

主論文の要旨

**Paired related homeobox 1 is associated with the
invasive properties of glioblastoma cells**

Paired related homeobox 1 は
神経膠芽腫細胞において浸潤能制御に関与する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
腫瘍病態学講座 腫瘍生物学分野

(指導：近藤 豊 教授)

杉山 麻衣

【目的】

膠芽腫は、悪性脳腫瘍のうち最も頻度の高く、高い増殖能と浸潤能を特徴とする。平均余命は約1年、5年生存率は10%であり、いまだ治療が困難な悪性腫瘍の1つである。浸潤性が高いことから外科的切除には限界があり、放射線治療や抗がん剤が治療に用いられるが、その効果は限られている。そこで我々は、膠芽腫の悪性度を制御するがん細胞浸潤分子メカニズム解明を通し、膠芽腫の新規治療法開発を目指し研究を行った。

【方法】

腫瘍組織で高発現している転写因子を同定する目的で、Oncomine データベースから複数の候補遺伝子を抽出した。その中から、機能未知の Homeobox 遺伝子である、Paired Related Homeobox 1 (PRRX1) に着目し、その発現パターン解析および、機能解析を実施した。具体的には、健常人と、悪性脳腫瘍患者由来組織を用いた qPCR 法にて PRRX1 の発現量を比較した。さらに、複数の膠腫細胞株において、PRRX1 のノックダウン (shRNA) 細胞株と強制発現株を作成し、浸潤能、neuro-sphere 形成能の細胞機能解析をおよび、マウス Xenograft モデルを用いた腫瘍形成能評価を実施した。

【結果】

qPCR 法による解析から、悪性脳腫瘍患者では健常人と比べ PRRX1A および PRRX1B の発現量が増加傾向にあった (Fig. 1A)。そこで、PRRX1A、PRRX1B 高発現ヒト膠芽腫細胞株である U87、U251sp (Fig. 1B) において、PRRX1A、PRRX1B に対する複数の shRNA を設計しその影響を検討した (Fig. 2A, 2B)。in vitro での浸潤アッセイで PRRX1 のノックダウン細胞株は顕著な浸潤能の低下を示した (Fig. 2C)。また、足場非依存的な増殖および、造腫瘍形成能、がん幹細胞性を評価するために neuro-sphere アッセイを行った結果、PRRX1 のノックダウン細胞株では顕著な neuro-sphere 形成数の減少を認めた (Fig. 2D)。次に、T98、U251MG 細胞を用いて PRRX1A、PRRX1B の強制発現株を作成した。PRRX1A、PRRX1B は細胞核内に局在し、転写因子として機能していることが示唆された (Fig. 3A)。また浸潤アッセイから強制発現株は浸潤能が亢進することを確認した。(Fig. 3B)。さらに、これら表現型を in vivo で確かめるため、マウス Xenograft 同所移植モデルで評価したところ、PRRX1 ノックダウン細胞株により顕著な生存期間の延長を認めた。以上の結果から、PRRX1 は膠腫悪性化亢進に寄与することが示唆され、特にがん細胞の浸潤能と増殖能に重要な役割を果たしていると考えた。

次に、PRRX1 が浸潤能を亢進する分子メカニズムの解明を目的として、膠芽腫の悪性化亢進に関与することが知られている Notch、Wnt、Hedgehog 経路について解析した。これらシグナル伝達経路のレポーターアッセイによる解析から、PRRX1 の強制発現細胞株において Notch 経路の顕著な活性化が見られた (Fig. 4A)。そこで、Notch 経路の標的遺伝子である hairy and enhancer of split 1 (HES1) の発現について調べたところ

る、PRRX1 強制発現によって HES1 の発現は顕著に亢進し (Fig. 4B, 4C)、逆に PRRX1 をノックダウンすると HES1 の発現は減少した (Fig. 4D)。実際に、qPCR による発現解析において悪性脳腫瘍患者では PRRX1A と HES1 の発現量に相関が見られた (Fig. 4E)。最後に、Notch 経路の阻害による PRRX1 を介したがん細胞の浸潤に対する効果を検討した。PRRX1A、PRRX1B 強制発現株において、 γ -secretase 阻害剤である DAPT 処理や、RBPj タンパク質の dominant negative 型を導入したところ、顕著にがん細胞の浸潤能が抑制された (Fig. 5A, 5B)。以上の結果より、PRRX1 は Notch 経路の活性化を介して膠芽腫細胞の浸潤能亢進に重要な機能を果たしていることが示唆された。

【考察】

今回の研究において、PRRX1 が膠芽腫において細胞増殖及び浸潤能亢進に寄与していることが強く示唆された。過去の論文で PRRX1 はがん浸潤過程における epithelial-mesenchymal transition (EMT) の誘導因子であることが報告されている。今回の結果では EMT マーカーと言われる Vimentin や E-cadherin などの発現が変化しなかったことから、PRRX1 の EMT 誘導は細胞種に依存すると考えた。さらに、PRRX1 は 2 つの isoform があり、PRRX1B は PRRX1A とは異なり C 末側に機能未知の OAR ドメインを持つ。他の報告で膵臓がんにおいて PRRX1B 強制発現により、PRRX1A に比べて sphere 形成能が亢進すると言われている。しかし我々の結果では PRRX1A、PRRX1B 強制発現細胞間において浸潤能亢進に差は見られなかったことより、PRRX1A、PRRX1B の作用機序は細胞種により異なる可能性が考えられた。

また今回、PRRX1 は Notch 経路を制御することで、膠芽腫において悪性を亢進する可能性を示した。PRRX1 がどのように Notch 経路を活性化しているかについて明らかにすることはできなかったが、可能性の 1 つとして転写因子である PRRX1 が Notch レセプター、Notch リガンドの発現を制御する可能性や Notch 細胞内ドメインの安定化制御に関わるプロテアーゼの発現制御を行う可能性が考えられる。TCGA データベース調査により、PRRX1 と Notch2、Notch3 の発現に弱いながらも正の相関を確認しており、これらの結果からも、PRRX1 が Notch レセプターの発現を上昇させる可能性が支持される。

PRRX1 は膠芽腫以外にも膵臓がん、乳がん、肺がんなど様々ながんにおいて高発現しており、今回の結果から PRRX1 が高発現するがん細胞に対して Notch 経路の阻害が有効ながん治療法となる可能性が示唆された。

【結論】

今回、膠芽腫細胞における PRRX1 の発現上昇が Notch 経路の活性化を介して、がん細胞の悪性に寄与することを見いだした。PRRX1 もしくは Notch 経路の阻害は膠芽腫細胞の浸潤を抑制できる可能性が高く、有効ながん治療標的となる可能性が示唆された。