

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06838

研究課題名(和文) R-spondin-LGR5-APC軸を標的とした脳腫瘍根絶技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment strategies targeting the R-spondin-LGR-APC axis in glioblastoma stem cells

研究代表者

那須 亮 (NASU, Ryo)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：30466859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は成人脳腫瘍の中で最も罹患率が高い、極めて予後不良な悪性腫瘍である。本研究では膠芽腫幹細胞および微小環境との相互作用を標的とした新規脳腫瘍根絶技術の開発を目指した。我々は膠芽腫幹細胞のWntシグナル制御におけるR-spondin-LGR5-APC軸の重要性を見出した。さらに、R-spondin/Wnt刺激が、Axin1のT160リン酸化修飾を促進することにより、Wntシグナルを活性化することを見出した。従って、Axin1 T160リン酸化を阻害する特異性の高い新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is the most common and aggressive malignant brain tumor in adults. In this study, we tried to develop a new therapy that targets the interaction of glioblastoma stem cells with their specific microenvironments. We found a crucial role of the R-spondin-LGR5-APC axis in the control of Wnt signaling in glioblastoma stem cells. Moreover, R-spondin/Wnt stimuli activate Wnt signaling via promoting the phosphorylation of Axin1 at T160. Thus, small molecules that inhibit Axin1 T160 phosphorylation hold promise as novel anti-tumor reagents.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん がん幹細胞 膠芽腫 Wntシグナル がん免疫

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は成人脳腫瘍の中で最も罹患率が高い、極めて予後不良な悪性腫瘍である。生存期間中央値 15 か月、5 年生存率 6%程度に留まることから、新規治療法の確立が急務とされている。

最近の研究により、腫瘍組織を構成する細胞は均一ではなく、未分化状態を維持しているがん幹細胞とそれ以外の分化した腫瘍細胞が存在し、ごく一部の幹細胞のみが強い腫瘍形成能を有することが明らかとなっている。膠芽腫においてもがん幹細胞の存在が示されているため、膠芽腫幹細胞を標的とした治療法が有望視されている。

Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路 (以下、Wnt シグナル) は様々な細胞機能を制御している。特に、組織幹細胞の自己複製や分化において重要な役割を担っている。その一方で、Wnt シグナルの恒常的な活性化ががんの原因となることも知られている。膠芽腫においても Wnt シグナルの活性化が報告されているが、その分子機構はほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

我々は手術検体より単離した膠芽腫幹細胞を、無血清培地を用いて未分化状態と腫瘍形成能を維持したまま継代培養した。遺伝子発現パターンを解析した結果、膠芽腫幹細胞が LGR5 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5) を発現していることを見出した。腸管上皮幹細胞マーカーとして見出された LGR5 は、最近になってリガンドが Wnt アゴニストである R-spondin family であることが判明し、Wnt シグナルの新たな構成因子として注目を集めている。実際に膠芽腫幹細胞の Wnt シグナル活性を、TCF/ $\beta$ -catenin 複合体により luciferase が誘導される TOP luciferase リポーターアッセイを用いて測定したところ、培地中に組み換え R-spondin1 と Wnt3a を添加することにより Wnt シグナルが効率的に活性化されることを確認した。さらに、膠芽腫幹細胞の LGR5 の発現を特異的 RNAi を用いて抑制すると、Wnt シグナル活性と腫瘍形成能の顕著な低下が観察された。膠芽腫幹細胞は特別な微小環境中に存在し、近傍の細胞より分泌される液性因子等によってその性質が維持されていると考えられている。膠芽腫幹細胞自体は R-spondin family を発現していないため、腫瘍近傍の細胞からパラクライン因子として供給される R-spondin family が、膠芽腫幹

細胞の Wnt シグナル活性化を担っている可能性がある。

がん抑制遺伝子 APC (adenomatous polyposis coli) は、大腸がんの大多数の症例で変異が見出されており、大腸腺腫・がん発症の原因遺伝子であると考えられている。遺伝子産物は  $\beta$ -catenin の分解を誘導することにより Wnt シグナルを負に制御する。APC は膠芽腫幹細胞においても強く発現しており、その発現を特異的 RNAi を用いて抑制することにより、リガンド非依存的な Wnt シグナルの活性化が観察される。我々は膠芽腫幹細胞において、LGR5 と APC が複合体を形成していることを見出した。さらに、この相互作用は R-spondin1/Wnt3a 刺激から 8 時間後には解離することを明らかにした。そのため、LGR5 と APC の相互作用が Wnt シグナルのオン/オフ制御に関与している可能性が考えられた我々は APC の制御機構を明らかにするために yeast two-hybrid screening を行い、APC 結合タンパク質として RING-finger ドメインをもつ PJA2 を見出した。PJA2 は脳神経で発現が高く、特に膠芽腫の起源細胞だと考えられている神経幹細胞における発現が高い。我々は PJA2 が膠芽腫幹細胞においても強く発現しており、APC のユビキチン化とプロテアソーム依存的な分解を誘導することを見出した。さらに、膠芽腫幹細胞の PJA2 の発現を特異的 RNAi を用いて抑制すると APC が安定化し、Wnt シグナル活性と腫瘍形成能の顕著な低下が観察された。

本研究はこれらの実験結果をふまえて、R-spondin-LGR5-APC 軸による Wnt シグナル活性化機構を明らかにすることにより、膠芽腫幹細胞および微小環境との相互作用を標的とした新規脳腫瘍根絶技術の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) R-spondin family と Wnt family の局在解析

膠芽腫幹細胞を免疫不全マウスの脳内に移植して膠芽腫を形成させる。膠芽腫近傍組織での R-spondin family の局在を免疫組織染色および in situ hybridization を用いて解析する。同様の実験を Wnt family についても行う。さらにヒト膠芽腫近傍組織での R-spondin family と Wnt family の局在を解析する。

(2) Wnt シグナル活性化膠芽腫細胞の局在解析 1

膠芽腫幹細胞を免疫不全マウスの脳内に移植して膠芽腫を形成させる。膠芽腫組織で

の活性化 $\beta$ -catenin の局在を免疫組織染色を用いて解析する。さらにヒト膠芽腫組織での活性化 $\beta$ -catenin の局在を確認する。(1)のデータと比較することにより、R-spondin family および Wnt family の局在と Wnt シグナル活性化との関連性を検討する。

(3) Wnt シグナル活性化膠芽腫細胞の局在解析 2

TCF/ $\beta$ -catenin 複合体により EGFP の発現が誘導される TOP EGFP リポーターを構築する。膠芽腫幹細胞に TOP EGFP リポーターをレンチウイルスベクターを用いて導入した後に、免疫不全マウスの脳内に移植して膠芽腫を形成させる。膠芽腫組織での EGFP 陽性細胞の局在を解析し、(1)のデータと比較することにより、R-spondin family および Wnt family の局在と Wnt シグナル活性化との関連性を検討する。

(4) 膠芽腫幹細胞の Wnt シグナル活性化を担う微小環境の解析

(1)-(3)で得られたデータを統合することにより、Wnt シグナル活性化膠芽腫細胞の近傍に存在する R-spondin/Wnt 陽性細胞を同定する。さらに、各種マーカーとの共染色により細胞種を同定する。

(5) 膠芽腫幹細胞における Wnt シグナル標的遺伝子の in vivo 解析

膠芽腫幹細胞に TOP EGFP リポーターをレンチウイルスベクターを用いて導入した後に、免疫不全マウスの脳内に移植して膠芽腫を形成させる。FACS により GFP 陽性/陰性細胞を分離し、各細胞群から mRNA を抽出する。ディープシーケンシングにより、膠芽腫幹細胞における Wnt シグナル標的遺伝子を同定する。さらに、同定された Wnt シグナル標的因子についてはその発現を特異的 RNAi を用いて抑制し、膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能への影響を評価する。

(6) LGR5 と APC の相互作用の Wnt シグナル活性化における意義の解析

LGR5 および APC の各種欠失変異体を作製して結合領域を同定し、相互に結合しない変異体を作製する。各変異体を膠芽腫幹細胞に強制発現させた条件下で、R-spondin1/Wnt3a 刺激時の Wnt シグナル活性を TOP luciferase リポーターアッセイで測定し、LGR5 と APC との相互作用の Wnt シグナル活性化における意義を解析する。

(7) LGR5 および APC と Wnt 構成因子との相互作用

R-spondin1/Wnt3a 刺激および非刺激時の膠芽腫幹細胞から、内在性 LGR5 複合体およ

び APC 複合体を免疫沈降する。それぞれの複合体に含まれる Wnt シグナル構成因子を質量分析および immunoblotting により解析する。さらに、免疫細胞染色により

R-spondin1/Wnt3a 刺激および非刺激時の LGR5 と APC の細胞内局在を解析する。

(8) LGR5 抗体を用いた膠芽腫幹細胞の分子標的治療

LGR5 の細胞外ドメインを抗原とするモノクローナル抗体を複数作製した。それらを用いた FACS により膠芽腫幹細胞の LGR5 陽性/陰性細胞を分離し、それぞれの腫瘍形成能を確認する。LGR5 陽性細胞群の腫瘍形成能が強い場合は、LGR5 モノクローナル抗体の抗腫瘍効果を評価する。

(9) マウス神経幹細胞における Wnt シグナル活性化機構の解析

野生型および PJA2 ノックアウトマウスから神経幹細胞を単離培養する。神経幹細胞に TOP luciferase リポーターを導入した後に培地中に R-spondin1/Wnt3a を添加し、Wnt シグナルの活性化を評価する。

(10) 膠芽腫モデルマウスを用いた PJA2 の発がん過程における重要性の解析

膠芽腫モデルマウスを用いることにより、発がん過程における PJA2 の重要性を評価することが可能となる。野生型および PJA2 ノックアウトマウスと GFAP-Cre/Tp53+/- マウスを掛け合わせ、さらに Cre 活性依存的に発現する H-Ras V12 と恒常的活性化型 AKT をレンチウイルスベクターを用いて海馬領域に導入する。形成された膠芽腫を免疫組織染色を用いて解析し、さらにマウスの生存期間を比較する。

#### 4. 研究成果

R-spondin-LGR5 軸の分子機構を解析するために、LGR5 の相互作用因子を調べた結果、Wnt シグナルの主たる制御因子である

$\beta$ -catenin 分解複合体との相互作用を見出した。さらに、R-spondin/Wnt 刺激により、LGR5- $\beta$ -catenin 分解複合体に含まれる APC と Axin1 の相互作用が解離することを明らかにした (図 1)。リン酸化酵素 GSK3 に対する阻害剤である BIO 存在下では Axin1-APC 相互作用の解離が観察されないことから、リン酸化修飾の関与が示唆された。

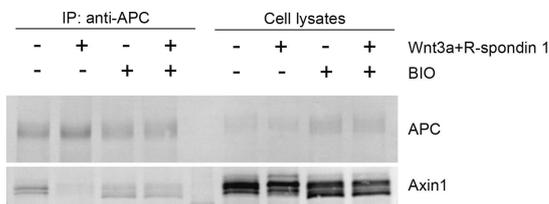


図1: 膠芽腫幹細胞における R-spondin/Wnt 刺激による Axin1-APC 相互作用の解離と GSK3 阻害剤 BIO の効果

さらに疑似リン酸化変異体を用いた実験から、Axin1 160 番目のスレオニン残基のリン酸化修飾が、Axin1-APC 相互作用の解離を促進していることを見出した。実際に、リン酸化特異的抗体を用いた実験により、R-spondin/Wnt 刺激が Axin1 スレオニン 160 番のリン酸化修飾を促進することを見出したことから、R-spondin-LGR5 軸が、Axin1 のリン酸化修飾を介して  $\beta$ -catenin 分解複合体の解離を促進し、Wnt シグナルを活性化すると考えられた。実際に、TCF/ $\beta$ -catenin 複合体により luciferase が誘導される TOP luciferase リポーターを用いた実験により、Axin1 T160D 疑似リン酸化変異体は Wnt シグナル抑制能を喪失している事を明らかにした (図2)。

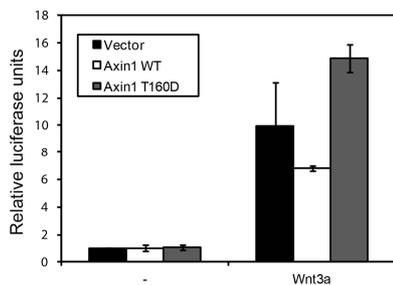


図2: Axin1 T160D 疑似リン酸化変異体の Wnt シグナル抑制能喪失

従って Axin1 T160D リン酸化は、Wnt シグナルのオン/オフを調節する新規 Wnt シグナル分子スイッチであると考えられ、これを基盤とする Wnt シグナル制御技術の開発が見込まれた。

部位特異的なタンパク質リン酸化修飾の生物学的意義は、点変異導入ノックインマウスを作製することにより個体レベルで解析することができる。Axin1 T160A 非リン酸化変異体マウスから Wnt シグナル抑制状態の表現型を、Axin1 T160D 疑似リン酸化変異体マウスから Wnt シグナル亢進状態の表現型を見出すことができる。CRISPR/Cas9 システムを用いて Axin1 T160 変異ノックインマウスの作製を試みた結果、Axin1 T160A 変異が導入された個体を得た。その一方で、Axin1 T160D 変異導入個体を得ることは出来なかった。

以上の知見を統合すると、膠芽腫幹細胞および微小環境との相互作用に対する治療標的として新たに R-spondin-LGR5-APC 軸を見出した。さらに、その下流に位置する Axin1 の新規リン酸化修飾を同定した。従って Axin1 のリン酸化修飾を標的とする低分子化合物が膠芽腫に対する新規治療法として期待される。

近年、悪性腫瘍に対する免疫療法が有望視されている。実際に膠芽腫患者に対しても免疫チェックポイント阻害薬の治験が精力的に進められている。悪性黒色腫においては Wnt シグナル活性化が腫瘍細胞の免疫逃避を促進することが知られているが、膠芽腫の Wnt シグナルと免疫逃避の関連性は明らかにされていない。そのため、今後は Axin1 T160 変異ノックインマウスと膠芽腫モデルマウスを掛け合わせることにより、膠芽腫幹細胞における R-spondin-LGR5-APC 軸の治療標的としての有効性を評価すると共に、Wnt シグナルと免疫逃避の関連性を解析し、膠芽腫に対する免疫療法の有効性を検討する。

## 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6件)

Ito Toshihiro, Hirahara Kiyoshi, Onodera Atsushi, Koyama-Nasu Ryo, Yano Ikuya & Nakayama Toshinori. Anti-tumor immunity via the superoxide-eosinophil axis induced by a lipophilic component of Mycobacterium lipomannan. *International Immunology* 29, 411~421 (2017) 査読有 doi: 10.1093/intimm/dxx051

Kotaki Ryutaro, Higuchi Hiroshi, Ogiya Daisuke, Katahira Yauhiro, Kurosaki Natsumi, Yukihiro Naoko, Ogata Jun, Yamamoto Haruna, Mohamad Alba Syakira, Azhim Azran, Kitajima Tatsuo, Inoue Sigeaki, Morishita Kazuhiro, Ono Koh, Koyama-Nasu Ryo & Kotani Ai. Imbalanced expression of polycistronic miRNA in acute myeloid leukemia. *International Journal of Hematology* 106, 811~819 (2017) 査読有 doi: 10.1007/s12185-017-2314-1

Kotaki Ryutaro, Koyama-Nasu Ryo, Yamakawa Natsuko & Kotani Ai. miRNAs in Normal and Malignant Hematopoiesis.

International Journal of Molecular Sciences 18, 1495 (2017) 査読有 doi: 10.3390/ijms18071495

Narushima Yuta, Kozuka-Hata Hiroko, Koyama-Nasu Ryo, Tsumoto Kouhei, Inoue Jun-ichiro, Akiyama Tetsu & Oyama Masaaki. Integrative Network Analysis Combined with Quantitative Phosphoproteomics Reveals TGFBR2 as a Novel Regulator of Glioblastoma Stem Cell Properties. Molecular and Cellular Proteomics 15, 1017 ~ 1031 (2016) 査読有 doi: 10.1074/mcp.M115.049999

Hiraoka Koji, Hayashi Tomoatsu, Kaneko Ryusuke, Nasu-Nishimura Yukiko, Koyama-Nasu Ryo, Kawasaki Yoshihiro & Akiyama Tetsu. SOX9-mediated upregulation of LGR5 is important for glioblastoma tumorigenicity. Biochemical and Biophysical Research Communications 460, 216 ~ 221 (2015) 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.012

Koyama-Nasu Ryo, Hayashi Tomoatsu, Nasu-Nishimura Yukiko, Akiyama Tetsu & Yamanaka Ryuya. Thr160 of Axin1 is critical for the formation and function of the  $\beta$ -catenin destruction complex. Biochemical and Biophysical Research Communications 459, 411 ~ 415 (2015) 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.118

〔学会発表〕(計3件)

那須 亮, 奥山 一生, 扇屋 大輔, 穂積 勝人, 村田 暁彦, 安藤 潔, 幸谷 愛. Functional and comprehensive investigation of microRNA targeting Notch receptors. 第14回幹細胞シンポジウム, 2016年05月20日, 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県, 淡路市)

那須 亮, 奥山 一生, 扇屋 大輔, 穂積 勝人, 村田 暁彦, 安藤 潔, 幸谷 愛. Identification of Notch-targeting miRNA that regulates B cell development and has therapeutic potential in T-ALL. 第20回造血器腫瘍研究会, 2016年02月13日, かずさアーク (千葉県, 木更津市)

那須 亮, 奥山 一生, 扇屋 大輔, 穂積

勝人, 村田 暁彦, 安藤 潔, 幸谷 愛. Identification of Notch-targeting miRNA that regulates B cell development and has therapeutic potential in T-ALL. 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月08日, 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市)

〔その他〕  
ホームページ等  
千葉大学大学院医学研究院免疫発生学  
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 亮 (NASU, Ryo)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号: 30466859

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )