

# ヒト正常細胞を用いた脳腫瘍発症メカニズムの分子生物学的解析

笹井 研 [北海道大学大学院医学研究科分子細胞病理学分野／博士研究員]

## 背景・目的

脳腫瘍研究における多くの重要な知見が、古典的に樹立された脳腫瘍細胞株を用いた研究から得られてはいるが、一方で、それぞれの細胞株が特有の遺伝的変異を有しているため、「ある細胞株で得られた結果が他の細胞株の結果と一致しない」と言う事がしばしば生じてしまう。従って治療を目指した脳腫瘍の「発症」機構を探索する際には、既に腫瘍化した細胞株を用いるよりは、正常な細胞が腫瘍化していく過程を追う研究が重要である。本研究は、正常アストロサイトに癌遺伝子を導入することで脳腫瘍の多段階の悪性化モデルを作製し、腫瘍化に至る分子メカニズムを解明することを目的とする。

## 内容・方法

本研究に先駆け、正常なヒトアストロサイトに、レトロウイルス遺伝子発現系により癌遺伝子を導入し、「不死化状態にはあるが腫瘍化には至っていない NHA/TS 細胞」を樹立済みである (Sasai et al, 2007)。札幌市内の 4 病院の協力により、40 例ほどの脳腫瘍組織を得て、RNA を抽出し、脳腫瘍に関連すると報告のある転写因子 (GLI1、FOXM1、FRA1、OLIG2、SOX2 など) の発現レベルを解析した。次に、発現レベルと悪性化に相関の見られた 2 つの転写因子 (GLI1 と FOXM1) に関し、前述の NHA/TS 細胞に遺伝子導入し、軟寒天培地における足場非依存性の増殖能・ヌードマウスに於ける腫瘍形成能を検証した。結果、GLI1 にのみ腫瘍化能がみとめられ、2008 年 3 月現在その分子機構を分子生物学的に (ウェスタンブロット法・プロテオミクスによる蛋白質発現の網羅的解析など) 解析中である。

## 結果・成果

### a) 脳腫瘍関連転写因子の発現解析

札幌市内の 4 病院の協力により得た脳腫瘍組織のうち、RNA 抽出が可能であった 22 例 (grade-I, n=1; grade-II, n=3; grade-III, n=4; grade-IV, n=14) について、半定量的 RT-PCR 法により、脳腫瘍関連転写因子の mRNA 発現量を解析した。その結果、FRA1 に関しては、脳腫瘍の悪性度 (grade) と発現量の間に全く相関は見いだせなかったものの、GLI1 と FOXM1 においては、発現量と腫瘍悪性度との間に正の相関が見られた。

### b) 不死化アストロ細胞を用いた解析

GLI1 および FOXM1 が脳腫瘍の発症に関わっているかを検証する目的で、NHA/TS 細胞 (不死化アストロサ

イト) に、2 つの転写因子をそれぞれ遺伝子導入した。FOXM1 の強制発現によっては、不死化アストロサイトはトランスフォーメーションを引き起こさなかったが、GLI1 導入によっては、「軟寒天培地において足場非依存性の増殖能を獲得する」「ヌードマウスに於ける腫瘍形成能を有する」などの癌化 (腫瘍化) 形質が認められた。この結果から、FOXM1 が腫瘍の悪性化に重要であるものの「発症」には大きく関与していないのに対し、GLI1 は脳腫瘍の発症に大きく関わると考えられた。ただ、GLI1 のトランスフォーメーション能力は、活性型 RAS と比べると非常に軽微なものであった。

### c) 分子機構の解明

転写因子 GLI1 の導入によって如何に腫瘍化に至るかを解明し、将来の創薬ターゲット同定に結びつけるために、GLI1 の標的分子の探索は重要である。そこで、NHA/TS 細胞と NHA/TS+GLI1 細胞の蛋白質発現の差をウェスタンブロット法による比較で見いさそうと試みたが、Shh-GLI1 pathway の下流や細胞周期関連分子の中には、今のところ見いだされていない。そこで、現在 GLI1 と相互作用する分子を見いさすべく、免疫沈降した試料を質量分析に供し、網羅的解析を行っている。

### d) その他の成果

脳腫瘍関連分子の発現を mRNA レベルにとどまらず、蛋白質の発現を病理組織学的に解析するため、21 種の脳腫瘍試料のパラフィン切片を用い免疫染色を行った。その過程で DNA 修復酵素 MGMT の診断法改善につながる発見をしたので、学術誌に発表した (Sasai et al, Am J Surg Path, 32: 1220-1227, 2008)。MGMT はアルキル化剤による治療効果を規定する分子であるので、GLI1 の成果とあわせて、脳腫瘍の診断・治療法改善に大きく寄与するものと思われる。

## 今後の展望

蛋白質発現の網羅的解析により、GLI1 導入により発現量が、変化する分子を同定する。その後、同定した分子を、過剰発現 (あるいはノックダウン) し、NHA/TS 細胞が腫瘍化形質を獲得するか否かを検証し、脳腫瘍発症メカニズムに直結する GLI1 のターゲットを見い出す。更に、同定したターゲットのヒト脳腫瘍での発現を、免疫染色により検討し、学術誌への発表を行う。