

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430074

研究課題名(和文) TCTPによる神経幹細胞制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional analyses of TCTP in neural stem/progenitor cells

研究代表者

大多 茂樹 (Ohta, Shigeki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・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

研究成果の概要(和文)：マウス神経幹細胞においてMIFが細胞増殖を制御していることを既に明らかにしたが、MIF下流因子としてTCTP1を新たに同定した。TCTP1はマウス神経幹細胞の細胞増殖制御に関与していた。さらに、ヒトES細胞由来神経幹細胞においても、TCTP1はMIFにより発現制御を受けるとともに神経分化制御にも貢献していた。MIF-TCTP1-miR338-SMOよりなるシグナルカスケードにより、ヒトES細胞由来神経幹細胞の細胞増殖が制御されていることを新たに見出した。また、ヒトグリオーマ幹細胞においても、TCTP1がMIFにより発現制御を受けるとともに、その細胞増殖に貢献していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：MIF (Macrophage migration inhibitory factor) was identified as a functional molecule, which supports the proliferation of murine neural stem/progenitor cells (NSPCs). We also identified a new factor TCTP1 (Tumor Protein Translationally-Controlled 1), contributing to the cell proliferation of mouse NSPCs. TCTP1 gene expression was regulated by MIF and TCTP1 gene silencing defected neurogenesis in human ES cell-derived neural stem cells (hES-NSCs). We also found that MIF-TCTP1-miR338-SMO signaling cascade regulated the cell proliferation in hES-NSCs. In addition, TCTP1 supported the glioma-initiating cell proliferation regulated by MIF.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経幹細胞 グリオーマ幹細胞 TCTP1

### 1. 研究開始当初の背景

(1) Tumor Protein Translationally-Controlled1 (TCTP1, 以下 TPT1 と呼称する) がどのような発現特異性や機能をマウス・ヒト神経幹・前駆細胞 (および脳)・ヒトグリオーマ (およびグリオーマ幹細胞) で有しているかは不明であった。

(2) TPT1 がマウス神経幹・前駆細胞増殖能を有することは、増殖能を指標とした発現クローニング法で同定された因子であったために、研究開始時推測されていた。

(3) MIF (Macrophage migration inhibitory factor) や CHD7 (Chromodomain helicase DNA-binding 7) が神経幹・前駆細胞の細胞増殖・幹細胞性維持に貢献することが申請者らにより既に明らかにされていた。

(4) 神経幹・前駆細胞やグリオーマ幹細胞において MIF や CHD7 により TPT1 がどのように制御されているのか、TPT1 下流においてどのような因子が機能しているかは不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) マウス神経幹・前駆細胞における TPT1 の発現制御様式や機能を明らかにする。

(2) マウス胎生期神経新生における TPT1 の機能を明らかにする。

(3) ヒト神経幹・前駆細胞 (ヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞) における TPT1 の機能解明を行う。

(4) グリオーマにおける TPT1 の発現様式を明らかにするとともに、グリオーマ幹細胞における TPT1 の機能を明らかにする。

### 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<sup>1)</sup>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より、ヒト EGF, FGF2 (PeproTech) および B27 (Thermo Fisher Scientific) を含む Neurobasal 培地 (Thermo Fisher Scientific) を用いて初代培養を行った。分化誘導実験では、完全培地から EGF, FGF2 を除き分化誘導を図った。

(2) グリオーマ幹細胞・ヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞培養

使用したグリオーマ幹細胞は慶応義塾大学医学部で樹立された<sup>2)</sup>。培養法は EGF, FGF2, LIF 存在下、ニューロスフェア培養法を用いた<sup>2)</sup>。ヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞は Thermo Fisher Scientific 社より購入し、StemPro NSC SFM 培地を用いて

Cellstart (Thermo Fisher Scientific) 細胞マトリックス上で培養した。

(3) マウス子宮内胎仔脳電気穿孔法  
ICR 胎生 14 日マウス子宮内胎仔脳内にプラスミド DNA を電気穿孔法により導入した<sup>3)</sup>。

(4) 抗体および試薬

TPT1 (MBL), TuJ1, GFAP, Actin (Sigma), SOX2 (R&D Systems), Hh-Agl.5 (Cellagen Technology)。

(5) 遺伝子発現解析

Trizol (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞から RNA を抽出後、ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo) を使用して cDNA 合成を行った。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (Toyobo), Taqman Probe (Thermo Fisher Scientific), StepOne-Plus (ABI) を使用して各遺伝子発現量を定量した。

(6) RNA シークエンシングおよび miR 発現解析

TaqMan<sup>®</sup> Array Human microRNA Card (Thermo Fisher Scientific), Taqman Probe を用いて、miR 発現量を解析した。Total RNA-Sequencing Kit および Ion Proton<sup>™</sup> System, CLC Genomics Workbench を用いて RNA シークエンス解析を行った。

(7) 遺伝子発現・抑制実験

pMX-Tpt1, pMX-TPT1 (独自に構築) を実験に供した。遺伝子導入には ViaFect (Promega) を使用した。shRNA-TPT1 (shTPT1) およびコントロールレンチウイルスベクター (Sigma), パッケージングベクター psPAX2 (Addgene), エンベロープベクター pMD.G を 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に培養上清よりレンチウイルスを回収した。21,000 回転、2 時間の超遠心によりウイルス液を濃縮した。

(8) 細胞増殖・細胞周期アッセイ

細胞の生存率は CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて解析した。細胞周期は、MultiCycle for Windows (Beckman Coulter) を使用して解析を行った。アポトーシス検出は Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay (Promega) を用いて解析を行った。

(9) 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 (Thermo Fisher Scientific) 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 (LMS710, Zeiss) を用いて解析した。

(10) 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 Fisher 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 メンブレン (GE Healthcare) に転写後、さらに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。

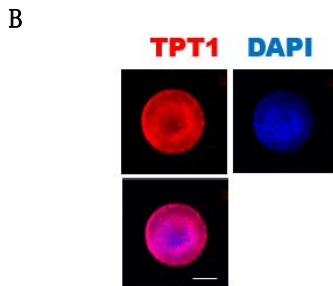
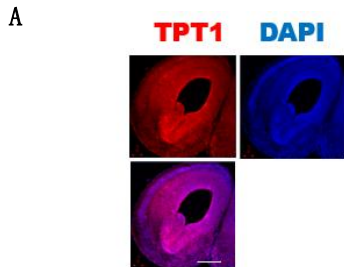
[参考文献]

- 1) Ohta S et al., JCS. 125, 3210-20, 2012.
- 2) Fukaya R et al., Cancer Res., 76, 2813-23, 2016.
- 3) Tabata H et al., Neuroscience, 103, 865-72, 2001.

4. 研究成果

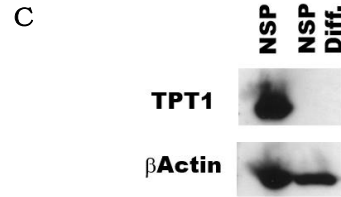
(1) TPT1 発現解析

免疫組織化学的手法により TPT1 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の TPT1 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 TPT1 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 TPT1 が発現していることが示唆された。Scale bar; A, B, 50  $\mu$ m。



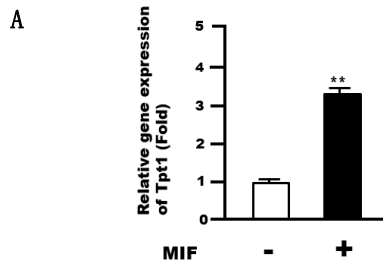
さらに神経幹・前駆細胞培養培地より増殖因子を除き、神経幹・前駆細胞をニューロン・グリア・オリゴデンドロサイト各神経細胞系譜へ分化させた。分化誘導後 5 日で TPT1 蛋白質の発現低下を認めた (図 C)。このことに

より、TPT1 が神経幹・前駆細胞における未分化維持に関与していることが予想された。

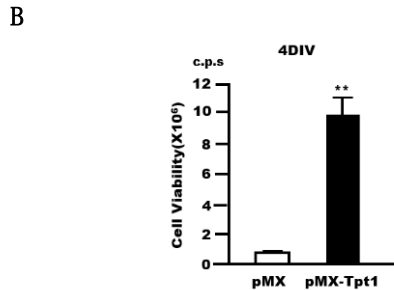


(2) マウス神経幹・前駆細胞における機能解析

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 (24 時間) により Tpt1 遺伝子の発現上昇が認められた (図 A)。



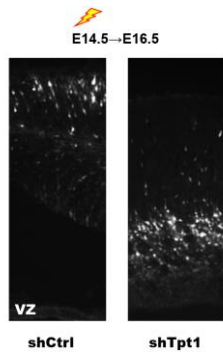
さらに、マウス神経幹・前駆細胞において Tpt1 を過剰発現させたところ細胞増殖の亢進が認められた (図 B)。



我々は、MIF がマウス神経幹・前駆細胞細胞増殖能を有することを既に報告したが、TPT1 が MIF 下流に位置し、その細胞増殖制御に寄与していることが明らかとなった。

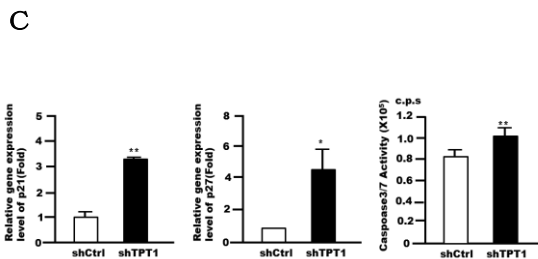
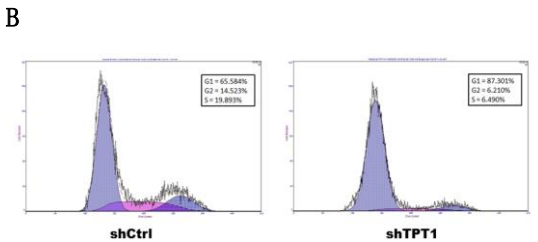
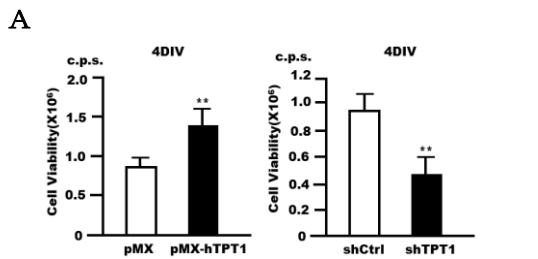
(3) マウス子宮内胎仔脳電気穿孔法による機能解析

マウス胎生 14.5 日において、子宮内胎仔脳電気穿孔法により、shRNA-Tpt1 (shTpt1) 発現ベクター及びコントロールベクターを終脳に導入した。遺伝子導入後 2 日における遺伝子導入細胞を観察したところ、明らかに新生神経細胞移動の遅延を認めた。その原因として、神経幹・前駆細胞細胞における TPT1 発現抑制による細胞周期の遅延が一つの要因として考えられた。

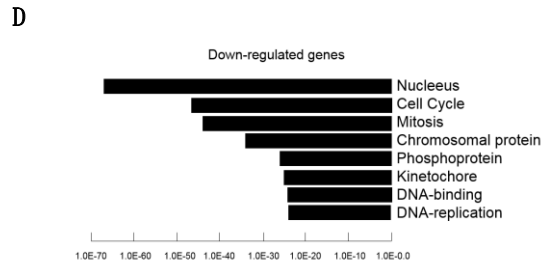


(4) ヒト E S 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞における TPT1 の機能解析

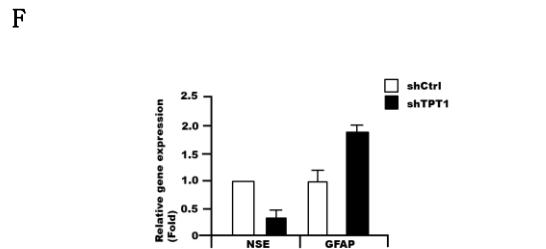
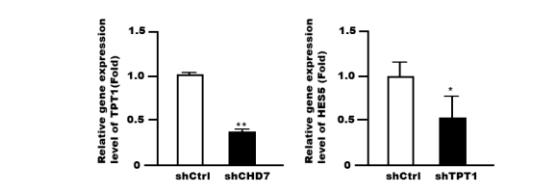
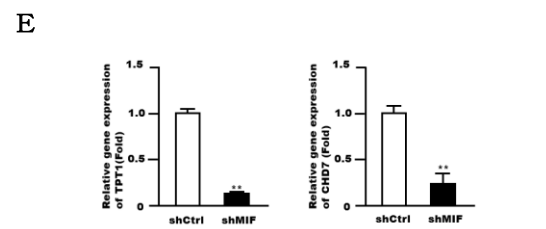
ヒト E S 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞にヒト TPT1 を過剰発現および遺伝子発現抑制させたところ、それぞれ細胞増殖および抑制が認められた (図 A)。さらに、遺伝子発現抑制系において細胞周期解析を行ったところ、S 期の細胞集団の減少を認めた (図 B)。この系において、p21, p27 の遺伝子発現上昇を認めるとともに、アポトーシス誘導も同時に認めた (図 C)。



ヒト E S 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞において、TPT1 の遺伝子発現抑制を行った際にどのような遺伝子発現変化が生じるのかを検証するために RNA シークエンスを行った。その GO ターム解析の結果、細胞周期制御に関与する遺伝子群が優位に変動していることが明らかとなった (図 D)。



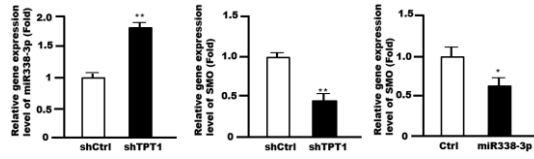
さらに、ヒト E S 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞における遺伝子発現制御解析を行ったところ、MIF→CHD7→TPT1→HES5 からなるシグナルカスケードが存在することが明らかとなった (図 E)。また、TPT1 遺伝子抑制により神経分化が抑制されることも明らかとなった (図 F)。



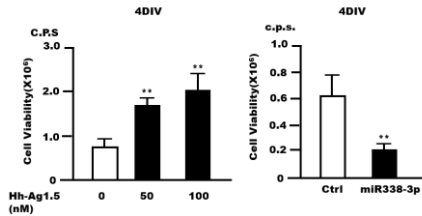
(5) ヒト E S 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞における TPT1 による miR 制御

ヒト E S 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞において、TaqMan® Array Card を用いて TPT1 により発現制御を受ける miR を網羅的に探索したところ、miR338-3p を同定した。さらに、TPT1 および miR338-3p が SMO を標的としていることも明らかとなった (図 A)。ヒト E S 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞では SMO アゴニスト (HhAg1.5) により細胞増殖が濃度依存的に亢進された。また、miR338-3p 過剰発現により、細胞増殖は抑制された (図 B)。これらのことにより、ヒト E S 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞が SMO により細胞増殖の調整を受けていること、TPT1 → miR338-3p → SMO からなるシグナル制御により細胞増殖が調節されることが明らかとなった。

A

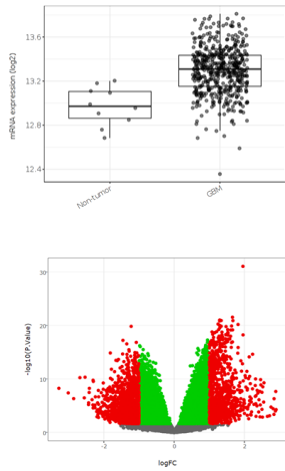


B



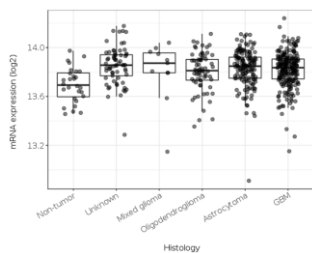
(6) グリオーマにおける TPT1 の機能解析  
 グリオーマにおける TPT1 の発現を各種データベースを用いて解析した。その結果、グリオーマにおける TPT1 の高発現を確認した (図A)。ただし、グリオーマサブタイプによる発現差は認められなかった (図B)。

A



(gliovis.bioinfo.cnio.es/)

B

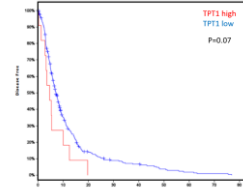


(gliovis.bioinfo.cnio.es/)

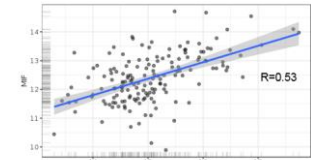
さらに興味深いことに、TPT1 高発現患者群で

は低発現群に比べ全生存期間が悪いこと (図C)、およびグリオーマ患者において MIF と TPT1 間に有意な遺伝子発現相関が存在することも明らかとなった (図D)。

C



D

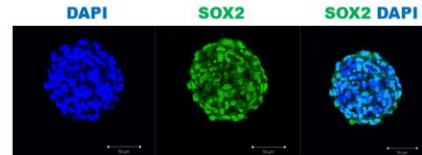


(gliovis.bioinfo.cnio.es/)

(7) グリオーマ幹細胞における TPT1 の機能解析

我々がグリオーマ患者より樹立したグリオーマ幹細胞 (G008 株, 図 A) を用いて、TPT1 の機能解析を行った。

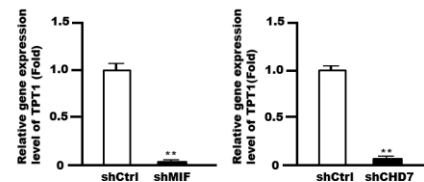
A



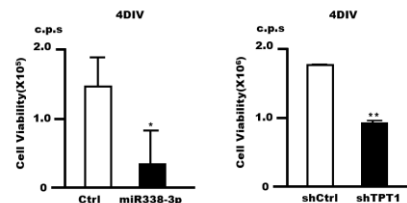
グリオーマ幹細胞における幹細胞マーカー (SOX2) の発現。Scale bar; A, B, 50  $\mu$ m。

我々はグリオーマ幹細胞 G008 株において、MIF および CHD7 がその細胞増殖能に貢献することを明らかにしてきたが、当該グリオーマ幹細胞において、TPT1 遺伝子発現が MIF および CHD7 により発現制御を受けうることを明らかにした (図B)。さらに、ヒト E S 細胞由来神経幹・前駆細胞細胞において TPT1 の発現制御を受けていた miR338-3p の過剰発現や TPT1 の発現抑制により、G008 株の細胞増殖抑制が起きることを新たに見出した (図C)。

B



C



(8)まとめ

マウス神経幹・前駆細胞の細胞増殖因子として TPT 1 を新たに同定したが、TPT 1 が MIF (神経幹・前駆細胞増殖因子として同定済み) による発現制御を受けることを新たに明らかにした。マウス子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いた解析において、TPT 1 の発現抑制は新生神経細胞移動を阻害した。ヒト ES 細胞由来神経幹・前駆細胞においても同様に TPT 1 は MIF による発現制御を受けていることが明らかとなったが、細胞増殖に加えて神経分化にも貢献していることが明らかとなった。また、RNA シークエンスや miR アレイカードによる解析により、MIF-TPT1-miR338-3p-SMO からなる新たなシグナルパスウェイが存在することが、ES 細胞由来神経幹・前駆細胞において明らかとなった。さらに、ヒトグリオーマ幹細胞においても、TPT 1 は MIF や CHD7 により遺伝子発現制御を受けうることや、細胞増殖への貢献を担うことが明らかになった。これらの知見を通して、TPT 1 を制御することがグリオーマ治療対策に貢献しうることが示唆された。今後の TPT 1 を起点としたグリオーマ幹細胞制御機構の解明が重要な課題と言える。

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 1 件)

Ohta S, Yaguchi T, Okuno H, Chneiweiss H, Kawakami Y, Okano H. CHD7 promotes proliferation of neural stem cells mediated by MIF. *Molecular Brain*. 9: 96 (2016). 査読あり.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ohta S, Kawakami Y, Okano H. Functional analyses of TPT1 in neural stem/progenitor cells and glioma initiating cells. ISN 2017 Meeting, 2017年8月20日-8月24日, Le Palais des Congrès de Paris, Paris, France.
- ② Ohta S, Okano H, Kawakami Y. Functional analyses of TPT1 in neural stem/progenitor cells and glioma initiating cells. 第76回日本癌学会学術総会, 2016年9月28日-9月30日, 横浜パシフィコ(神奈川県, 横浜市).
- ③ Ohta S, Kawakami Y, Okano H. TPT1 regulates the proliferation and/or survival of Neural stem/progenitor cells. 第59回日本神経化学大会, 2016年9月8日-9月10日, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市).

[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]

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

なし

(3) 研究連携者

なし

(4) 研究協力者

なし