

学位論文題名

Study of epigenetic regulation of histone modifications and non-coding RNAs
involved in glioma stem cell differentiation

(脳腫瘍幹細胞の分化に関わる非翻訳RNAおよびヒストン修飾によるエピジェネティクス制御機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

がん組織は、ジェネティック・エピジェネティックに異なる細胞から構成され、腫瘍内不均一性を示す。腫瘍内において、一部の細胞は自己複製能を持つと同時に転移能、浸潤能、増殖能の異なる形質を持つ細胞へと分化しうる多分化能を有していることが見出された。このサブグループががん幹細胞であり、がん組織はがん幹細胞とそこから分化したがん細胞により構成されると提唱されている(Reya *et al.*, *Nature*, 2001)。膠芽腫(グリオブラストーマ)は、原発性脳悪性腫瘍の中で最も高頻度に発生する腫瘍である。平均生存期間 1 年程度で、5 年生存率も 10%以下と極めて予後が悪い。グリオブラストーマにおいても、がん幹細胞の存在が報告されており(Cusimano *et al.*, *Nature*, 2004)、従来の抗がん剤ががん細胞の有する単一の形質を標的にしているとすると、がん幹細胞の分化より形成される腫瘍内不均一性の存在はがんの根治を困難にしている原因と考えられる。しかしがん幹細胞がどのような過程を経て他のがん細胞と異なる形質を獲得し、腫瘍内不均一性を形成しているのか不明な点も多い。

近年、DNA メチル化やヒストン修飾、マイクロ RNA(miRNA)をはじめとする様々なエピジェネティクス機構ががん幹細胞の分化、腫瘍内不均一性に関与していることが示された(Cedar and Bergman, *Nat. Rev. Genet.*, 2009, Bracken and Helin *Nat. Rev. Cancer*, 2009, Liu and Tang, *Cancer Res.*, 2011)。本研究ではヒストン H3 リジン 27 トリメチル化(H3K27me3)修飾及び miRNA によって制御されるがん幹細胞の分化が、固形腫瘍の組織多様性獲得の基盤にあると考え、グリオブラストーマより樹立したがん幹細胞 (Glioma stem-like cell, GSC) をモデルとし、GSC 分化誘導時における miRNA 発現の変動、H3K27me3 修飾に着目し、GSC 分化制御に関わるエピジェネティクス機構を明らかにすることを目的とした。

ヒトグリオブラストーマより樹立した GSC は bFGF と EGF を含む無血清培地で培養すると浮遊塊を形成し増殖する。GSC の未分化性を抗体による免疫染色及び mRNA の発現から解析した結果、未分化マーカーである Nestin の発現が高頻度であるのに対して、分化マーカーである GFAP 及び TUJ1 の発現は低頻度であった。さらに、GSC は血清を含む分化誘導培地にて培養すると紡錘形の細胞(Serum-induced brain tumor cell, S-BTC)へと形態を変化させ、未分化マーカーを低下、分化マーカーを増加させることを確認した。

GSC を血清添加にて分化誘導し、マイクロアレイを用いて miRNA の発現解析を行った結果、分化誘導に従って発現が増加する miRNA を 13 個、減少する miRNA を 34 個同定した。同定された各 miRNA について database 上における標的遺伝子の検索を行なった結果、分化誘導に伴い発現が減少を示した miR-1275 はオリゴデンドロサイトの分化マーカーである Oligodendrocyte Specific Protein/ Claudin11 (OSP/ CLDN11) を標的としていることを見出した。Real-time PCR 法、western blotting 法による定量的解析を行った結果、miR-1275 は GSC 分化により発現が抑制され、その標的遺伝子である CLDN11 の発現は上昇を示した。

In silico 解析より CLDN11 の 3'-非翻訳領域(3'-UTR)内に miR-1275 に対する相補配列が二箇所存在することを確認した。CLDN11 の全長 3'-UTR をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだプラスミドベクターを作成しレポーターアッセイを行なった結果、miR-1275 が CLDN11 の 3'-UTR を介して発現を制御することを確認した。GSC においてアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて miR-1275 の発現を阻害させると、mRNA 及びタンパク質発現レベルにおいて CLDN11 の上昇を確認し、miR-1275 が CLDN11 の 3'-UTR を介して CLDN11 の発現を制御していることを示した。

miR-1275 の発現制御について、pri-miR-1275 のプロモーター領域におけるヒストン修飾を ChIP-PCR 法により解析した結果、GSC の分化誘導に伴い pri-miR-1275 プロモーター領域において H3K27me3 による修飾が観察された。また、H3K27me3 阻害剤(3-Dezanepanocin-A)存在下において GSC を分化誘導させると miR-1275 の発現抑制はみられず、CLDN11 の発現上昇についても認められなかった。

グリオブラストーマ組織ではアストロサイト系列の細胞集団内にオリゴデンドロサイト系列の細胞集団が混在することが観察される(Kleihues and Cavenee, IARC Press, 2000)。この腫瘍内不均一性の形成における miR-1275 の関与について、グリオブラストーマ組織切片に対して miR-1275 の標的遺伝子である CLDN11 及び中枢神経系を構成する主要細胞種(ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト)における分化系統マーカー(Microtubule-associated protein 2, MAP2, Glial fibrillary acidic protein, GFAP, Oligodendrocyte lineage transcription factor 2, OLIG2)の抗体を用いて蛍光免疫組織化学的解析を行った。その結果、グリオブラストーマ組織内では CLDN11 陽性領域と陰性領域が不均一に含まれ、CLDN11 の発現は OLIG2 陽性領域においてのみ観察され、MAP2、GFAP 陽性領域では認められないことを明らかにした。本結果から、miR-1275 の標的遺伝子である CLDN11 の発現はオリゴデンドロサイトにおける分化系統マーカーである OLIG2 陽性領域においてのみ確認され、グリオブラストーマ組織内において観察されるオリゴデンドロサイト様の腫瘍組織の形成には miR-1275 及び CLDN11 が寄与していることを示唆した。

がん幹細胞の分化、腫瘍内不均一性の存在は新規抗がん剤開発の有望な標的となり得ると考えられるが、がん幹細胞がいかにして他のがん細胞と異なる形質を獲得しているのかという疑問についてはこれまでに明確な結論が得られていない。本研究においてがん幹細胞の分化、腫瘍内不均一性に関わるエピジェネティクス機構として miR-1275 による CLDN11 の発現抑制及び、H3K27me3 による miR-1275 の転写制御機構を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	瀧谷重治
副査	教授	高橋孝行
副査	教授	山下正兼
副査	教授	小布施力史
副査	准教授	木村敦
副査	部長	近藤豊 (愛知県がんセンター研究所ゲノム制御研究部)

学位論文題名

Study of epigenetic regulation of histone modifications and non-coding RNAs involved in glioma stem cell differentiation

(脳腫瘍幹細胞の分化に関わる非翻訳RNAおよびヒストン修飾によるエピジェネティクス制御機構に関する研究)

博士學位論文審査等の結果について (報告)

がんは遺伝子異常を原因とする疾患である。近年のシーケンズ技術の進歩により、がん細胞では、遺伝子変異等のゲノム異常に加えて、多くのエピゲノム異常が蓄積していることが明らかとなってきた。現在では、エピゲノム異常は、発がん過程の早期から進展に至るまで様々ながんの生物学的特性に影響を与えると考えられている。

脳膠芽腫 (グリオブラストーマ, GBM) などの固形腫瘍は、腫瘍組織中に分化段階の異なる細胞が混在し、形態学的にも不均一な状態を呈する (がん組織多様性)。組織多様性により、腫瘍内に様々な性格を持ったがん細胞が存在すると、がんの治療上標的が絞りにくく、治療を困難にする。本研究では GBM より樹立した脳腫瘍がん幹細胞をモデルとし、その分化過程の制御に関わるエピゲノム機構を明らかにすることを目的とした。

GBM から樹立した脳がん幹細胞モデルを用いて、がん細胞分化誘導時に変化するマイクロ RNA (miR) を網羅的に解析し、そのうち CLDN11 の発現抑制に関わる miR-1275 を同定した。さらに miR-1275 は、エピゲノム機構の一つである enhancer of zeste homolog 2 (EZH2, ヒストンメチル化酵素) を介したヒストン H3 リジン 27 トリメチル化修飾 (EZH2-H3K27me3) により転写制御されていることを明らかにした。CLDN11 は神経髄鞘の構成タンパクで、神経分化系列のうちオリゴデンドロサイトの分化系統で陽性となる。GBM では一部の腫瘍は、オリゴデンドロサイト様の細胞集団が腫瘍内に混在することが知られている。こうした GBM の組織多様性の形成に関わる分子機構はこれまで明らかではなかったが、本研究からエピゲノム機構のマイクロ RNA と EZH2-H3K27me3 が腫瘍内の組織多様性の形成に重要な役割を担っていることを示すことができた。

がん組織多様性の形成機序は、がんの根治を考える上で解明すべき重要な課題であるが、いまだその制御に関わる分子機構はほとんど解明されていない。本研究から、エピゲノムががん細胞分化とその結果として形成される組織多様性に関与していることを示すことができた。がん治療薬として、EZH2 阻害剤の開発は、現在世界中で進められ、既に候補化合物も得られている。今後のがん治療戦略を考察する上での新たな可能性を見出した。

これを要するに、著者は、固形がんの組織多様性形成過程でのエピゲノムの関与について新知見を得たものであり、今後の分子機構に基づくがん治療の開発に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。