

# 転写因子 OLIG2によるヒト神経膠芽腫細胞の 増殖・運動能抑制とそのメカニズムの解析

## 学位論文内容の要旨

神経膠腫(glioma)は頻度の高い脳腫瘍で、WHOにより Grade I からIVに分類され、中でも神経膠芽腫(glioblastoma)は最も悪性度が高い GradeIVに属する。

Basic helix-loop-helix (bHLH)型転写因子 oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2)は発生段階の中枢神経系に発現しており、神経幹細胞からオリゴデンドロサイトと運動ニューロンへの発生分化の制御に必須の分子として 2000 年に同定された。その後、様々なタイプの神経膠腫で OLIG2 の発現が報告され、神経膠芽腫では発現が減少していることから、近年、脳腫瘍の新規分子診断マーカーとしての有用性が注目されている。しかしながら、神経膠腫における OLIG2 の分子細胞生物学的な機能は依然として不明である。

本研究では、神経膠腫の悪性度の指標である増殖・浸潤のメカニズムに OLIG2 が関与している可能性を検索した。

はじめに申請者らは、ヒト神経膠芽腫由来 U251 細胞に Tet-off 遺伝子発現システムを導入し、Tet-off 時に OLIG2 を発現する U12-1 細胞を樹立した。この U12-1 細胞を用いた表現型解析で、OLIG2 発現時に足場依存性および非依存性増殖能が有意に低下することを発見した。この細胞増殖抑制のメカニズムを詳細に検討するために cDNA microarray を行い、OLIG2 発現時に CDK 阻害因子 p27<sup>Kip1</sup> の mRNA および蛋白量が增加していることを見出した。次に p27<sup>Kip1</sup> の発現機構を検索するために、luciferase assay を行い、OLIG2 の反応領域が p27<sup>Kip1</sup> promoter 領域における CCAAT-box binding transcription factor (CTF) site (CCAAT)であることを明らかにした。また、electrophoretic mobility shift assay (EMSA)法を用いて、OLIG2 発現時の核抽出液中に CCAAT 配列に結合する複合体が存在することを確認した。さらに p27<sup>Kip1</sup> に対する siRNA を用いた実験により、OLIG2 による増殖能の抑制が p27<sup>Kip1</sup> の発現依存性であることを明らかにした。以上の結果から、OLIG2 は CTF site を介して p27<sup>Kip1</sup> の転写活性を上昇させ、細胞増殖能を低下させることが示唆された。

次に申請者らは、U12-1 細胞を用いて、OLIG2 発現時に運動能および浸潤能が有意に低下することを見出した。この細胞運動抑制のメカニズムを明らかにするため、細胞運動制御に重要な役割を担っている低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーに着目し、GTPase pull-down assay を行った。その結果 OLIG2 発現時に RhoA の活性が上昇していること、およびストレスファイバーと細胞接着斑の形成が亢進していることを発見した。また Rho タンパク質を特異的に不活化する C3 酵素を用いた実験により、OLIG2 発現時に認められる運動能の抑制が RhoA の活性化に依存していることを明らかにした。さらに蛍光共鳴エネルギー移行(FRET)を用いて、OLIG2 非存在下では細

胞先端の突出時と尾部の退縮時に RhoA が選択的に活性化していること、これに対して OLIG2 存在下では細胞膜全体で過度の活性化が持続していることを示した。以上の結果から、OLIG2 は RhoA の活性化を介して、細胞の増殖のみならず運動能も制御する可能性が示唆された。

近年、細胞質において p27<sup>Kip1</sup> が RhoA の活性化を阻害し細胞運動を促進していることが報告されており、また本実験系でも OLIG2 の発現時には p27<sup>Kip1</sup> の発現が上昇することから p27<sup>Kip1</sup> に対する siRNA を用いた実験を行った。その結果、U12-1 細胞では OLIG2 による p27<sup>Kip1</sup> の発現上昇は RhoA の活性化に大きく関与してはいなかったが、運動能の抑制には一部関与していた。一方、p27<sup>Kip1</sup> 遺伝子欠失マウス由来の mouse embryonic fibroblast (MEF) では野生型マウス由来の MEF と比較して、活性型 RhoA の上昇および運動能の低下が観察された。この MEF と U12-1 間での矛盾した結果は、細胞種の違いが理由の一つとして考えられた。

本研究において樹立した、ヒト神経膠芽腫由来の OLIG2 発現誘導細胞株は、OLIG2 の発現時に有意な増殖能・運動能の低下を示した。この結果は、OLIG2 の発現量の変化が神経膠芽腫の悪性度を規定し、病理診断マーカーとして有用であることを示唆していた。今後は OLIG2 発現量と神経膠芽腫症例の予後との関係を明らかにする必要がある。また本研究における結果は OLIG2 が神経膠芽腫治療の新たな分子ターゲットとなる可能性を示唆しており、OLIG2 の発現を上昇させるような薬剤の開発が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典  
副 査 教 授 畠 山 鎮 次  
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

## 転写因子 OLIG2によるヒト神経膠芽腫細胞の 増殖・運動能抑制とそのメカニズムの解析

神経膠腫(glioma)は頻度の高い脳腫瘍で、WHOにより Grade I からIVに分類され、中でも神経膠芽腫(glioblastoma)は最も悪性度が高い GradeIVに属する。

Basic helix-loop-helix (bHLH)型転写因子 oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2)は発生段階の中樞神経系に発現しており、神経幹細胞からオリゴデンドロサイトと運動ニューロンへの発生分化の制御に必須の分子として 2000 年に同定された。その後、様々なタイプの神経膠腫で OLIG2 の発現が報告され、神経膠芽腫では発現が減少していることから、近年、脳腫瘍の新規分子診断マーカーとしての有用性が注目されている。しかしながら、神経膠腫における OLIG2 の分子細胞生物学的な機能は依然として不明である。

本研究では、神経膠腫の悪性度の指標である増殖・浸潤のメカニズムに OLIG2 が関与している可能性を検索した。

はじめに申請者らは、ヒト神経膠芽腫由来 U251 細胞に Tet-off 遺伝子発現システムを導入し、Tet-off 時に OLIG2 を発現する U12-1 細胞を樹立した。この U12-1 細胞を用いた表現型解析で、OLIG2 発現時に足場依存性および非依存性増殖能が有意に低下することを発見した。この細胞増殖抑制のメカニズムを詳細に検討するために cDNA microarray を行い、OLIG2 発現時に CDK 阻害因子 p27Kip1 の mRNA および蛋白量が増加していることを見出した。次に p27Kip1 の発現機構を検索するために、luciferase assay を行い、OLIG2 の反応領域が p27Kip1 promoter 領域における CCAAT-box binding transcription factor (CTF) site (CCAAT)であることを明らかにした。また、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 法を用いて、OLIG2 発現時の核抽出液中に CCAAT 配列に結合する複合体が存在することを確認した。さらに p27Kip1 に対する siRNA を用いた実験により、OLIG2 による増殖能の抑制が p27Kip1 の発現依存性であることを明らかにした。以上の結果から、OLIG2 は CTF site を介して p27 Kip1 の転写活性を上昇させ、細胞増殖能を低下させることが示唆された。

次に申請者らは、U12-1 細胞を用いて、OLIG2 発現時に運動能および浸潤能が有意に低下することを見出した。この細胞運動抑制のメカニズムを明らかにするため、細胞運動制御

に重要な役割を担っている低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーに着目し、GTPase pull-down assay を行った。その結果 OLIG2 発現時に RhoA の活性が上昇していること、およびストレスファイバーと細胞接着斑の形成が亢進していることを発見した。また Rho タンパク質を特異的に不活化する C3 酵素を用いた実験により、OLIG2 発現時に認められる運動能の抑制が RhoA の活性化に依存していることを明らかにした。さらに蛍光共鳴エネルギー移行 (FRET) を用いて、OLIG2 非存在下では細胞先端の突出時と尾部の退縮時に RhoA が選択的に活性化していること、これに対して OLIG2 存在下では細胞膜全体で過度の活性化が持続していることを示した。以上の結果から、OLIG2 は RhoA の活性化を介して、細胞の増殖のみならず運動能も制御する可能性が示唆された。

近年、細胞質において p27Kip1 が RhoA の活性化を阻害し細胞運動を促進していることが報告されており、また本実験系でも OLIG2 の発現時には p27Kip1 の発現が上昇することから p27 Kip1 に対する siRNA を用いた実験を行った。その結果、U12-1 細胞では OLIG2 による p27Kip1 の発現上昇は RhoA の活性化に大きく関与してはいなかったが、運動能の抑制には一部関与していた。一方、p27 Kip1 遺伝子欠失マウス由来の mouse embryonic fibroblast (MEF) では野生型マウス由来の MEF と比較して、活性型 RhoA の上昇および運動能の低下が観察された。この MEF と U12-1 間での矛盾した結果は、細胞種の違いが理由の一つとして考えられた。

本研究において樹立した、ヒト神経膠芽腫由来の OLIG2 発現誘導細胞株は、OLIG2 の発現時に有意な増殖能・運動能の低下を示した。この結果は、OLIG2 の発現量の変化が神経膠芽腫の悪性度を規定し、病理診断マーカーとして有用であることを示唆していた。今後は OLIG2 発現量と神経膠芽腫症例の予後との関係を明らかにする必要がある。また本研究における結果は OLIG2 が神経膠芽腫治療の新たな分子ターゲットとなる可能性を示唆しており、OLIG2 の発現を上昇させるような薬剤の開発が期待される。

口頭発表において、副査の畠山教授より OLIG2 による p27 の発現上昇における proteasome 系の関与、OLIG2 による細胞運動抑制における cdc42 の関与、p27 による RhoA の活性制御機構の詳細、Grade III の神経膠腫において OLIG2 の発現が上昇することに対する考え方、OLIG2 によってもたらされる phenotype 全般の generality 等に関して質問があった。また副査の渡辺教授より、創薬を目指す上での OLIG2 自身の発現制御の詳細、astrocytic な神経膠腫において oligodendrocyte マーカーである OLIG2 が発現していることに対する考え方等に関して質問があった。最後に主査の笠原教授より神経膠腫診断マーカーとしての OLIG1 や p27 の有用性、神経膠腫における OLIG2 の発現上昇と癌化との関係等に関して質問があった。これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は、神経膠腫の新規診断マーカーとして注目されている OLIG2 の分子細胞生物学的な機能を詳細に明らかにした点で優れていると判断され、脳腫瘍の診断・治療に対して重要な示唆を与えたものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。