

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15640

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞epigeneticsの盲点をついた新規がん幹細胞標的治療法開発

研究課題名(英文) Taking advantage of a pitfall in glioma cancer stem cell epigenetics to develop novel therapies directed to cancer stem cells

研究代表者

北中 千史 (KITANAKA, Chifumi)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70260320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞は腫瘍創始能と治療耐性を併せ持つごく少数の未分化がん細胞集団であり、不可逆的に分化することで、腫瘍の大部分を構成する治療感受性で腫瘍創始能をもたない非がん幹細胞を生じると考えられている。がん幹細胞は治療後再発の要因として注目されており、グリオブラストーマでもがん幹細胞(グリオーマ幹細胞)に対する治療法開発は長期予後改善の鍵を握ると期待されている。本課題では「ヒストンH3リシン27(H3K27)のトリメチル化がグリオーマ幹細胞の分化誘導に促進的に関与する」という我々独自の、従来の常識に照らして逆説的な仮説の検証を試み、もって斬新なグリオーマ幹細胞治療法の開発へと繋げることを目指した。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells are a small subpopulation of immature, undifferentiated tumor cells characterized by therapy resistance as well as by their ability to initiate tumors on one hand and on the other to undergo differentiation into mature, non-cancer stem cells that no longer retain therapy resistance or tumor-initiating capacity. As such, cancer stem cells are deemed a major culprit of post-treatment tumor recurrence and therefore a key therapeutic target in the development of curative cancer therapies. Here in this research project, we tested our original working hypothesis that tri-methylation at H3K27 promotes the differentiation of glioma stem cells, an idea apparently paradoxical to what has been widely believed in the field of glioma stem cell research, in an attempt to develop novel therapies directed against glioma stem cells.

研究分野：脳神経外科学、脳腫瘍学

キーワード：glioma-initiating cells

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療の重要なターゲットとしてがん幹細胞が注目を集めている。がん幹細胞は腫瘍細胞中のごくわずかを占める小集団ではあるものの、治療抵抗性と腫瘍形成能を併せ持つため治療後再発の原因となっており、がんの治癒を阻む最大要因と考えられている。従ってヒトがんの中でも難治を極めるグリオブラストーマの根治を実現するうえで、がん幹細胞の制御が必須不可欠のプロセスとして認識されつつある。然るにがん幹細胞制御戦略としては、細胞死に対する高度耐性を有するがん幹細胞を生体内で選択的に殺傷することは容易でないことから、がん幹細胞を非がん幹細胞へと分化誘導する方法が現実的な治療戦略として注目されている。がん幹細胞はその名の由来する通り、基本的に組織幹細胞と同じく一方向性・不可逆的な分化能を有しており、一旦非幹細胞へと完全分化すると少なくとも生理的条件下では再がん幹細胞化の可能性は極めて低い(北中千史: グリオーマ幹細胞. 脳神経外科ジャーナル 24:385-365, 2015)。

以上からも想像できるように、幹細胞の分化に関わる分子機序、特に分化の epigenetic 制御に関する知見は、がん幹細胞の分化誘導療法開発に有意義な情報をもたらすことが期待される。この点については H3K27「メチル化」酵素である EZH2 がグリオーマ幹細胞の維持に必要であるとの先駆的報告がなされ、以来 EZH2 が oncogene であるとの一般的通念と相まって EZH2 の抑制すなわち H3K27「脱」メチル化がグリオーマ幹細胞標的治療となるものと考えられて来た (*Cancer Res* 69:9211-9218, 2009; *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:381-394, 2011)。しかしながら、細胞の幹細胞性維持、分化誘導における EZH2 の役割は実はそれほど単純なものではなく、ごく最近にも EZH2 を標的とするグリオーマ幹細胞治療の孕む問題点、危険性が指摘されたところである (Prolonged Ezh2 depletion in glioblastoma causes a robust switch in cell fate resulting in tumor progression. *Cell Rep* 10:383, 2015)。

一方我々は我々独自の未発表知見および文献報告に基づく合理的推論から、「H3K27メチル化は幹細胞状態の維持のみならず分化誘導においても重要な役割を果たしており、H3K27のメチル化を促進することでむしろがん幹細胞の分化誘導が可能である」との仮説を構築した。一見従来の報告とは全く対立的な仮説ではあるが、我々の仮説は従来の報告と矛盾するものではなく、むしろ先行論文の結果と問題点を合理的に説明するものである。そこで本課題ではこういった我々独自の仮説を、特に「H3K27脱メチル化酵素」に着目しながら検証を行うとともに、将来的には H3K27 脱メチル化酵素阻害薬 (GSK-J4)

を用いた全く新たなグリオーマ幹細胞治療法の開発につながるような研究を目指した。

2. 研究の目的

H3K27 脱メチル化酵素 (JMJD3, UTX) の阻害がグリオーマ幹細胞における H3K27 のメチル化促進を通じてグリオーマ幹細胞の非幹細胞への分化を誘導する効果があるか否かを明らかにするとともに、H3K27 脱メチル化酵素阻害薬である GSK-J4 にグリオーマ幹細胞治療効果があるか否かについても検証を行う。

3. 研究の方法

JMJD3, UTX に対する siRNA を単独ないし組み合わせでグリオーマ幹細胞に導入することで JMJD3, UTX の発現を抑制し、H3K27 のメチル化状態に与える影響を評価する。さらに JMJD3, UTX のノックダウンにより H3K27 メチル化の促進が確認できた場合は、その条件下でグリオーマ幹細胞の非幹細胞化が促進されているかをマーカー解析等により評価する。同様に JMJD3, UTX の薬理的阻害薬である GSK-J4 がグリオーマ幹細胞の H3K27 メチル化状態に与える影響を調べるとともに、グリオーマ幹細胞の非幹細胞化を誘導する効果があるかについて検討を行う。

4. 研究成果

JMJD3, UTX の遺伝子ノックダウンについては、いずれの遺伝子についてもある程度の発現抑制を得られる実験条件を確立することができたが、その条件下では H3K27 メチル化状態に明らかな一定の変化を確認するには至らなかった。ただ、これが JMJD3, UTX のノックダウンの程度がまだ不十分なことによるのか、あるいは JMJD3, UTX の機能抑制は十分なるもこれら以外の他の脱メチル化酵素がグリオーマ幹細胞で機能しているためなのか等については明らかにすることができなかった。

一方、GSK-J4 については、全く予想外なことに低濃度の GSK-J4 によりグリオーマ幹細胞が死滅してしまうことが明らかになり、その結果 GSK-J4 の分化誘導作用を調べるための至適条件の設定が予想以上に困難となった。そこで細胞死が評価結果に影響を及ぼさないと考えられる条件を模索・設定し検討を試みたが、一部のグリオーマ幹細胞では GSK-J4 処理により H3K27 メチル化レベルの上昇が認められたものの、一部のグリオーマ幹細胞では一定の傾向が得られず、結論を得るにはさらなる検討が必要と考えられた。尚、グリオーマ幹細胞ではないが、我々が本課題の作業仮説として掲げた仮説を乳がんのがん幹細胞を対象として検証し、仮説の妥当性を実証した研究成果がごく最近報告された

(GSKJ4, an H3K27me3 demethylase inhibitor, effectively suppresses the breast cancer stem cells. *Exp Cell Res* 359:405, 2017)。乳がんとグリオーマが全く同じとは言えないが、今後さらなる検討により本課題の当初の仮説が実証できる可能性は十分にあるものと考えられ、その成果は GSK-J4 等の阻害薬を用いたグリオーマ幹細胞標的治療の開発につながるものと期待される。

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9件)

- 1) Okada M, Takeda H, Sakaki H, Kuramoto K, Suzuki S, Sanomachi T, Togashi K, Seino S, Kitanaka C: Repositioning CEP-1347, a chemical agent originally developed for the treatment of Parkinson's disease, as an anti-cancer stem cell drug. *Oncotarget*. 2017; 8(55):94872-94882. doi: 10.18632/oncotarget.22033. (査読有)
- 2) Takeda H, Okada M, Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Hirano H, Arita K, Kitanaka C: Antitumor activity of gemcitabine against high-grade meningioma in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2017; 8(53):90996-91008. doi: 10.18632/oncotarget.18827. (査読有)
- 3) Sanomachi T, Suzuki S, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Togashi K, Seino S, Yoshioka T, Okada M, Kitanaka C: Olanzapine, an Atypical Antipsychotic, Inhibits Survivin Expression and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents. *Anticancer Res*.2017; 37(11):6177-6188. DOI: 10.21873/anticancerres.12067 (査読有)
- 4) Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Takeda H, Sanomachi T, Seino S, Narita Y, Kayama T, Kitanaka C, Okada M: Liccochalcone A specifically induces cell death in glioma stem cells via mitochondrial dysfunction. *FEBS Open Bio*.2017;7:835-844. doi: 10.1002/2211-5463.12226. (査読有)
- 5) Takeda H, Okada M, Suzuki S, Kuramoto K, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C: Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) Inhibitors Inhibit Survivin Expression and Sensitize Pancreatic Cancer Stem Cells to Gemcitabine. *Anticancer Res*. 2016;36:6311-6318. DOI: 10.21873/anticancerres.11227 (査読有)
- 6) Watarai H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Suzuki S, Seino S, Oizumi H, Sadahiro M, Kitanaka C: Impact of H3K27 Demethylase Inhibitor GSKJ4 on NSCLC Cells Alone and in Combination with Metformin. *Anticancer Res*. 2016;36:6083-6092. DOI: 10.21873/anticancerres.11198 (査読有)
- 7) Suzuki S, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C: Aripiprazole, an Antipsychotic and Partial Dopamine Agonist, Inhibits Cancer Stem Cells and Reverses Chemoresistance. *Anticancer Res*. 2016;36:5153-5161. DOI: 10.21873/anticancerres.11085 (査読有)
- 8) Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Sakaki H, Seino S, Seino M, Suzuki S, Kitanaka C: The novel JNK inhibitor AS602801 inhibits cancer stem cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2016;7:27021-27032 doi:10.18632/oncotarget.8395. (査読有)
- 9) Seino M, Okada M, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Kuramoto K, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C: Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. *Oncol Rep* 2016;35(1):593-601 doi:10.3892/or.2015.4377. (査読有)

[学会発表](計6件)

- 1) 岡田雅司, 鈴木修平, 倉元謙太, 武田弘幸, 北中千史: がん幹細胞における JNK 経路の機能解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸(神戸国際会議場); 2017 年 12 月 6 日
- 2) 北中千史: 悪性グリオーマの新規治療戦略. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜(パシフィコ横浜); 2017 年 9 月 30 日
- 3) 岡田雅司, 鈴木修平, 清野学, 武田弘幸, 北中千史: 新規 JNK 阻害薬である AS602801 はがん幹細胞を抑制する. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜(パシフィコ横浜); 2016 年 9 月 28 日
- 4) 北中千史: グリオーマがん幹細胞. 第 37 回コンgres 総会, 横浜(パシフィコ横浜); 2017 年 5 月 11 日
- 5) 岡田雅司, 北中千史: グルコース代謝の抑制はがん幹細胞の幹細胞性維持

および腫瘍創始能を抑制する. 第 59
回放射線影響学会, 広島(JMS アステー
ルプラザ); 2016 年 10 月 27 日

- 6) 岡田雅司, 鈴木修平, 清野学, 武田
弘幸, 北中千史: 促進性グルコース輸
送体 GLUT1 阻害は癌幹細胞の自己複製
能と腫瘍形成能を抑制する. 第 75 回日
本癌学会学術総会, 横浜(パシフィコ
横浜); 2016 年 10 月 6 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北中 千史 (KITANAKA CHIFUMI)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 70260320

(2) 連携研究者

岡田 雅司 (OKADA MASASHI)
山形大学・医学部・講師
研究者番号: 70512614