

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462184

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍の分化制御におけるメチル化CpG結合タンパクMBD1の機能的解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Methyl-CpG-binding domain protein 1 in differentiation process of malignant brain tumor

研究代表者

上羽 哲也 (UEBA, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00314203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メチル化DNA結合タンパクの一つであるMBD1は、メチル化CpGに結合し、転写を抑制するエピジェネティックな情報の媒介因子である。膠芽腫ではMBD1の転写後のスプライシングに異常が生じ、正常細胞では発現量の低い短いアイソフォームを優位に発現している。このスプライシングの制御機構や腫瘍特異的なアイソフォームの機能に関して解析を行った。MBD1のスプライシング異常をモニタリングするシステムを構築した。腫瘍特異的なアイソフォームを阻害することにより膠芽腫細胞の増殖が抑制されることを明らかにした。これらの結果はMBD1の異常が発がんやがん形質に寄与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：MBD1 (Methyl-CpG-binding domain protein 1) binds to methylated CpG and is involved in transcriptional repression and then plays an essential role in transmitting epigenetic information. In glioblastoma (GBM), aberrant splicing of MBD1 has been observed as a post transcriptional mechanism. Shorter isoform of MBD1 is little expressed in normal cells, but is predominantly expressed in GBM. In this study, we analyzed the splicing regulation and function of the tumor-specific isoform. A reporter system was developed for detecting the aberrant splicing of MBD1. Knockdown of the tumor-specific isoform induced growth inhibition in GBM cells. These results suggest that the aberrant splicing of MBD1 contributes to oncogenesis and oncogenic phenotypes.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

メチル化 DNA 結合タンパク MBD1 (Methyl-CpG binding protein 1) は、メチル化シトシンを認識、結合し、様々な転写制御因子と複合体を形成することで転写を抑制するエピジェネティックな情報を媒介する遺伝子である。がんにおいて、エピジェネティック異常が頻繁にみられることと同様に、MBD1 が発がん過程に関与する以下の証拠が蓄積しつつある。MBD1 ノックアウトマウスでは染色体異常が増加する。ヘテロクロマチン領域の DNA 修復に関与する。プロモーター領域の多型が肺がんのリスクを増加させる。発現が膀胱癌の悪性度と反比例する。染色体座 18q21 は、大腸がんや肺がんで LOH が検出される部位である。これらのことから MBD1 の機能や制御機構の解明は、発がんやがん形質を抑制する治療法の開発に有用であると考えられる。

膠芽腫は、診断が下ると集学的治療をもってしても平均余命十数ヶ月である予後不良の原発性脳腫瘍である。この腫瘍では、治療抵抗性や腫瘍再発の原因となる腫瘍幹細胞が含まれ、これに対する標的治療法の開発が期待されている。膠芽腫の幹細胞は上皮成長因子 (EGF) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) をその増殖や未分化性の維持に要求することが知られている。MBD1 は、FGF2 のプロモーター領域に結合し、その転写を抑制する。FGF2 は膠芽腫の増殖や未分化状態の維持に重要な役割を担うことから MBD1 は腫瘍を抑制する遺伝子であると考えられている。また、正常細胞で発現が優性である MBD1 (CXXC-3) の過剰発現は、p53 に変異を示さない膠芽腫細胞の増殖を抑制することも報告されている。MBD1 は 3 つの DNA 結合部位 (CXXC ドメイン) をコードしているが、膠芽腫で優性に発現するアイソフォーム (CXXC-3) はそれを一つ欠いている。膠芽腫において CXXC-3 は、FGF2 の転写抑制も増殖抑制も示さないことを明らかにしている。この CXXC-3 は選択的スプライシングにより作り出されているがその制御機構は不明であり、腫瘍に特異性が高いために治療標的となり得る。しかしながら、CXXC-3 の機能に関しては膠芽腫細胞において過剰発現させても増殖に影響を示さなかったこと以外は調べられていない。

### 2. 研究の目的

膠芽腫における MBD1 の制御機構や機能を明らかにするために、各種細胞における MBD1 の発現量を比較し、MBD1 の腫瘍特異的な MBD1 の選択的スプライシングをモニタリングするシステムを構築する。また、腫瘍特異的なアイソフォームの機能を検討し、その抑制による治療法の開発を行う。

### 3. 研究の方法

正常/腫瘍組織や細胞における MBD1 の各アイ

ソフォームの mRNA の発現量をサイバークリオンを用いた定量的 RT-PCR により測定した。

MBD1 の選択的スプライシングが生じるゲノム領域 (エキソン 11-13) を PCR により増幅し、プラスミドベクターにコードされるプロモーター配列の下流、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入した。選択的スプライシングを受けるエキソン 12 に 1 塩基の挿入変異を導入し、このエキソンが含まれた場合には coding frame が 1 塩基ずれることで下流のルシフェラーゼが翻訳されないベクターを構築した。このベクターを各種細胞にトランスフェクション後、ルシフェラーゼ活性を測定し、mRNA 量との相関性を比較した。

正常細胞で優性に発現する CXXC-3 を認識するウサギポリクロナール抗体をエキソン 12 にコードされるペプチド配列を用いて作製し、ウエスタンブロット法や免疫組織化学染色によりその交差性を確認した。この抗体と購入可能なものを用いて膠芽腫細胞における各アイソフォームの発現量を検討した。

RT-PCR により膠芽腫細胞由来の 1st strand cDNA から CXXC-3 の cDNA を増幅し、発現ベクター pIRESNeo3 に挿入した。このベクターを膠芽腫細胞株 U87MG に遺伝子導入し、G418 を用いた選択培養後にクローニングし、

CXXC-3 の発現をウエスタンブロット法により確認した。樹立した CXXC-3 を高発現する U87MG と対照の細胞を  $5 \times 10^6$  個、ヌードマウス皮下に移植し、2 ヶ月間、その腫瘍形成能を比較した。

腫瘍細胞で優性に発現するアイソフォームである CXXC-3 に特異的なエキソン 11 とエキソン 13 のスプライシングジャンクションを標的とする siRNA を設計した。膠芽腫細胞に対してリポフェクションにより対照 siRNA と CXXC-3 を標的とする siRNA を導入し、3 日後の細胞生存率を WST-8 アッセイにより測定した。ノックダウンの特異性はウエスタンブロット法により確認した。

マウス脳腫瘍モデルにおいて siRNA をデリバリー可能なナノパーティクルを開発するために葉酸を結合したキトサンを主成分とするナノパーティクル (FA-PEG-COL) を合成した。次に、マウス脳腫瘍細胞株 RSV-M をマウス C3H/HeN の腹部の皮下または脳内にそれぞれ  $5 \times 10^6$  または  $1 \times 10^5$  細胞移植し、3 週後に腫瘍形成したマウスの尾静脈に Alexa647 を付加したナノパーティクルを投与し、その脳腫瘍組織への集積を in vivo イメージャーを用いて評価した。

### 4. 研究成果

定量的 RT-PCR により正常細胞・組織の精巣、星状細胞、神経細胞、不死化線維芽細胞株 BJ-5ta とヒト胚性腫瘍細胞 NT2 では MBD1 の 2 つのアイソフォームのうち、CXXC-3 の発現が多く、反対に、全ての膠芽腫細胞株では、以前の報告と一致して CXXC-3 の mRNA が多いことが検出された。一方、一部の膠芽腫幹

細胞の初代培養では、CXXC-3 よりも CXXC-3 を多く発現した。NT2 細胞が腫瘍細胞にも関わらず CXXC-3 を優位に発現していることは、正常細胞や未分化細胞では CXXC-3 が重要である可能性を示唆している。また、正常細胞における CXXC-3 の発現量はかなり少ないが、膠芽腫細胞の CXXC-3 の発現量は正常細胞と近いレベルの発現を示していることから、この2つのアイソフォームの量比が腫瘍特異的に CXXC-3 の発現量が増加していることが重要であると考えられた。

MBD1 の CXXC-3 と CXXC-3 のアイソフォームを産生する選択的スプライシングの制御機構の解析は、腫瘍特異性の高い転写後の修飾機構の一端を明らかにするかもしれない。スプライシングの変化を簡便かつ経時的に追跡可能なシステムを構築するために、CXXC-3 ドメインをコードするエキソン 12 の周辺領域を含む mini gene construct を作成した。エキソン 12 が含まれないスプライシング様式 ( CXXC-3) を示す場合にレポーター遺伝子が発現するベクターを各種細胞に遺伝子導入し、レポーターとして用いたルシフェラーゼ活性と定量的 RT-PCR により定量化した CXXC-3 の発現量を検討すると発現量がある程度高い細胞においては正の相関性が得られた。このベクターをさらに改変することで細胞ソーティングや薬剤耐性による選択培養により、スプライシングフォームの異なる細胞を濃縮後、細胞の性状解析が可能である。

CXXC-3 にのみ含まれるエキソン 12 がコードするアミノ酸配列に由来するペプチドに対するポリクロナール抗体を作成した。ウエスタンブロッティングや免疫細胞化学染色により、CXXC-3 のアイソフォームを特異的に認識することを確認できた。この抗体を用いることで MBD1 の2つのアイソフォーム CXXC-3 と CXXC-3 の悪性脳腫瘍組織や細胞における分布や局在を検討することが可能になった。

膠芽腫における CXXC-3 の機能について検討を加えるために、CXXC-3 を過剰発現する膠芽腫細胞株を樹立し、ヌードマウス皮下への移植により腫瘍形成を試みたが、対照細胞を移植した場合と比較して、造腫瘍性の亢進は観察されなかった。次に siRNA を用いてこのアイソフォーム特異的なノックダウンを試みた。siRNA の標的部位をこのアイソフォームに特異的なスプライシングジャンクションに設定し、膠芽腫細胞への導入による効果をウエスタンブロット法により確認した。この siRNA の導入は CXXC-3 のタンパク量には影響を及ぼさず CXXC-3 のみをノックダウン出来ることが観察された。さらに、

CXXC-3 のノックダウンは、膠芽腫細胞株の細胞増殖を抑制することが観察された。これらのことから、膠芽腫細胞における CXXC-3 の発現量は細胞増殖や腫瘍形成を支持するに十分であり、これを抑制することで抗腫瘍

効果が得られることが分かった。過去に報告されている CXXC-3 の過剰発現が細胞増殖を抑制することを併せて考えると CXXC-3 は CXXC-3 に対して優性阻害効果を示し、細胞の不死化に寄与している可能性が考えられる。

また、この成果を遺伝子治療法の開発に活用するために siRNA を in vivo でデリバリーするナノパーティクルによるシステムを構築した。葉酸をポリエチレングリコールのリンカーを介してキトサンオリゴ糖乳酸に結合したものを合成した。ナノパーティクルの作製は最終段階でトリポリリン酸により処理をすることで行われた。さらに、ナノパーティクルに蛍光物質 Alexa Fluor 647 を結合させたものを合成し、脳腫瘍細胞 RSV-M の腹部の皮下または脳内への移植により腫瘍形成したマウスの尾静脈経路で投与し、数日間、ナノパーティクルの腫瘍組織への蓄積や生体内での動態を観察した。ナノパーティクルは皮下と脳内の両腫瘍組織において数時間後から速やかに蓄積し始めることが観察された。このナノパーティクルを用いて脳腫瘍に siRNA 等の核酸医薬や各種ドラッグがデリバリー可能であることが示唆された。

本課題で作製した抗体を用いた実験により、膠芽腫では CXXC-3 が CXXC-3 と比較して優位に発現していることがタンパクレベルで確認された。CXXC-3 特異的なノックダウンにより MBD1 のアイソフォームの発現制御は選択的スプライシングによることが、確認された。膠芽腫幹細胞の培養細胞では CXXC-3 の発現が優位なものもあり、未分化な細胞では、CXXC-3 の機能が必要である可能性が考えられる。腫瘍細胞のうち、唯一、ヒト胚性腫瘍細胞 NT2 が CXXC-3 を優位に発現していたのも同様の理由であろう。CXXC-3 で欠ける N 末端から3番目の CXXC ドメインが非メチル化 DNA の結合に寄与する報告もあることから限局的ではあるだろうが、従来考えられていたメチル化 DNA への結合を介した転写抑制以外の機能に役立っているかもしれない。事実、MBD1 は DNA 修復にも関与している。膠芽腫細胞における CXXC-3 の特異的なノックダウンは細胞増殖を抑制した。この作用機序に関してはさらなる研究が必要であるが、p53 依存性に膠芽腫の増殖抑制を示す CXXC-3 の過剰発現に対して、CXXC-3 の発現と p53 変異の相関性が無いのであれば、

CXXC-3 特異的なノックダウンは p53 変異に関係なく多くの膠芽腫に対して増殖抑制作用を示す可能性が考えられる。また、安定に CXXC-3 をノックダウンした膠芽腫細胞を作製し、その性状を解析することも重要である。本課題におけるキトサンをベースにしたナノパーティクルの開発により脳腫瘍への siRNA のデリバリーが可能になったことから、今後、CXXC-3 特異的な遺伝子治療法の開発も可能になると考えられる。

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Higashi Y, Aratake T, Shimizu S, Shimizu T, Nakamura K, Tsuda M, Yawata T, Ueba T, Saito M: Influence of extracellular zinc on M1 microglial activation. *Sci Rep*.7: 43778,2017. 査読有

DOI:10.1038/srep43778

Nakashima K, Kodama Y, Nishikawa T, Nishimura M, Ito N, Fukano R, Nomura Y, Ueba T, Inoue T, Oshima K, Okamura J, Inagaki J: Central nervous system EBV lymphoproliferative disorder in a patient with rhabdomyosarcoma. *Pediatr Int*. 58: 388-390, 2016. 査読有

DOI:10.1111/ped.12812

Yawata T, Higashi Y, Shimizu T, Shimizu S, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Saito M: Brain opioid and nociceptin receptors are involved in regulation of bombesin-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in the rat. *Mol Cell Biochem*. 411: 201-11, 2016. 査読有

DOI:10.1007/s11010-015-2582-0

Nakai E, Takemura M, Nonaka M, Kawanishi Y, Masahira N, Ueba T: Use of fat-suppressed T2-weighted sagittal images after infusion of excess saline into the subarachnoid space as a new diagnostic modality for cerebrospinal fluid hypovolemia: technical note. *J Neurosurg*. 124: 580-583, 2016. 査読有

DOI:10.3171/2015.2.JNS142746

Shimizu T, Tanaka K, Shimizu S, Higashi Y, Yawata T, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Yuri K, Saito M: Possible inhibitory role of endogenous 2-arachidonoylglycerol as an endocannabinoid in

(±)-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in the rat. *Neuropharmacology* 95: 278-89, 2015. 査読有

DOI:10.1016/j.neuropharm.2015.03.034

Nonaka M, Yawata T, Takemura M, Higashi Y, Nakai E, Shimizu K, Ueba T: Elevated cell invasion in a tumor sphere culture of RSV-M mouse glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 55: 60-70, 2015. 査読有

DOI:10.2176/nmc.oa.2014-0067

Hashida Y, Taniguchi A, Yawata T, Hosokawa S, Murakami M, Hiroi M, Ueba T, Daibata M: Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. *Infect Agent Cancer* 10: 3, 2015. 査読有

DOI:10.1186/1750-9378-10-3

Nakamura K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Taniuchi K, Shimizu S, Dimitriadis F, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Saito M: Angiotensin II acting on brain AT1 receptors induces adrenaline secretion and pressor responses in the rat. *Sci Rep*. 4: 7248, 2014. 査読有

DOI:10.1038/srep07248

Higashi Y, Hoshijima M, Yawata T, Nobumoto A, Tsuda M, Shimizu T, Saito M, Ueba T: Suppression of oxidative stress and 5-lipoxygenase activation by edaravone improves depressive-like behavior after concussion. *J Neurotrauma* 31: 1689-99, 2014. 査読有

DOI:10.1089/neu.2014.3331.

Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Dimitriadis F, Shimizu S, Yokotani K, Saito M: Possible involvement of brain prostaglandin E2 and prostanoid EP3 receptors in prostaglandin E2 glycerol ester-induced activation of central sympathetic outflow in the rat. *Neuropharmacology* 82: 19-27, 2014. 査読有

DOI:10.1016/j.neuropharm.2014.03.005

〔学会発表〕(計 7 件)

八幡 俊男、福井 直樹、川西 裕、中城 登仁、上羽 哲也: 葉酸を結合した乳酸キトサンオリゴ糖ナノ粒子を用いた膠芽腫細胞への siRNA のデリバリー効率の検討、第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会、2016/12/4-12/6、甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市)

川西 裕、宇高 恵子、八幡 俊男、近藤 雄一郎、西本 祥大、濱田 史泰、竹村 光広、上羽 佑亮、中居 永一、福井 直樹、中城 登仁、上羽 哲也: 悪性神経膠腫に対する WT-1W10 免疫療法の臨床試験、第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会、2016/12/4-12/6、甲府富士屋ホテル、(山梨県甲府市)

八幡 俊男、東 洋一郎、福井 直樹、川西 裕、中城 登仁、上羽 哲也: 葉酸を結合した乳酸キトサンオリゴ糖ナノ粒子を用いた膠芽腫細胞への siRNA のデリバリー効率の検討、第 17 回日本分子脳神経外科学会、2016/8/26-8/27、帝京大学板橋キャンパス(東京都板橋区)

八幡 俊男、東 洋一郎、川西 裕、中居 永一、野中 大伸、上羽 哲也: 膠芽腫幹細胞で高発現する CD146 による細胞周期の制御、第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会、2015/12/6-12/8、グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)

Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Toshio Yawata, Sena Hosokawa, Moe

Tanaka, Masanao Murakami, Mikio Kamioka, Makoto Hiroi, Tetsuya Ueba, and Masanori Daibata: Virus infection in glioblastoma multiforme (GBM): Possible association of human papillomavirus with pathogenesis of GBM. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日～24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

上羽 哲也: 中枢神経系悪性腫瘍に対する治療法の最近の知見についてーグリオーマを中心にー、第 53 回日本癌治療学会、2015 年 10 月 29 日～31 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

八幡 俊男、東 洋一郎、野中 大伸、竹村 光広、川西 裕、中居 永一、上羽 哲也: CD146 による膠芽腫細胞の自己複製能と浸潤能の制御、第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、2014/11/30-12/2、シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(千葉県浦安市)

門・助教

研究者番号: 40380323

東 洋一郎 (HIGASHI, Youichiro)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部

門・助教

研究者番号: 80380062

〔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.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_nrsrg/](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_nrsrg/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上羽 哲也 (UEBA, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部

門・教授

研究者番号: 00314203

### (2) 研究分担者

八幡 俊男 (YAWATA, Toshio)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部