

令和元年6月6日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16665

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞の免疫抑制能を標的とした新たな治療方法の検討

研究課題名(英文) Exploring for the novel treatment targeting the immune function of glioma stem cell

研究代表者

山室 俊 (YAMAMURO, Shun)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：30790886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫に対する新規治療法を開発すべく、膠芽腫の悪性度に強く関与しているグリオーマ幹細胞の免疫機構、なかでも自己免疫を抑制する分子であるIDO1の発現について詳細に検討した。市販および手術患者検体由来の膠芽腫細胞株を用い、各々を無血清培地で一定期間培養することでグリオーマ幹細胞様の細胞株を樹立した。グリオーマ幹細胞様細胞株に対し、神経幹細胞のマーカー分子およびIDO1の発現を解析したところ、これらの分子の発現が上昇していることが確認された。このことは、グリオーマ幹細胞がIDO1を高発現することで自己免疫を抑制し、膠芽腫の悪性度に寄与していることを示しており、新たな治療標的になり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性度の高い腫瘍であり、現在の標準治療に加え様々な新規治療が研究開発されているにも関わらず、その予後はいまだに極めて不良である。膠芽腫の悪性度にグリオーマ幹細胞が強く関与していることが知られているが、その性質や治療抵抗性を示すメカニズムに関しては分かっていないことが多い。本研究により、グリオーマ幹細胞が通常の膠芽腫細胞よりもIDO1を多く発現することにより、自己免疫をより強く抑制していることが明らかとなった。このことは、グリオーマ幹細胞の自己免疫抑制能が新たな治療標的になり得ることを示唆しており、膠芽腫の新規治療法を考えるうえで重要な突破口のひとつになると期待される。

研究成果の概要(英文)：We evaluate the immune function of glioma stem cells, which strongly related to the malignancy of glioblastoma (GBM), via analyzing of Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) expression. IDO1, the enzyme for Tryptophan metabolism, is involved in the ability of GBM to escape from immune surveillance, and show immunosuppressive function. We investigated the difference of IDO1 expression between glioma stem cells and normal GBM cells to search a new therapeutic target for GBM. We used human GBM cell lines U251, U87 and patient derived cell lines, and established glioma stem cell like cell lines by culturing those cell lines in serum-free media for 2 weeks. The expression levels of IDO1 in glioma stem cell like cell lines were significantly elevated compared to those in normal GBM cell line. These results indicate that glioma stem cells strongly escape from immune surveillance while producing more IDO1 compared to normal GBM cells, and this system could be a target of the novel GBM treatment.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 免疫療法 グリオーマ幹細胞

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

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は頻度が高く最も悪性度の強い脳腫瘍である。手術、放射線治療、化学療法を組み合わせた標準治療や、分子標的薬などの新たな治療が行われているが、その予後は依然として不良である。そのため、膠芽腫に対する新規治療方法を開発することが必要である。近年の研究により膠芽腫の悪性度ががん幹細胞の一種であるグリオーマ幹細胞が寄与していることが分かり、膠芽腫治療の標的として研究が進んでいる (Gupta PB, et al. *Nat Med* 15: 1010-1012, 2009) (Gupta PB, et al. *Cell* 146: 633-644, 2011)。また近年、他癌腫同様、膠芽腫においても免疫療法が注目されている。膠芽腫は、programmed cell death 1 (PD-1) や programmed death-ligand 1 (PD-L1)、cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4)、あるいは indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) や tryptophan 2,3-dioxygenase 2 などの酵素発現により自己免疫を抑制している (Fecci PE, et al. *Clin Cancer Res* 20: 5620-5629, 2014) (Pardoll DM. *Nat Rev Cancer* 12:252-64, 2012) (Larkin J, et al. *N Engl J Med* 373: 23-34, 2015)。なかでも、トリプトファン代謝酵素である IDO1 は、自己免疫に必須な T 細胞の活性を抑制することで自己免疫を抑制することが分かっており、IDO1 阻害剤は抗がん剤としても使用され始めている (Hanihara M, et al. *J Neurosurg* 124: 1594-601, 2016) (Muller AJ, et al. *Nat Med* 11: 312-9, 2005) (Uytenhove C, et al. *Nat Med* 9: 1269-74, 2003) (Munn DH, et al. *J Clin Invest* 114: 280-90, 2004) (Miyazaki T, et al. *J Neurosurg* 111: 230-7, 2009)。

膠芽腫に対する IDO1 阻害剤の抗腫瘍効果についても幾つか報告がなされており、マウスモデルで膠芽腫の悪性度に比例して IDO1 の発現が上昇することを示したのものや、放射線治療や化学療法との併用効果を示したものもある (Wainwright DA, et al. *Clin Cancer Res* 20: 5290-5301, 2014) (Kesarwani P, et al. *Clin Cancer Res* 24: 3632-43, 2018) (Hanihara M, et al. *J Neurosurg* 124: 1594-601, 2016)。

### 2. 研究の目的

このように、膠芽腫の悪性度と IDO1 の発現との関係を示した報告がある一方で、グリオーマ幹細胞と IDO1 の発現を検討した研究は今までなされていない。我々は、グリオーマ幹細胞には通常の膠芽腫細胞に比較してより多くの IDO1 が発現しているのではないかと考え、本研究の着想に至った。そこで、膠芽腫において IDO1 の発現が上昇していることを明らかにし、IDO1 によるトリプトファン代謝の亢進を標的とした新規治療方法を開発すべく、本研究を計画した。

### 3. 研究の方法

実験には市販のヒト膠芽腫細胞株である U-138MG および U-251MG および膠芽腫患者より手術により摘出した検体から樹立した患者由来グリオーマ幹細胞株である 0125-GSC および 0222-GSC (名古屋大学大学院脳神経外科より提供) を使用した。

U-138MG および U-251MG を一定期間以上無血清培地にて培養することで樹立した細胞株を Rev-U-138MG および Rev-U-251MG とし、グリオーマ幹細胞モデル細胞株として実験に使用した。また、0125-GSC および 0222-GSC を一定期間以上血清培地で培養して樹立した細胞株を 0125-DGC および 0222-DGC とし、グリオーマ幹細胞から分化した膠芽腫細胞のモデル細胞株とした。

各細胞株における IDO1 および神経幹細胞マーカー (Nestin、Nanog、Sox2、Oct4) の蛋白発現を Western blotting により解析した。また、mRNA の発現を RT-PCR により解析した。

### 4. 研究成果

前述した方法により U-138MG および U-251MG から、グリオーマ幹細胞モデル細胞株 Rev-U-138MG および Rev-U-251MG を樹立した。我々は過去に U-138MG および U-251MG は無血清培地で一定期間以上培養を継続すると、形態の変化とともにグリオーマ幹細胞の代表的なマーカー分子である CD133 の発現が上昇し、グリオーマ幹細胞様の性質を再獲得することを示してきた (Yamamuro S, et al. *Int J Oncol* 47: 1647-54, 2015)。U-138MG および U-251MG は元来、血清培地下で接着して増殖していくが、無血清培地で一定期間培養することで、幹細胞の特徴である浮遊の細胞塊 (sphere) を形成した (図 1)。反対に、グリオーマ幹細胞の細胞株である 0125-GSC および 0222-GSC は、元来無血清培地下で sphere を形成するが、血清培地にて一定期間培養することで、sphere を解消し、通常の膠芽腫細胞株と同様の形態に変化した。

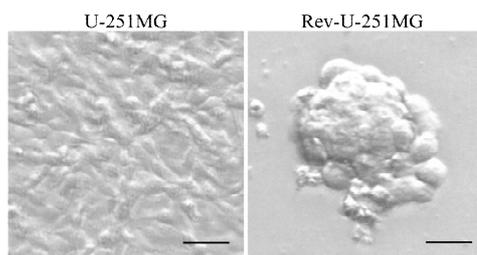


図 1 : U-251MG の形態変化  
血清培地で培養される U-251MG は、無血清培地で一定期間培養することで、sphere を形成した。

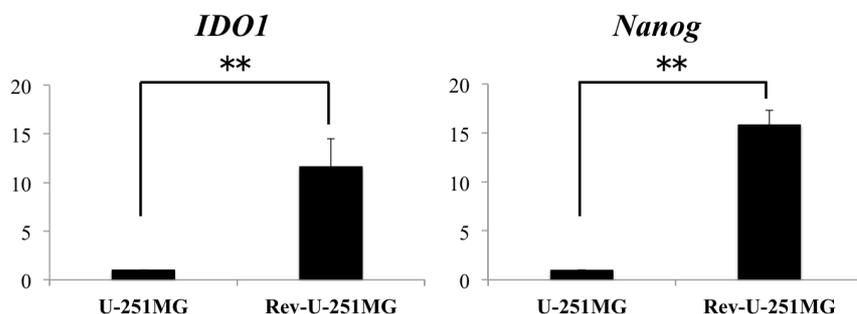
まず、今回新たに樹立したグリオーマ幹細胞モデル細胞株である Rev-U-138MG、Rev-U-251MG、および患者由来グリオーマ幹細胞株 0125-GSC、0222-GSC がグリオーマ幹細胞様の性質を有しているかを確認するため、これらの細胞株において神経幹細胞のマーカー分子である Nestin、Nanog、Sox2、Oct4 の蛋白発現を解析した。Rev-U-138MG、Rev-U-251MG、0125-GSC、0222-GSC におけるこれらの蛋白発現は、いずれも U-138MG、U-251MG、0125-DGC、0222-DGC と比較して多く認められた。

これらの結果を裏付けるために、Rev-U-138MG、Rev-U-251MG、0125-GSC、0222-GSC における *Nestin*、*Nanog*、*Sox2*、*Oct4* の mRNA 発現を RT-PCR にて解析し、それぞれ U-138MG、U-251MG、0125-DGC、0222-DGC と比較したところ、グリオーマ幹細胞モデル細胞株において、いずれも有意に発現が上昇していた (図 2 右)。これらの結果から、Rev-U-138MG、Rev-U-251MG、0125-GSC、0222-GSC をグリオーマ幹細胞モデル細胞株として使用することの妥当性が確認された。

グリオーマ幹細胞と分化した通常の膠芽腫細胞における免疫機構の違いを検討するために、それぞれの細胞株における IDO1 の蛋白発現を Western-blotting により解析した。IDO1 の蛋白は、Rev-U-138MG、Rev-U-251MG、0125-GSC、0222-GSC において、U-138MG、U-251MG、0125-DGC、0222-DGC よりも多く発現していた。これらの結果を裏付けるために、Rev-U-138MG、Rev-U-251MG、0125-GSC、0222-GSC における *IDO1* の mRNA 発現を RT-PCR にて解析し、それぞれ U-138MG、U-251MG、0125-DGC、0222-DGC と比較したところ、グリオーマ幹細胞モデル細胞株において、いずれも有意に発現が上昇していた (図 2 左)。これらの結果から、グリオーマ幹細胞は IDO1 を通常の膠芽腫よりも多く発現することにより、自己免疫をより強固に抑制していることが分かった。

図 2 : U-251MG の IDO1 および Nanog の発現変化

U-251MG を無血清培地で一定期間培養すると、*IDO1* および *Nanog* の発現が有意に上昇した ( $p < 0.01$ )。



我々は今までに、グリオーマ幹細胞から分化した通常の膠芽腫は再びグリオーマ幹細胞様の性質を(再)獲得し得ること、および、インターフェロンベータに膠芽腫細胞がグリオーマ幹細胞様の性質を再獲得することを抑制する作用があることを示してきた(Yamamuro S, et al. Int J Oncol 47: 1647-54, 2015)。そこで我々は、インターフェロンベータがグリオーマ幹細胞に対し、IDO1 の発現を抑制する効果を有するかを検討するため、Rev-U-138MG、Rev-U-251MG、0125-GSC、0222-GSC に対し、インターフェロンベータを投与した後に IDO1 の発現を解析した。予想に反し、インターフェロンベータ投与により、グリオーマ幹細胞モデル細胞株の IDO1 発現はさらに上昇した。

現在、グリオーマ幹細胞における IDO1 発現の上昇を阻害し得る薬剤を模索し、臨床応用すべく、種々の薬剤で研究を継続している。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

山室 俊、小澤 祥成、八木 千裕、龍岡 樹里、花島 裕也、吉村 相大、角 光一郎、佐野 恵海子、上田 卓也、吉野 篤緒: 未分化状態のヒト悪性神経膠腫細胞株は indoleamine 2,3-dioxygenase を高発現している。第 36 回日本脳腫瘍学会学術総会。2018 年 12 月、小田原。

Shun Yamamuro, Yuya Hanashima, Sodai Yoshimura, Emiko Sano, Takuya Ueda, Atsuo Yoshino: The alteration of immunosuppressive function in glioblastoma with undifferentiated transformation. SNO 2018 annual meeting (国際学会)。2018 年 11 月、米国ニューオーリンズ。

山室 俊、花島 裕也、吉村 相大、角 光一郎、吉野 篤緒: 膠芽腫における未分化性再獲得にともなう自己免疫抑制能の変化。第 13 回脳腫瘍の基礎シンポジウム、2018 年 5 月、東京。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者  
なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：吉野 篤緒、小澤 祥成

ローマ字氏名：YOSHINO Atsuo, OZAWA Yoshinari

※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。