

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861269

研究課題名(和文) 神経膠芽腫におけるホメオタンパク質の機能解析と特異的ペプチドの機能評価

研究課題名(英文) Analysis of Homeobox genes and specific peptide for molecular therapy in Glioblastoma

研究代表者

長谷川 仁紀 (Hasegawa, Hitoki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10454381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫を含む神経膠腫検体においてPRRX1遺伝子が過剰発現していることを明らかにした。PRRX1の発現を抑制すると、神経膠芽腫由来細胞の浸潤能、腫瘍形成能が低下することが分かった。また、PRRX1はNotchパスウェイを活性化し、それにより制御される転写産物HES1遺伝子の発現を促進することが分かった。Notchパスウェイの不活化はこの細胞の浸潤能を著しく阻害し、またPRRX1とHES1の発現は相関関係にあることから、PRRX1の過剰発現によるNotchパスウェイの活性化と下流因子の転写活性促進がこの癌の悪性化に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The expression levels of PRRX1 mRNA were increased in most of the low grade and high-grade glioma samples when compared to the levels in the normal brain tissues. The depression of PRRX1 suppressed the invasion and neurosphere formation of glioblastoma cells. We also found specific activation of the Notch pathway in PRRX1-expressing cells. Consistent with the activation of Notch signaling, increased levels of HES1 mRNA and protein by PRRX1 expression were observed. We found a correlation between PRRX1 and HES1. Our results indicate that the activation of Notch signaling by PRRX1 is associated with the promotion of glioblastoma cell invasion and tumorigenicity.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：神経膠芽腫 ホメオボックス Notch PRRX1

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫は高い浸潤能と増殖能を持ち、その治療は難しいことが知られている。現在、外科的手法による治療が主に行われており、化学療法を含めてその治療法は未だ確立していないのが現状である。新たな治療法開発のために盛んに研究が行われ、神経膠芽腫悪性化のメカニズムが少しずつ明らかにされてきている。その一例として、タンパク質の一部が欠失し、その異常なタンパク質の発現が異常な活性化を誘導し、高い増殖能と浸潤能をもたらすことが明らかとなっている。一方、神経膠芽腫において正常組織とは異なる異常な発現を示すタンパク質も同様に多く報告されており、これらが悪性化の原因になっていることが示されている。新たな治療法開発のきっかけを見つけるべく、独自の方法によって神経膠芽腫で過剰発現している遺伝子を新たに多数同定した。その中で本研究が注目したのがホメオボックス遺伝子群である。人では200種類以上存在するこの遺伝子は、主に発生に関与する一方、癌の形成、悪性化にも関与することが知られている。解析の結果、7個のホメオボックス遺伝子が神経膠芽腫にて過剰発現していることを発見した。本研究では、これらが神経膠芽腫の悪性化に果たす役割を解明することを試みる。

2. 研究の目的

独自の方法により同定した7個のホメオボックス遺伝子について、神経膠芽腫の悪性化のメカニズムに果たす役割を解析し、ペプチド治療への応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

神経膠芽腫由来細胞として T98、SKMG1、U251nu/nu、A02、U251sp、U87 細胞を用いた。

(2) ウイルスを用いた細胞株の作製

GFP を融合した PRRX1 タンパク質を発現する細胞株をレトロウイルスベクターにより作製した。GFP タグをつけたレトロウイルスベクターに PRRX1 遺伝子を導入し、GAG、POL 遺伝子と共に 293 細胞に一過性に導入してウイルスを産生した。ウイルスを目的とする細胞に感染させて、各抗生物質により発現細胞を選択し、細胞株として樹立した。

(3) siRNA、shRNA を用いた実験

PRRX1 の機能を解析するために、目的遺伝子の発現抑制実験を行った。siRNA はライフテクノロジー社、siDIRECT により特異性の高いものを設計した。また shRNA も同様に設計し、shRNA 発現ベクターに導入した。これらを LIPOFECTAMINE2000 により各細胞内に導入した。

(3) 浸潤能の解析

癌細胞の浸潤能を調べるため、ボイデンチャンバー法を用いた。フィルターをマトリゲルにてコートしたチャンバーを使い、チャンバー上室に細胞を重層し、下層に培養液を入れた。一定時間培養し、マトリゲルを浸潤してフィルター下面に移動した細胞の数を計測した。

(4) Neurosphere 形成実験

神経膠芽腫由来細胞の腫瘍形成能を評価するために、Neurosphere 形成実験を行った。細胞を FGF、EGF を入れた培地内で細胞を培養した。2週間後、50 μm を超える Sphere の数を計測した。

(5) レポーターアッセイ

各シグナリング経路の活性化を調べるため、レポーターアッセイを行った。pRTK-Luc (ルシフェラーゼ) をコントロールとし、各シグナル経路に対するレポーターコンストラクトを作製した。それらを細胞に導入し、デュアルルシフェラーゼアッセイ法により各レポーターのルシフェラーゼ活性を測定した。

(6) ノードマウス移植実験

PRRX1 の神経膠芽腫形成における役割を *in vivo* にて評価するため、U87 細胞株と shRNA により PRRX1 の発現を抑制した同細胞株をそれぞれノードマウスに移植し、その後の腫瘍形成の状態と生存率を比較検討した。

4. 研究成果

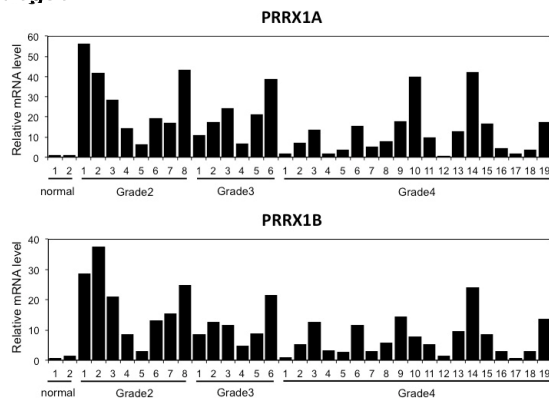
独自の解析により神経膠芽腫で7個のホメオボックス遺伝子 SHOX2、TGIF1、TGIF2、PRRX1、SIX4、IRX3、GBX3 が特異的に発現亢進していることを見出した。これらの遺伝子の過剰発現は神経膠芽腫由来の細胞株である U251MG、U87 細胞でも発現亢進していることが確認され、これらの遺伝子の神経膠芽腫悪性化における重要性が推測された。さらなる検討の結果、これら遺伝子の中で PRRX1 が最も高い発現と悪性化の相関が見られたことから PRRX1 を主に解析することとした。

PRRX1 (Paired related homeobox 1) はホメオボックス遺伝子の一つであり、発生過程において重要であることが示されている。その発現は、骨格筋、心筋などで高いことが知られている。一方、腫瘍の悪性化との関連性についても示唆されているものの、神経膠芽腫との関連性については未だ明らかにされていない。

神経膠芽腫における PRRX1 の役割を明らかにすることを試みるために、まず臨床サンブ

ルにおける PRRX1 の発現を確認した。神経膠芽腫を含むグレードの異なる神経膠腫を 19 サンプル回収した。それらをもとに RT-PCR によって PRRX1 遺伝子の発現を確認した。PRRX1 は A、B という二つのアイソフォームを持つことが知られている。この二つはほとんど同一のものであるが、B のみ OAR ドメインが付加されている。念のため、この二つの遺伝子の発現をそれぞれ確認することとした。結果として、二つのアイソフォームともに、これら臨床検体では正常組織に比べて非常に高い発現を示すことが明らかとなった (Fig.1)。一方、二つのアイソフォームの発現に大きな差異は見られなかった。さらに、神経膠芽腫由来細胞株でも同様の結果を得た。以下の実験では、A と B それぞれについて同様の実験を行っている。特に個々の記載がない限り、同様の結果を得たものとする。

Fig.1



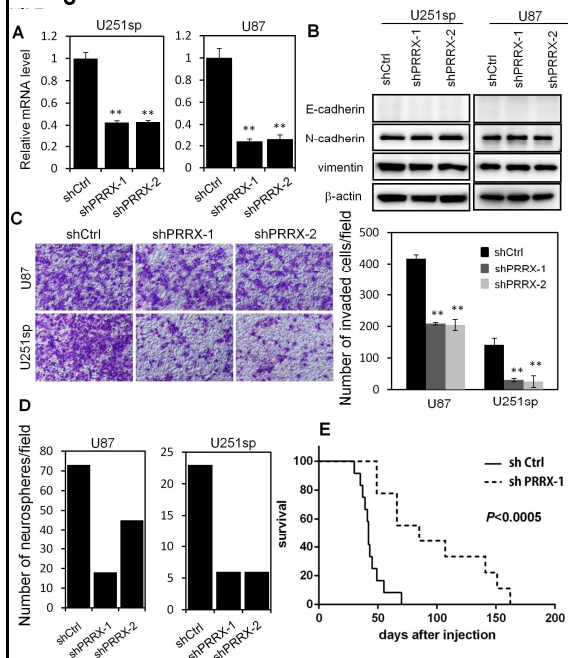
次に PRRX1 の機能を詳細に検討するために、神経膠芽腫由来細胞株を用いた実験を行うこととした。PRRX1 の発現抑制に用いるため、二つのアイソフォームに共通する部位を対象に二つの異なる shRNA を作製した。レトロウイルスを用いて細胞内に導入し、その対象となる PRRX1 の遺伝子発現を確認したところ顕著な減少が見られた (Fig.2A)。この PRRX1 の発現抑制系を用いて、2 種の神経膠芽腫細胞株 U251sp と U87 で以下の表現形解析を行った。

Fig.2B では、PRRX1 の発現抑制により EMT 関連タンパク質の発現に変化が見られるかを確認した。代表的な EMT 関連タンパク質であるカドヘリンやビメンチンの発現に大きな変化は見られなかった。次に細胞株の浸潤能における PRRX1 の役割を明らかにするため、インベージョンアッセイを行った。その結果、PRRX1 の発現を抑制すると著しく浸潤能の低下が見られた (Fig.2C)。また、各細胞株の腫瘍形成能を調べるために、*in vitro* neurosphere forming assay を行った。EGF と FGF を含む培地で 2 週間培養してできた Neurosphere の数を計測した。その結果、PRRX1 の発現抑制によって神経膠芽腫細胞株が持つ腫瘍形成能が著しく抑制される結果となった (Fig.2D)。

以上の結果より、PRRX1 は神経膠芽腫由来細胞株の浸潤能、腫瘍形成能において重要な役割を果たすことが明らかとなった。この *in vitro* の結果を参考に、*in vivo* においても同様の結果を得ることを目的として下記の実験を行うことを試みた。

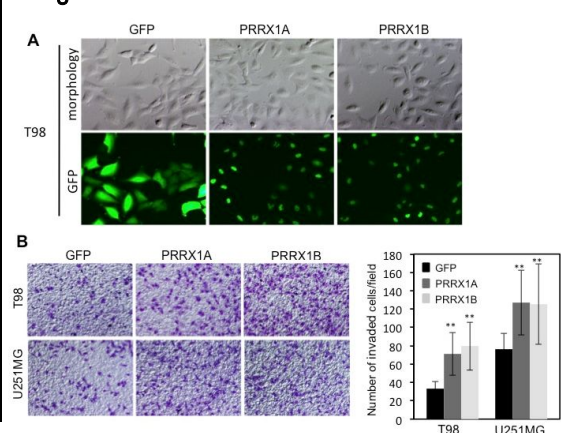
神経膠芽腫由来細胞株 U87 に PRRX1 の shRNA とコントロールの shRNA を導入した新たな細胞株をそれぞれ用意した。それらをマウス脳に移植して、その後の経過を観察した。それらのマウスの生存率を調べたところ、PRRX1 の発現を抑制した U87 細胞株を移植したマウスはコントロールと比較して著しく長く生存することが明らかとなった (Fig.2E)。

Fig.2



PRRX1 の機能をさらに検討するため、過剰発現系を用いた検証を行った。神経膠芽腫由来細胞株の中で、PRRX1 の発現が比較的低い細胞 T98、U251MG に対して GFP タグを融合した PRRX1 遺伝子をレトロウイルスによって導入し、新たな細胞株を作製した (Fig.3A)。PRRX1 の過剰発現がさらなる浸潤能、腫瘍形成能の促進を誘導するかどうかを検討した。

Fig.3



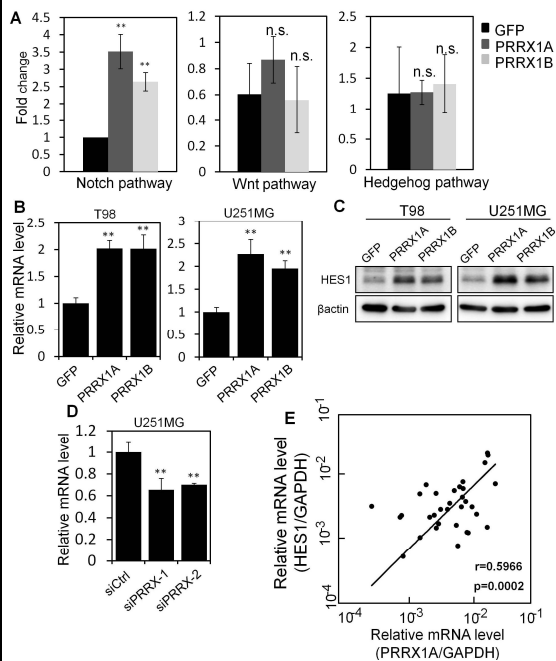
インベーションアッセイの結果より、PRRX1 の過剰発現は浸潤能の促進を誘導した (Fig. 3B)。しかし、*in vitro* neurosphere forming assay では Neurosphere の形成を観察することができず、これらの細胞にて腫瘍形成能を検討することは出来なかった。

神経膠芽腫由来細胞株における PRRX1 の発現抑制系、過剰発現系を用いた検証結果から、PRRX1 は浸潤能、腫瘍形成能に対して重要な役割を果たすことが示唆された。次に、その詳細な分子メカニズムを明らかにすることを試みた。神経膠芽腫細胞では Notch や Wnt、Hedgehog をはじめとする多くのシグナル系の活性化とそれによる神経膠芽腫悪性化との関連性がすでに報告されている。PRRX1 の解析結果から、PRRX1 はこれらのシグナル系の活性化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、PRRX1 がどのシグナル系の活性化に寄与するかをレポーターアッセイにより明らかにした。PRRX1 を過剰発現する T98 細胞株に対して、各シグナル系により転写活性化されるレポーター遺伝子を含むプラスミドを導入し、各シグナル系の活性化レベルをデュアルルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。本アッセイの結果から、PRRX1 の過剰発現が Notch パスウェイを最も活性化することがわかった (Fig. 4A)。さらに、Notch パスウェイによって発現が亢進する代表的な遺伝子 HES1 の発現を RT-PCR により確認したところ、シグナルの活性化に相関してその発現も上昇していた (Fig. 4B)。さらに、遺伝子の発現上昇と共に、その遺伝子産物である HES1 タンパク質の発現の上昇もウェスタンブロッティングにより同様に確認することができた (Fig. 4C)。また、PRRX1 の Notch パスウェイにおける重要性をさらに検討するために、U251 細胞株を用いた PRRX1 発現抑制系での検証を行った。その結果、PRRX1 の発現抑制によって HES1 の mRNA レベルは著しく低下した (Fig. 4D)。念のため、本細胞株の浸潤能、腫瘍形成能における Notch パスウェイの重要性を Notch パスウェイ阻害剤 DAPT を使った実験により明らかにした。細胞株を DAPT で処理すると著しい浸潤能、腫瘍形成能の低下が観察された。

神経膠芽腫特異的な PRRX1 の過剰発現、それを介した Notch パスウェイの異常な活性化、さらにその代表転写産物である HES1 遺伝子の発現上昇という仮説に基づき、臨床サンプルにおける PRRX1 と HES1 遺伝子発現の相関性を検討した。その結果、神経膠芽腫を含む神経膠腫では正常組織と比較して PRRX1 の発現が総じて高く、それに相関するように HES1 遺伝子の発現も同様に高くなっていることが明らかとなった (Fig. 4E)。以上の結果より、神経膠芽腫で特異的に発現が亢進している PRRX1 は Notch シグナルの活性化を誘導することで細胞の浸潤能、腫瘍形成能を促進し、

その悪性化に重要な役割を果たしていることが示された。

Fig. 4



PRRX1 のさらなる機能を解析するために、質量分析器を用いた結合タンパク質の解析を行った。FLAG 融合タンパク質として PRRX1 を過剰発現させた細胞株を作製し、FLAG ピーズにより FLAG-PRRX1 とその結合タンパク質を精製し、質量分析機器により解析を行った。その結果、数種の EMT 関連蛋白質がその結合タンパク質として同定された。また、ホメオボックスタンパク質である PRRX1 はそのホメオドメインを介して転写の制御を司ることが知られている。PRRX1 によって制御される遺伝子を網羅的に明らかにするためにマイクロアレイ解析を行った。その結果、PRRX1 の過剰発現によって特異的に転写が亢進する遺伝子を特定した。特に興味深いのは接着を制御するタンパク質の遺伝子が多く同定されたことである。

これまでの検証結果により、PRRX1 の神経膠芽腫悪性化における重要性を明らかにした。本研究の新たな挑戦として、神経膠芽腫がもつ浸潤能や腫瘍形成能を、ペプチドによる PRRX1 タンパク質機能の阻害によって抑制することを試みる。PRRX1 はそれがもつホメオボックス領域を介して転写の制御をおこなうことが知られている。そこで、ホメオボックスタンパク質である PRRX1 の転写機能を抑制するようなペプチドの開発を行い、PRRX1 のホメオボックス領域に相補するようなペプチドを設計したが、検証を行ったが、十分な結果は得られていない。

本研究では、神経膠芽腫を含む神経膠腫において PRRX1 が過剰発現していること、それらが神経膠芽腫細胞の浸潤能、増殖能に重要

な役割を果たしていること、これらの表現形が PRRX1 による Notch パスウェイの活性化により誘導されていること、PRRX1 は接着因子の転写制御に関わること、EMT 関連因子と結合することなどその機能の詳細を明らかにした。また、PRRX1 の機能阻害による神経膠芽腫細胞の悪性を抑制する方法として、PRRX1 タンパク質に相補するペプチドを作製した。

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3件)

1: Sugiyama M, Hasegawa H, Ito S, Sugiyama K, Maeda M, Aoki K, Wakabayashi T, Hamaguchi M, Natsume A, Senga T. Paired related homeobox 1 is associated with the invasive properties of glioblastoma cells. *Oncol Rep.* 2015 Mar;33(3):1123-30. 査読有

2: Asano E, Hasegawa H, Hyodo T, Ito S, Maeda M, Chen D, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T. SHCBP1 is required for midbody organization and cytokinesis completion. *Cell Cycle.* 2014;13(17): 2744-51. 査読有

3: Sekiya R, Maeda M, Yuan H, Asano E, Hyodo T, Hasegawa H, Ito S, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Kajiyama H, Senga T. PLAGL2 regulates actin cytoskeletal architecture and cell migration. *Carcinogenesis.* 2014 Sep;35(9):1993-2001. 査読有

[学会発表](計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 仁紀 (HITOKI HASEGAWA)

名古屋大学・大学院医学系研究科 研究員

研究者番号：10454381

(2)研究分担者

なし