

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18447

研究課題名(和文) グリオーマを抑制するRelB-NFkB2シグナル阻害剤のスクリーニング

研究課題名(英文) Search of RelB-NFkB2 signal inhibitor using Glioma-initiating cells

研究代表者

大津 直樹(Ohtsu, Naoki)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：10588403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ(GBM)に対する抗がん剤は、ほぼテモゾロミド1種類だけであり、テモゾロミドの効果がない場合に他の抗がん剤を選ぶ選択肢が少ない。我々はグリオーマの研究からハイグレードグリオーマにおいてRelB-NF- B2のシグナルが活性化することを明らかにした。このためグリオーマの抑制にはRelB-NF- B2のシグナルを抑制する方法が効果的と考えられた。そこでRelB-NF- B2シグナル阻害剤の探索するために、RelAシグナルを認識しないRelBシグナルモニタリング細胞を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RelB遺伝子の活性化モニタリング細胞を開発することにより、RelB活性化型のGBMに対する抗がん剤の検索が可能になった。このことによりGBMに対する治療の選択肢を増やし、発症後の生存年数や病状が抑えられた期間を延長させること及び再発の防止ができる可能性を見出した。またGBMにおいてもCrispr/Cas9システムを用いたゲノム編集が可能であったため、Eva1やRelBを分子標的としてゲノム編集を用いたこれまでにない治療方法開発の方向性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma multiform is malignant Brain tumor. There is no anti-cancer drug for gliomas other than temozolomide, and if there is no effect of temozolomide, there is no other choice. Our glioma studies revealed that the RelB-NF- B2 signal pathway is activated in GBM. Therefore, suppressing RelB-NF- B2 signal is effective for the treatment of glioma. Therefore, in order to search for RelB-NF- B2 signal inhibitors, we developed RelB signal monitoring cells that did not recognize RelA signal.

研究分野：ガン幹細胞

キーワード：Glioblastoma: multiform Glioma-initiating cell NF-kB pathway Eva1 Genome editing RelA RelB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ (Glioblastoma multiforme: GBM, WHO grade IV) に対する抗がん剤は、ほぼテモゾロミド 1 種類だけであり、テモゾロミドの効果がない場合に他の抗がん剤を選ぶ選択肢が少ない。我々はこれまでに正常神経幹細胞 (neural stem cell; NSC) から人工マウスグリオーマ幹細胞 (induced glioma-initiating cell, iGIC) 株を作製し、その遺伝子発現を網羅的に解析することで GIC 特異的因子群を同定、それらの機能について解析してきた。グリオーマ特異的遺伝子の一つである膜タンパク質 Eva1 遺伝子をノックダウンさせた GBM を免疫不全マウスに移植した場合、腫瘍形成能が抑制されるため、Eva1 はグリオーマの悪性度の亢進に関わることが明らかになった。また、シグナル経路の解析からは下流で RelB-NFκB2 のシグナルを活性化することが明らかになった。このためグリオーマの抑制には Eva1 自体の機能を抗体や阻害剤で抑制する方法に加えて、Eva1 の下流で活性化する RelB-NFκB2 のシグナルを抑制する方法も効果的であると考えられた。

2. 研究の目的

当初の背景から GBM を治療する方法の一つとして RelB を介したノンカノニカルパスウェイを抑制することが有効であると考えられた。近年の研究により GBM における NF-κB シグナルの重要性も認められている。NF-κB シグナルの大部分は IκB ファミリーに制御されている RelA を介したカノニカルパスウェイあり、その阻害剤は複数開発されている。NF-κB 阻害剤の一つである CAPE はノンカノニカルパスウェイも抑制するが、シグナル選択的ではない。我々の研究結果からも RelB がグリオーマに対する重要な標的因子であることが明らかになったため、RelB の阻害剤を見出すことが、有効な抗がん剤がテモゾロミドしかないという現状に対して打開策になると考えられた。そこで本研究では RelB シグナルを選択的に抑制する阻害剤のスクリーニング系を作成しつつ hGIC における NF-κB シグナルを解析することと、薬剤スクリーニングに取り組む計画である。

3. 研究の方法

(1) スクリーニング系の確立

阻害剤のスクリーニングには RelB-NF-κB2 シグナルが優位に活性化している細胞が必要である。既に我々が報告している hGIC である GBM E3 及び GBM E6 株は RelB のシグナルが活性化している^{1,2}。また、我々が樹立した Diffuse astrocytoma (DA, WHO grade II) は、Eva1 を強制発現させることによって NF-κB 阻害剤の感受性が高まることが明らかになったため² DA を用いることも考えられた。これらの細胞は RelB のノックダウンにより細胞増殖や腫瘍形成能の低下が明らかになっているため有効だと考えられた。さらに RelA の活性を完全に無効にするために、Crisper/Cas9 を用いたゲノム編集により RelA をノックアウトした細胞を作製した(図 1)。スクリーニングベクターとしては NF-κB1 は結合しない NF-κB2 特異的な結合配列である 5'-AGGAGACTTG-3'^{3,4} を 4 回繰り返した配列の下流に SV40 minimal プロモーター、ルシフェラーゼ、及び GFP 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを構築した(図 2A)。このベクターを RelA KO hGIC に導入することでスクリーニング用細胞とした。

(2) スクリーニング

Hokkaido University drug library にある約 1 万種類の薬剤を使用できる状態にあった。この中から正常ヒト神経幹細胞株に対して毒性があるものを除いて RelB-NF-κB シグナル選択的阻害剤のスクリーニングを行う必要があった。北海道大学のオープンファシリティ装置設置施設に設置された自動ディスペンサーである Multidrop combi (thermo)を用いること短時間で再現性よく細胞や試薬の分注を行うことができる。drug library の薬剤を作成したスクリーニング用細胞(図 2)と共に 2-3 日培養後、発光基質を加えると、ルシフェラーゼが活性化する。ルミノメーター(Glomag; Promega)を用いて活性を測定することで、RelB の活性を抑制する阻害剤を選択する。

4. 研究成果

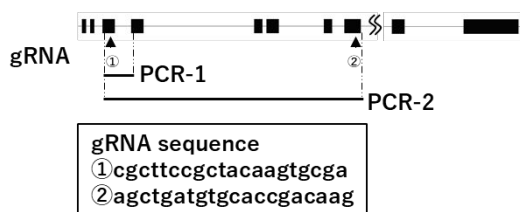
(1) hGIC における RelA 遺伝子の KO

申請者の研究室では Crispr/Cas9 を用いたゲノム編集を用いて培養細胞の遺伝子組み換え系が構築されていた(主な発表論文 1)。RelA 遺伝子は 10 個の exon と 9 個の intron から構築される(図 1A)。Exon3 と Exon8 に相当する 2 カ所の配列に Guide RNA (gRNA) を設計した。gRNA と Cas9 を発現させるためにオールインワンベクターの一つである pX330 に gRNA に相当するオリゴ DNA を挿入しノックアウトベクターとした。T7E1 アッセイによりそれぞれのノックアウトベクターを行うことで目的の RelA ゲノム配列を切断していることが明らかになった(data not shown)。そこで 2 種類のノックアウトベクターを hGIC にトランスフェクションすることで RelA ノックアウト hGIC クローンの取得を試みた。2 種類の gRNA を使用すればゲノムが切り抜かれるためノックアウト株の選択が比較的容易と考えられた。

樹立した hGIC はもともと増殖が遅い細胞株ではあったがシングルセルソーティング後の細胞増殖に非常に時間を要した。シングルセル培養からヘテロ細胞は 6 株、ノックアウト細胞は 2 株だけ得られた。図 1B に RelA の遺伝子型を示している。二カ所で切り抜かれているため、プ

ライマーを二つの間に設計した PCR-1 では野生型のみで検出された。gRNA の外側にプライマーを設計した PCR-2 では RelA が切り抜かれた 192bp のバンドは RelA KO GIC にのみ検出された。また Western Blotting 解析により RelA タンパク質が発現していないことも明らかになった(図 1C)。

(A) hRelA genome structure



(B) Genotype of hRelA in RelA KO hGIC



(C) Expression of hRelA in RelA KO hGIC

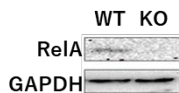


図1 RelA KO hGICクローンの作成

これらの結果より RelA KO GIC 株が樹立できたことが明らかになった。樹立後の増殖能はセレクションしていない GIC 株と同等であった(data not shown)。

(2) RelB シグナル検出ベクターの構築

NF- κ B1 への結合が弱い、NF- κ B2 への結合が強い配列 (図 2A) を 4 回繰り返したオリゴ DNA を、レポーターベクターである pGreenFire1 (pGF1, System Bioscience) に挿入した。このベクターを用いて作成したレンチウイルスを RelA hGIC に感染させ、GFP 陽性細胞細胞を FACS でソーティングした。まず hRelA 及び hRelB を過剰発現させた場合、RelB を過剰発現させると約三倍のルシフェラーゼ活性が認められた。また RelA 及び RelB のノックダウンベクターを導入すると、RelB をノックダウンした場合、コントロールと比較して 1/3 に活性が減少した。これらの結果から RelB により活性化される NF- κ B シグナルを認識するレポーター細胞を開発できた。

これを用いることにより RelB 選択的な薬剤をスクリーニングできると考えられた。

(A)



(B)

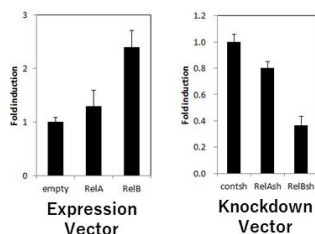


図2 RelB シグナル検出ベクターの作成

引用文献

1 Kaneko, S. *et al.* Ceacam1L Modulates STAT3 Signaling to Control the Proliferation of Glioblastoma-Initiating Cells. *Cancer Res* **75**, 4224-4234, (2015).

- 2 Ohtsu, N. *et al.* Eva1 Maintains the Stem-like Character of Glioblastoma-Initiating Cells by Activating the Noncanonical NF-kappaB Signaling Pathway. *Cancer Res* **76**, 171-181, (2016).
- 3 Gasparini, C., Foxwell, B. M. & Feldmann, M. RelB/p50 regulates CCL19 production, but fails to promote human DC maturation. *Eur J Immunol* **39**, 2215-2223, (2009).
- 4 Bonizzi, G. *et al.* Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J* **23**, 4202-4210, (2004).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. A novel CRISPR/Cas9-based transcriptional activation method. Katayama S., Moriguchi T., Ohtsu N, Kondo T. *Angew Chem Int Ed Engl.* (2016) vol.55, p6452-6456. 査読あり
2. Chemical screening identifies EUrd as a novel inhibitor against Temozolomide-resistant glioblastoma-initiating cells. Tsukamoto Y, Ohtsu N, Echizenya S, Otsuguro S, Ogura R, Natsumeda M, Isogawa M, Aoki H, Ichikawa S, Sakaitani M, Matsuda A, Maenaka K, Fujii Y, Kondo T. *Stem Cells.* (2016) vol. 34, p2016-2025 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

1. 神経幹細胞がグリオーマ幹細胞に変化するプロセスにおける Eva1 遺伝子の発現モニタリング. 大津直樹, 近藤亨, 日本分子生物学会 2018@パシフィコ横浜 (ポスター発表)
2. Inhibition of Eva1 degrade the formation and development of glioblastomas, Ohtsu N, Kondo T, 2nd International conference on Tumor & Cancer Immunology and Immunotherapy (2017) @ Cicago, USA (poster presentation, BEST POSTER AWARD)
3. Eva1 maintains the characteristics of glioblastoma-initiating cells through the activation of non-canonical NF-kB signaling pathway., Ohtsu N, Kondo T, Keystone Symposia Stem Cells and Cancer (2016) @ Colorad, USA (poster presentation)
4. Eva1 maintains the characteristics of GBM through the activation of non-canonical NF-kB signaling pathway. Ohtsu N., Kanazawa Univ-Hokkaido Univ International Cancer Forum for Young Scientists. (2016)@Sapporo, (oral presentation)
5. グリオブラストーマ幹細胞に高発現している膜タンパク質 Eva1 の機能解析. 大津直樹, 癌談話会春季シンポジウム (2016)@札幌 (口頭発表)
6. Eva1 はマウス及びヒトのグリオーマ形成能を亢進させる. 大津直樹, 近藤亨. 北大・部局横断シンポジウム 研究ネットワーク促進プログラム「生体防御システムとその破綻 ～免疫・感染・癌・炎症～」(2016) @札幌市 (ポスター発表)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/stemcell/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。