI1 欠損マウスは 10.5 日で胎児死亡する¹⁾が、脳神経系、神経節の発達分化異常をきたす。線虫においても、線虫 EVI1 相同遺伝子 *egl-34* 欠損によって、神経細胞体の移動及び神経軸索の伸長異常が見られる。哺乳類造血系においては、EVI1 欠損によって二次造血以降の幹細胞が減少し、幹細胞維持に重要な役割を持つことが同定されており²⁾、一方で神経幹細胞維持に必須の Musashi (MSI2) が慢性骨髄性白血病急性転化の鍵となっていることや造血幹細胞が、活性型 TGF- β を発現しているグリア細胞をニッチとしていることが発表された³⁾。従って神経系と造血系はニッチで相互作用を来すと考えられ、幹細胞を維持していくうえでの共通のメカニズムが存在する可能性がある。

2. 研究の目的

我々は脳腫瘍において、転写因子 EVI1 が退形成上衣腫⁴⁾や悪性神経膠腫で高発現していることを同定した。EVI1 欠損マウスは脳神経発達異常・造血異常を来し胎児死亡することから、EVI1 は造血幹細胞から骨髄幹細胞への運命決定のみならず、神経幹細胞からの運命決定に係わる可能性が高い。そこでこの研究では、EVI1 発現による神経幹細胞からの神経分化制御における分子機構を明らかにし、さらに脳悪性腫瘍における EVI1 高発現の意味を明らかにする。結果として悪性脳腫瘍、特に、その難治性神経膠腫の glioma initiating cell (GIC) の幹細胞様性格を解明し、将来的に新規診断治療法開発に繋げる基礎研究とする。

3. 研究の方法

- 1) 正常もしくは *EVI1* ヘテロ欠損マウス脳より神経幹細胞を採取し、in vitro 実験系において EVI1 による幹細胞維持機構ならびに神経分化機構を明らかにする。
- 2) ヒトグリオーマ細胞に対し、*EVI1* 強制発現株やノックダウン細胞株を作成し、in vitro で *EVI1* が target とする遺伝子を探索する。

4. 研究成果

- 1) マウス神経幹細胞、ヒトグリオーマ幹細胞において *EVI1* は、Notch シグナル伝達系の発現を調節し、未分化能を維持する働きが示唆される。

野生型及び *EVI1* ヘテロ欠損マウス神経幹細胞を in vitro で培養し、分化誘導を行ったところ、野生型マウスの神経幹細胞に比較して、ヘテロ欠損マウス (*EVI1*^{+/-}) 神経幹細胞は神経細胞への分化が早く、しかもグリア細胞へスイッチングが遅れ、グリア細胞の減少をきたした。また、BMP2 と LIF を用いた、神経幹細胞をグリア細胞へ強制的に分化誘導させる系では、*EVI1* ヘテロ欠損マウス (*EVI1*^{+/-}) から採取した神経幹細胞は、より早くグリアへ分化した (Fig.1)。qPCR では、*EVI1* の低下に伴って神経幹細胞においては Notch1, Dll4 の低下が見られたが (Fig.2)、グリオーマ幹細胞においては Jag1 の低下が見られた。いずれも Notch シグナル伝達系のリガンドとレセプターであり、Nestin や Sox2 の低下も見られることから、*EVI1* は未分化性を維持する機能があると考えられた。

Fig.1 Neurospheres derived from *Evi1*^{+/-} mice showed a tendency to effectively differentiate

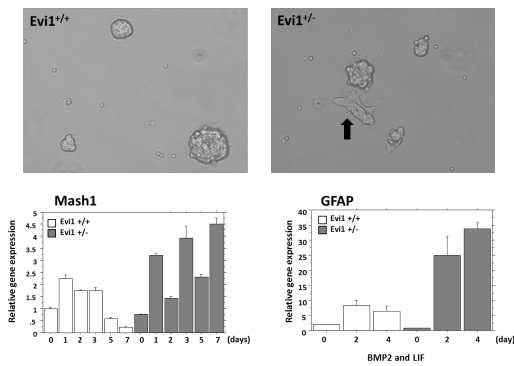
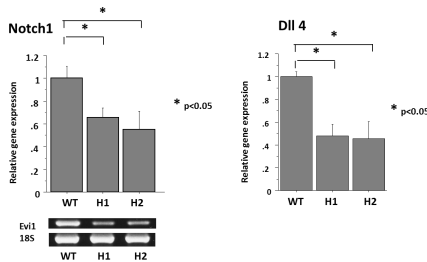


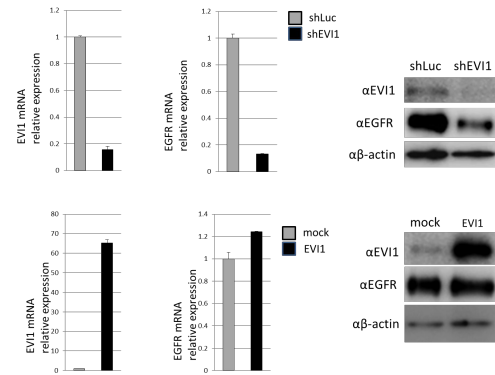
Fig.2 Alteration of Notch signal in neurospheres from *Evi1*^{+/-} mouse



3) グリオーマ細胞において *EVI1* の発現量により、EGFR の発現量は変化した。

神経幹細胞から分化した神経前駆細胞の増殖に必須の上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) シグナルは Notch シグナルと密接に関連するとの報告があることや、上記のように神経前駆細胞に性格が酷似する悪性グリオーマ幹細胞において、*EVI1* の発現量が EGF を介した腫瘍細胞の増殖に変化をもたらすことから、*EVI1* が EGF シグナルにも何らかの影響を及ぼすのではないかと考えた。YKG1 および、グリオーマ幹細胞 GIC に *shEVI1* を導入したノックダウン細胞株や、*EVI1* 強制発現株を用いて、EGFR の発現状況を検査した。結果は Fig.3 に示したように、EGFR mRNA は、*EVI1* の発現が低下すると低下し、*EVI1* の発現が増加すると増加した。蛋白の発現も同様であった。

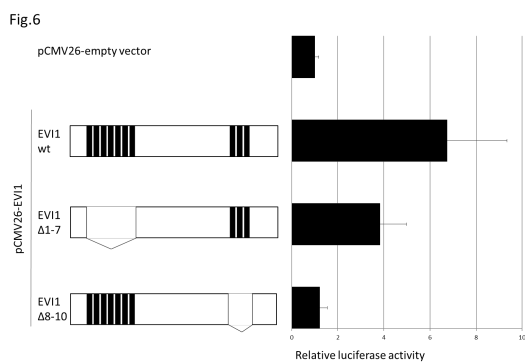
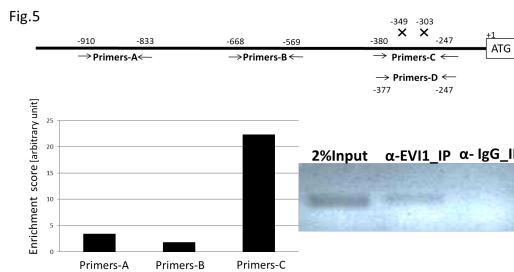
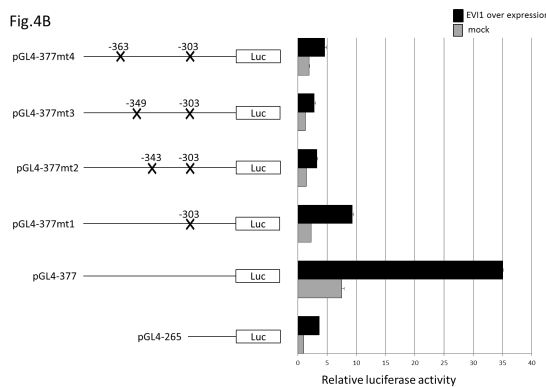
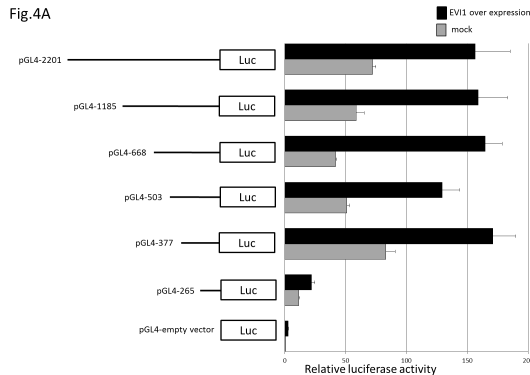
Fig.3



4) *EVI1* は EGFR の転写制御を行っていた。

EVI1 転写産物が転写因子であることから、*EVI1* と EGFR promoter の関係を調べることにした。上記結果を基に考えると、*EVI1* が EGFR プロモーターの転写活性を増加させるのではないかと仮説を立てた。まず、ヒト *EGFR* 遺伝子プロモーター領域を転写開始点から 2.8kb 上流までのプロモーターをクローニングし [pGL4.10 Vector](#) にインサートしたレポーターアッセイ用プラスミドを構築した (pGL4-huEGFR-2201)。転写活性を解析するため、deletion mutant を作成。(Fig.4A) (pGL4-huEGFR-1185, -668, -503, -377, -265) その結果、転写開始点から 130 bp 上流まで (特に -20 ~ -108bp 上流) が重要ではないかと推測した。また、in silico で結合領域 ETS-like motif を 4 か所推測し、転写開始点から -303bp, --343bp, --349bp, --363bp の部分に点変異を導入したレポータープラスミドを作成して検討した。その結果、3種類の細胞株において、-303bp の結合部位が最も重要で、その次に-343p, -349bp が重要ではないかと考えられた (Fig.4 b)。次に ChIP を行ったところ、-380bp ~ -247bp に対する primer を用いて増幅した PCR 産物は他の部位に比べ 5 倍超の enrichment を観察できた (Fig.5)。また、*EVI1* には ZNF domain が 2 つあるため、それぞれの mutant を用いて、*EVI1* のどの部位が EGFR プロモーターと反応するのかを検討

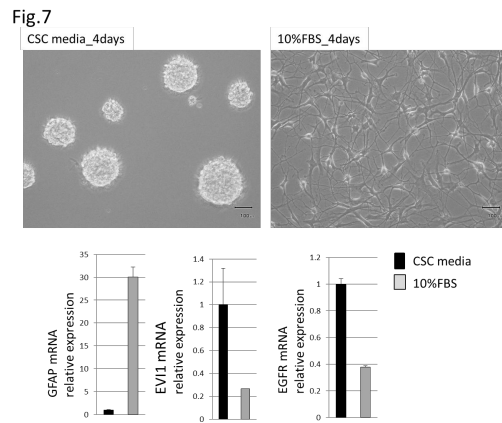
したところ、N 末端側 DNA 結合ドメインにおいて結合している可能性が高いことが判明した(Fig.6)。



5) GICにおいて、EV11はNestinの維持に関与する

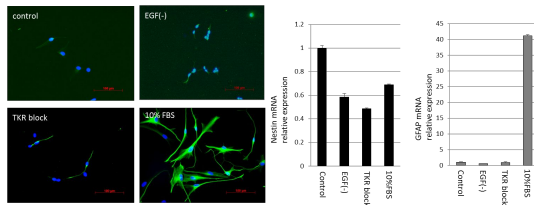
グリオーマ幹細胞において、EV11が幹細胞性維持に関与しているかどうかについて調べるために、GICを、CSC用培地で floating

の状態に培養した群と、10%FBS含有培地で分化誘導を行った群の2群に分けて4日間培養を行い、その後mRNA量を比較した。CSC培地で培養していたGIC群はmammosphereの形態をとり、10%FBS含有培地で培養した群では、グリア細胞への分化傾向を示した。(Fig.7)これらの二群間で、EV11およびEGFRのmRNAの発現レベルをqPCRにて評価したところ、EV11およびEGFRは減少し、一方GFAPが上昇した。次に、GICに対し、ウィルスベクターを用いてEV11をノックダウンし、G418で7日間薬剤セレクションを行った。CSC用培地で培養していたが、EV11、EGFRだけでなくNestinのmRNA量にも減少傾向を認めた。EGFR下流の刺激伝達とNestinの発現との関係について調べるために、さらに以下の実験を行った。



ラミニンコート皿でCSC用培地にて接着培養していたGICを、(1)CSC用培地、(2)CSC用培地からEGFを除去した培地、(3)CSC用培地にチロシンキナーゼ阻害剤を添加(TKRblocking)した培地、(4)10%FBS含有培地の5群に分けて、3日間培養した。(1)~(4)の細胞間で、NestinおよびGFAPのmRNA発現量を比較した結果、EGFを除去した培地、あるいはEGFR阻害剤を添加した培地で培養したGICにおいては、Nestinの発現が減少していた(Fig.8)。

Fig.8



以上から、EVI1 は、神経幹細胞並びにグリオーマ幹細胞において、未分化性の維持に働いていることが判明した。特に、グリオーマ幹細胞においては、未分化性維持並びに腫瘍の増大、悪性転化のために必須の EGFR の転写制御行っているため、新たな治療ターゲットとなることが示唆された。

<引用文献>

1) The Evi1 proto-oncogene is required at midgestation for neural, heart, and paraxial mesenchyme development. Hoyt PR, Bartholomew C, Davis AJ, Yutzey K, Gamer LW, Potter SS, Ihle JN, Mucenski ML. Mech Dev. 1997 Jul;65(1-2):55-70.

2) Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. Yuasa H, Oike Y, Iwama A, Nishikata I, Sugiyama D, Perkins A, Mucenski ML, Suda T, Morishita K. EMBO J. 2005 Jun 1;24(11):1976-87. Epub 2005 May 12.

3) Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Cell. 2011 Nov 23;147(5):1146-58. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.053.

4) The transcription factor evi-1 is overexpressed, promotes proliferation, and is prognostically unfavorable in infratentorial ependymomas. Koos B, Bender S, Witt H, Mertsch S, Felsberg J, Beschorner R, Korshunov A, Riesmeier B, Pfister S, Paulus W, Hasselblatt M. Clin Cancer Res. 2011 Jun 1;17(11):3631-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0175. Epub 2011 Apr 14

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 6 件)

1, 横上聖貴, 水口麻子, 山崎浩司, 齋藤清貴, 松元文孝, 竹島秀雄: 脳腫瘍における転写因子 EVi1 の機能解明. 第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2015, 12, 7 京都府, 京都市

2, 横上聖貴, 水口麻子, 山崎浩司, 齋藤清貴, 松元文孝, 竹島秀雄: 脳腫瘍における転写因子 EVi1 の機能解明. 第 16 回日本分子脳神経外科学会, 2015, 8, 28, 静岡県浜松市

3, 横上聖貴, 水口麻子, 山崎浩司, 竹島秀雄: マウス神経幹細胞とグリオーマ細胞における EVi1 の機能解析. 第 32 回日本脳腫瘍病理学会学術集会, 2014, 11, 30 千葉県浦安市

4, 横上聖貴, 水口麻子, 山崎浩司, 齋藤清貴, 松元文孝, 竹島秀雄: マウス神経幹細胞とグリオーマ細胞における EVi1 の機能解析. 日本脳神経外科学会第 73 回学術総会 2014, 10, 9 東京都港区

5, 横上聖貴, 水口麻子, 山崎浩司, 齋藤清貴, 松元文孝, 竹島秀雄: マウス神経幹細胞とグリオーマ細胞における EVi1 の機能解析. 第 32 回日本脳腫瘍病理学会, 2014, 5, 24 徳島県徳島市

6, 横上聖貴, 水口惣平, 水口麻子, 山崎浩司, 竹島秀雄: マウス神経幹細胞とグリオーマ細胞における EVi1 の機能解析. 第 31 回日本脳腫瘍学術集会, 2013, 12, 9 宮崎県宮崎市

〔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

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/neurosurgery/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横上 聖貴 (YOKOGAMI, Kiyotaka)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：40284856

(2) 研究分担者

山下 真治 (Yamashita, Shinji)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40468046

水口 麻子 (MIZUGUCHI, Asako)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：00647472

水口 惣平 (MIZUGUCHI, Souhei)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：50398103

竹島 秀雄 (TAKESHIMA, Hideo)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70244134

森下 和広 (MORISHITA, Kazuhiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：80260321

(3) 連携研究者