

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871006

研究課題名(和文) STAT3によるグリオブラストーマ幹細胞化の解析とその応用

研究課題名(英文) STAT3 mediated acquisition of stem cell features in glioblastoma cells

研究代表者

千葉 知宏 (Chiba, Tomohiro)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：60398617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞仮説は癌の治療抵抗性の本質と考えられるが、癌幹細胞の出自は未だ明らかでない。本研究では、癌幹細胞療法への応用を念頭に、化学療法や免疫反応といった癌細胞へのストレスに応答して通常のGBMから癌幹細胞への転換が生じるかを検証した。

ヒトGBM検体において、リン酸化型STAT3(p-STAT3)が過剰発現しており、幹細胞マーカーと相関する事が確認された。幹細胞マーカーは癌細胞に対する各種細胞ストレスによって誘導され、内在性のmicro RNA-302/367 clusterによるSTAT3リン酸化抑制を介して制御されていた。今後、GBM幹細胞標的療法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSC) is implicated in the resistance to chemotherapy. We hypothesized that CSC could be induced by cellular stress such as chemotherapeutic agents through activation of STAT3.

We observed high levels of phosphorylated STAT3 in human glioblastoma (GBM) samples together with high levels of stem cell markers such as Sox2, 5-lipoxygenase etc. Stem cell markers are induced by cellular stress, which can be regulated by endogenous micro RNA-302/367 cluster. These findings provide a novel insight into CSC-targeted therapy for GBM.

研究分野：腫瘍学

キーワード：癌幹細胞 神経膠芽腫 STAT3 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

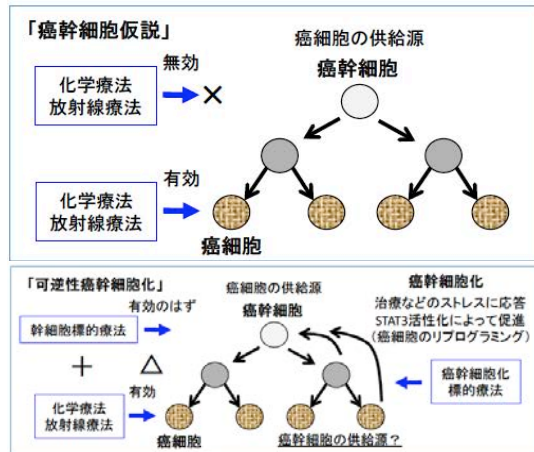
癌幹細胞 (**Cancer stem cells, CSCs**) とは、癌組織内において癌原性 (**Tumorigenicity**) を持ち、分化によって癌組織内の不均一性 (**Heterogeneity**) を作り出す細胞を意味し、癌の治療抵抗性を説明する仮説として注目されている (Gupta et al., *Nat Med* 15: 1010-1012, 2009)。特に近年、免疫不全マウスの改良や細胞表面マーカーの洗練とフローサイトメトリーの進歩によって、CSCs 関連の研究は目覚ましい進歩を遂げている。

グリオブラストーマ (神経膠芽腫 **glioblastoma, GBM**) は、もっとも頻度の高い原発性脳腫瘍で、生存期間が 12~15 ヶ月と極めて予後不良な疾患である (Brantley and Benveniste, *Mol Cancer Res* 6: 675-684, 2008)。その 90% 以上は高齢者 (平均 62 歳) に生じて、進行が早く、浸潤性が強いいため、既存の手術、抗癌剤、放射線の併用療法に対しても抵抗性である。分子病態学の進歩によって、GBM において様々な増殖シグナルが異常に活性化していることが明らかになったが、こうしたシグナルが **STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)** と呼ばれる分子に集束する可能性が示唆されている。つまり、*in vitro* の条件では多くの GBM 細胞が STAT3 の活性化を抑制することで死滅する、STAT3「依存性」(**addiction**) の表現型を示す。また、60-90% の GBM 臨床検体で STAT3 活性化が確認されており、STAT3 の発現レベルが高い癌は予後不良であることも報告されている (Birner et al., *J Neurooncol* 100: 339-343, 2010)。

GBM は癌幹細胞仮説に従う代表的悪性腫瘍として研究が進められて来た。最近、GBM において BMX と呼ばれるチロシンキナーゼが STAT3 を活性化することによって GBM 幹細胞の維持を担っていることが報告された (Guryanova et al., *Cancer Cell* 19: 498-511, 2011)。さらに、GBM 幹細胞を標的とした治療の有効性がマウスモデルで証明されたが、完全には治癒しなかった (Chen et al., *Nature* 488: 522-526, 2012)。我々は、癌幹細胞標的療法で GBM が治癒しないのは、非幹細胞 GBM が治療など様々なストレスに応答して幹細胞化するための仮説を立てた。STAT3 活性化がこの癌幹細胞化(転換)を促進し治療に拮抗していると推察する(概念図参照)。

概念図. (上)癌幹細胞仮説の概要。癌幹細胞は自己複製、分化能を持ち、癌の不均一性を作り出し、また化学療法や放射線療法に耐性を示し、癌の治療抵抗性の根本となる。(下)本研究ではこの仮説をさらに発展させ、通常

の癌細胞から STAT3 依存的に幹細胞化が生じるとの仮説を立てた。



2. 研究の目的

本研究の目的は、「GBM がストレスに応答して STAT3 を活性化し癌幹細胞化する」という仮説を証明することである。これを証明するために以下の小項目を設定し、研究を展開する。

- (1) **ストレス応答性幹細胞化の検討**: 通常 (非幹細胞) GBM 細胞から低酸素、炎症反応、UV などのストレスに応答して癌幹細胞が出現するかを検討する。
- (2) **GBM 癌幹細胞化メカニズムの解析**: 特に STAT3 活性化に注目し、STAT3 を活性化する炎症性サイトカインの関与と、内在性 STAT3 制御分子、SOCS3、PIAS および micro RNA の関与を検討する。
- (3) *in vivo* における検討: 生体内でも同様の可逆的 GBM 幹細胞化が起こることを確認し、また STAT3 活性化を防ぐことによる GBM 癌幹細胞化標的療法が可能であるかを検討する。

3. 研究の方法

- (1) 培養細胞: 幹細胞化メカニズムの解明のためにはアッセイ系の確立が必須であり、single cell から培養した GBM 株 (U87-MG, U373 など) を用いた。細胞へのストレス負荷としては、非接着培養と低酸素ストレスを用いた。前者は、GBM 細胞を接着系で培養後に TrypLE Express を用いて、解離させ、非接着培養ディッシュに培養した。後者の低酸素ストレスにはアネロバック・ケンキを用いた。
- (2) 遺伝子発現解析: 幹細胞性は、Oct4, Sox2, Klf-4, Nanog (Yamanaka factors; YF) などの発現を指標として解析した。Omniscrypt RT kit (QIAGEN) を用いて 1st strand cDNA を合成し、SYBR Green による real-time qPCR を実施した。また、細胞破砕液を用いて、SDS-PAGE を実施、PVDF 膜に転写した後に、各種一次抗体 (YM, phosphor-STAT3, phosphor-AKT など) と

Horse radish peroxidase (HRP)標識二次抗体を用いて免疫ブロットを実施し、Amersham ECLを用いて検出した。

(3) *in vitro* 系における腫瘍悪性度の評価：腫瘍細胞の悪性度の指標としては、colony formation assay (CFA)、cell invasion assay (CIA)を実施した。CFAは、6-wellプレートを用いて、1 wellあたり 3×10^3 個の細胞を0.35%アガロースマトリックス内に播種し、コロニー形成能を測定した。CIAでは、 3×10^3 個の細胞をECM (Sigma-Aldrich)によりコートした Millicell Cell Culture Inserts (12 mmdiameter, 8 μ m pores)に播種し、16時間後に浸潤細胞を計測した。

(4) *in vivo* 系における腫瘍悪性度の評価：xenograft モデルにおける腫瘍形成・増殖能と肝転移の個数を計測した。6-8週齢のNSGマウス (NOD SCID, IL-2 receptor gamma chain KO mice)を用いて 5×10^6 個の細胞をGrowth factor reduced Matrigel (BD, Cat#354230)に懸濁して背部皮下に投与した。投与1ヶ月後までの腫瘍容積を計測した。また、肝転移に関しては、個数と大きさの評価した。

(5) microRNA(miR)-302/367 cluster：正常および腫瘍細胞のリプログラミングを誘導すると報告される miR-302/367 cluster をクローニングし、pLVET-tTR-KRAB vector (lentiviral 'tet-on' system)にサブクローニングした。

(6) 免疫組織化学：GBM 患者標本におけるSTAT3 依存性幹細胞化の検討はヒト GBM 患者脳を用いて解析した。リン酸化 STAT3 抗体(Tyr705) (Cell Signaling Technology)および GBM 幹細胞マーカー(CD133, SSEA-1, 5-lipoxygenase, Oct4)などの一次抗体を用いて、DAKO EnVision system (HRP)によりDABで発色させた。

4. 研究成果

(1) GBM 細胞株の幹細胞性の解析：各種 GBM 細胞と神経芽腫細胞 (SH-SY5Y, Neuro2a)を用いて検討した結果、GBM 細胞株に p-STAT3 の高発現が認められた。また、各種幹細胞マーカーの発現を解析すると、Oct4, Sox2, c-Myc, p-AKT の高発現も同様に認められた(図 1)。

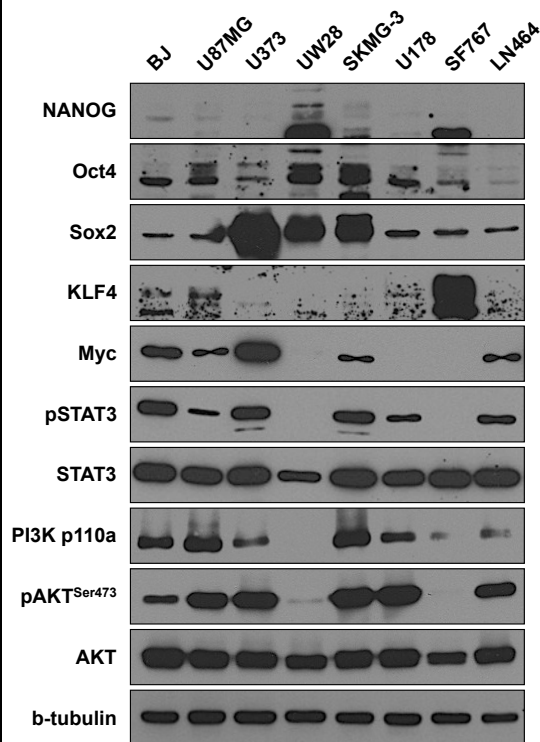
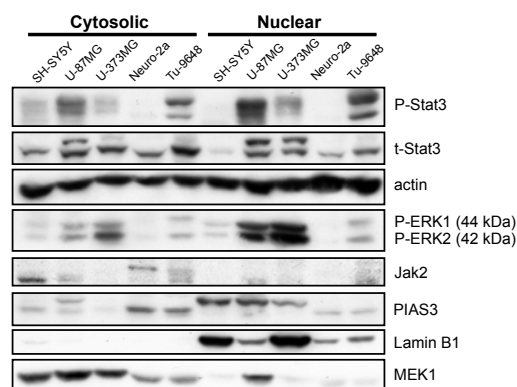


図 1. (A) GBM 細胞における p-STAT3 高発現. (B) GBM 細胞における幹細胞マーカーの高発現 (Yang CM, et al., *Int J Cancer* 2015, in press)

(2) ストレスによる幹細胞性の誘導：GBM 細胞を接着培養から浮遊培養系に移行すると 1-3 時間で各種の幹細胞マーカー遺伝子の発現が誘導された(図 2)。また、低酸素刺激を加えた際にも、同様に、数時間以内に幹細胞関連遺伝子の発現が誘導された。これらの幹細胞マーカーを発現する GBM 細胞は、colony formation assay において、統計学的に有意に多くのコロニーを形成した。

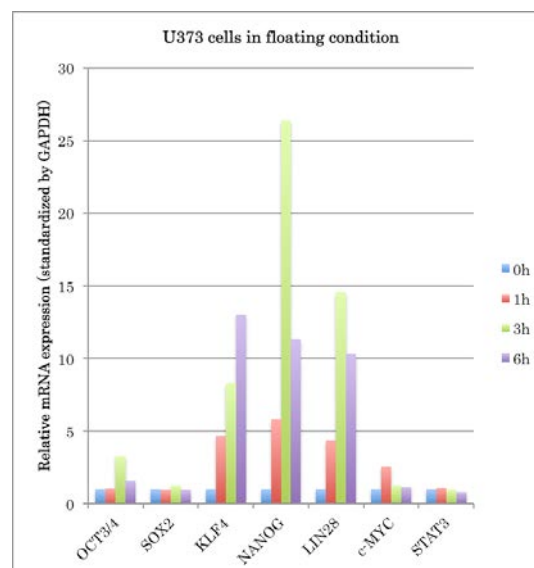


図 2. GBM 浮遊培養による幹細胞性の誘導

(3) miR-302/367 による幹細胞化の制御：GBM 幹細胞化のメカニズムに関して、さらに、体細胞のリプログラミングを誘導する事が報告されている miR-302/367 cluster の影響を検討した。この結果、miR-302/367 の発現により、p-STAT3 および p-AKT の発現が減少し、各種幹細胞マーカーの発現も同様に低下した。miR-302/367 を発現する GBM 細胞は *in vitro* においても *in vivo* においても増殖能・浸潤能が低下する事が確認された(図 3)。さらに、網羅的遺伝子発現解析から、元々 mesenchymal phenotype を呈する GBM 細胞が、miR-302/367 の発現により、proneural phenotype 様の分化へと dedifferentiation する事が確認された。

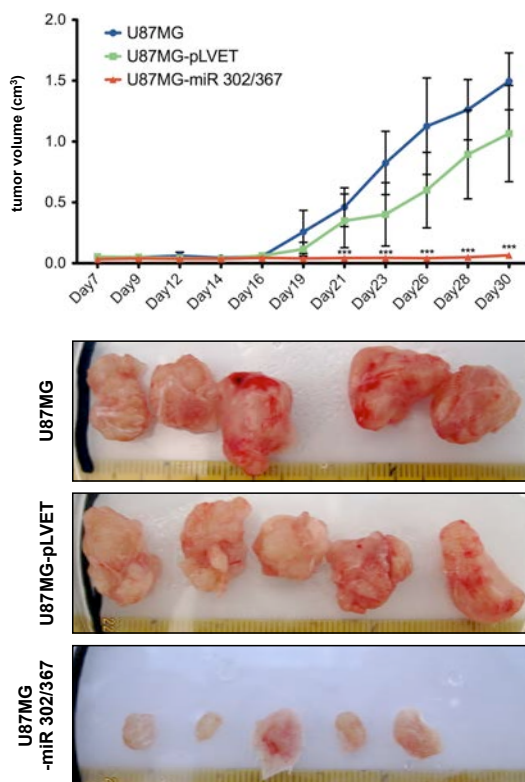


図 3. miR-302/367 cluster を発現させた GBM 細胞は増殖能が低下する(上 ; *in vivo* 増殖曲線、下 ; 実際の腫瘍). (Yang CM, et al., *Int J Cancer* 2015, in press)

(4) ヒト GBM 患者検体の解析：ヒト GBM 検体において、p-STAT3 の発現が亢進していることを確認した。幹細胞関連マーカーである、5-lipoxygenase の発現は p-STAT3 と同様の部位で、相関して認められた。その他の幹細胞マーカーに関しては、GBM 検体で発現が高い事は確認されたが、p-STAT3 との局在に強い関連性は確認出来ていない。また、これらの GBM 幹細胞関連分子群は、特にストレスの強い壊死巣の周辺で高い事を確認した。

以上の結果から、GBM においてストレスに関連して STAT3 が活性化、幹細胞化が促進されるが、内在性の miR-302/367 発現を増加する事によって、この経路が不活性化される事が明らかとなった。本知見は GBM 治療への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件、査読有り)

① Yang CM, Chiba T, Brill B, Delis N, von Manstein V, Vafaizadeh V, Oellerich T, Groner B. Expression of the miR-302/367 cluster in glioblastoma cells suppresses tumorigenic gene expression patterns and abolishes transformation related phenotypes. *Int J Cancer* 2015 (in press). DOI: 10.1002/ijc.29606

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
特記事項なし。

○取得状況 (計 0 件)
特記事項なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/staff/detail/?id=med51017>

http://www.researchgate.net/profile/Tomohiro_Chiba

<http://researchmap.jp/ChibaT/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 知宏 (CHIBA, Tomohiro)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：60398617

(2) 研究分担者

特記事項なし。

(3) 連携研究者

特記事項なし。