

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15116

研究課題名（和文）脳腫瘍幹細胞におけるCD109の機能解析と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Functional analysis of CD109 in Brain Tumor.

研究代表者

白木 之浩 (Shiraki, Yukihiro)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40804753

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）：CD109の結合タンパク質の検索を行ったところ、CD109を強制発現させた細胞株を用い、LTBP1を同定することができた。LTBP1は潜在型TGF- β 活性化する際に重要な役割を担っているが、CD109がLTBP1存在下でTGF- β の活性化を促進していることを見出した。CD109が治療抵抗性に寄与するかどうかの検証については、CD109の有無で明確な差は認められなかった。CD109を標的とした治療を行うため、抗CD109抗体の作製を行い、CD109との結合活性の高い抗体を複数得ることができたが、中和活性や抗体依存性細胞傷害活性の高い抗体は得られず、現在もう一度新たに抗体を取得し検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD109は様々な腫瘍で悪性化・進展に関わる分子であるが、今回新たにCD109がLTBP1に対して結合して、TGF- β 活性化を促進するという機能を発見した。CD109を発現する腫瘍細胞と周囲の微小環境との関りを研究する上で重要な知見が得られたと考えている。

研究成果の概要（英文）：We identified latent TGF- β binding protein-1 (LTBP1) as a CD109-interacting protein using mass spectrometry and confirmed their interaction by co-immunoprecipitation. CD109 expression enhanced TGF- β activation in the presence of LTBP1. Although we tried to develop antibody drug against CD109, we could not obtain neutralizing antibody or antibody with ADCC activity.

研究分野：実験病理

キーワード：CD109

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫/膠芽腫は、原発性脳腫瘍の中で最も頻度が高く、十分な治療を行ったとしても再発・進行することは稀ではない。この治療抵抗性の要因としては、腫瘍幹細胞モデル等で説明される腫瘍内不均一性 (heterogeneity) が寄与していると考えられているが、腫瘍幹細胞の機能・性質については未だに不明な点が多い。我々が解析を続けてきた膜型タンパク質 CD109 は、様々な腫瘍で高発現しており、腫瘍の悪性化・進展に関わることを示してきたが、最近、新たに神経膠腫/膠芽腫において、CD109 の高発現が予後不良に関連し、特に脳腫瘍幹細胞 (Brain tumor stem cells; BTSC) で CD109 の発現が上昇する事を発見した。従って、CD109 は腫瘍の悪性化・進展を促進する機能を有する BTSC のマーカーであると考えられる。加えて、過去に我々が解析した CD109 ノックアウトマウスには致死的であるような重篤な変化が見られないことから、CD109 を標的とした治療を開発することで、副作用が少なく、幅広い腫瘍が対象となり得る治療法の確立が可能になると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、(1)神経膠腫/膠芽腫の悪性化・進展に関わる CD109 の機序の解明、(2)CD109 が治療抵抗性に関与しているという仮説の検証、(3)CD109 を標的とした治療法の開発とその有用性の評価という3項目を目的とし研究を行ってきた。

3. 研究の方法

(1) 神経膠腫/膠芽腫の悪性化・進展に関わる CD109 の機序の解明。

CD109 が神経膠腫/膠芽腫の BTSC に発現し、悪性化・進展に関与しているということは既に示されているが (Shiraki, et al, J Pathol. 2017)、CD109 には TGF- β シグナルを抑制する働きがあるという報告 (Hagiwara, et al, Oncogene. 2010;29 : 2181-91) や STAT3 シグナルに関連があるという報告 (Chuang CH, et al, Nat Med 2017;23:291-300) があり、神経膠腫/膠芽腫もこれらのシグナル伝達経路が関連する可能性が考えられるため、脳腫瘍マウスモデルから採取した脳腫瘍組織を用い、免疫沈降法などで結合タンパク質の検索を進め、どのようなシグナル伝達経路を介して関与しているのかを解明した。また、実際のヒトの腫瘍で起きている事象がどうか、免疫組織化学染色を用いることで評価し検証した。

(2) CD109 が治療抵抗性に関与しているという仮説の検証。

現在までに、神経膠腫/膠芽腫に一般的に使用されている薬剤テモゾロミドを脳腫瘍マウスモデルに投与した後において、CD109 陽性の腫瘍細胞が残存しているという結果を得ている (Shiraki, et al, J Pathol. 2017)。このことから、CD109 を発現している細胞が、治療抵抗性へも関与していると考えられ、CD109 の有無により薬剤の感受性が変化するかどうかを確認した。

(3) CD109 を標的とした治療法の開発とその有用性の評価。

CD109 は、悪性化・進展に関与し、CD109 陽性細胞が治療後に残存することから、CD109 を標的とした治療を通常の化学療法と併用することによって、高い効果を示す治療が可能になると考えられる。CD109 を標的とした治療としては、抗体依存性細胞傷害活性を有する、あるいは抗体薬物複合体作製に活用できる抗 CD109 抗体の開発を進めた。

4. 研究成果

(1) 神経膠腫/膠芽腫の悪性化・進展に関わる CD109 の機序の解明。

脳腫瘍マウスモデルから採取した脳腫瘍組織を用い、免疫沈降法を用いて CD109 の結合タンパク質の検索を行ったが、有意な結果が得られなかった。そのため、CD109 を強制発現させた HEK293 細胞を用いて、免疫沈降法と質量分析を行うことで、網羅的な検索を行った。その結果、CD109 結合タンパク質として latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1) を同定した。LTBP1 は活性のない潜在型 TGF β に結合するタンパク質で、他のタンパク質との相互作用により TGF β を活性化型として放出する機能を有している。そのため、活性化型 TGF β を定量する Luciferase アッセイを行うと、CD109 が LTBP1 存在下で TGF β 活性化を促進することが明らかになった。しかし、ヒト神経膠腫において LTBP1 の発現を免疫組織化学染色にて検討したところ、陽性となる領域が限られ、CD109 と LTBP1 が脳腫瘍内で相互作用しているということを示唆する結果は得られなかった。

(2) CD109 が治療抵抗性に関与しているという仮説の検証。

CD109 の有無によって、テモゾロミドの感受性が変化するかどうかを確認した。野生型マウス由来の脳腫瘍幹細胞と CD109 ノックアウトマウス由来の脳腫瘍幹細胞を単離し、その細胞を牛胎児血清存在下で分化させて、その細胞に対し、種々の濃度のテモゾロミドを付加することで、

治療抵抗性を評価した。しかし、いずれの条件においても、予想に反して明確な差を得ることができなかった。

(3) CD109 を標的とした治療法の開発とその有用性の評価。

新規抗体取得のため CD109 欠損マウスを用いて免疫を行い、リンパ節細胞を取得し、ハイブリドーマの作製、スクリーニングを施行することで特異性の高い抗 CD109 抗体を作製した。特に CD109 との結合活性が高い抗体を複数得ることができたため、その中和活性や抗体依存性細胞傷害活性について評価した。しかし、候補抗体における中和活性や抗体依存性細胞傷害活性はいずれの候補抗体においても低値であったため、治療に用いることができないと判断し、追加で抗体を作製することとなった。追加で作成した抗体は、腫瘍における CD109 には結合するが、非腫瘍性の細胞株における CD109 には結合しない、腫瘍特異的な抗 CD109 抗体と考えられる抗体が得られており、今後この抗体の有用性を検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizutani Y, Kobayashi H, Iida T, Asai N, Masamune A, Hara A, Esaki N, Ushida K, Mii S, Shiraki Y, et al.	4. 巻 79
2. 論文標題 Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5367 ~ 5381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-0454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mii Shinji, Enomoto Atsushi, Shiraki Yukihiro, Taki Tetsuro, Murakumo Yoshiki, Takahashi Masahide	4. 巻 69
2. 論文標題 CD109: a multifunctional GPI anchored protein with key roles in tumor progression and physiological homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 249 ~ 259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taki Tetsuro, Shiraki Yukihiro, Enomoto Atsushi, Weng Liang, Chen Chen, Asai Naoya, Murakumo Yoshiki, Yokoi Kohei, Takahashi Masahide, Mii Shinji	4. 巻 111
2. 論文標題 CD109 regulates in vivo tumor invasion in lung adenocarcinoma through TGF signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4616 ~ 4628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 滝哲郎、三井伸二、白木之浩、榎本篤、高橋雅英
2. 発表標題 肺腺癌における癌関連タンパク質CD109 の機能解析
3. 学会等名 第108 回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三井伸二、白木之浩、下山芳江、榎本篤、高橋雅英
2. 発表標題 骨組織および骨肉腫におけるGPI アンカー型膜タンパク質CD109 の発 現とその意義
3. 学会等名 第108 回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝 哲郎、三井 伸二、白木 之浩、榎本 篤、高橋 雅英
2. 発表標題 肺腺癌におけるGPIアンカー型膜タンパク質CD109の機能解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Mii , Yukihiko Shiraki , Tetsuro Taki , Atsushi Enomoto , Naoya Asai , Masahide Takahashi
2. 発表標題 Expression and clinical role of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein CD109 in non-squamous cell tumors
3. 学会等名 第64回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukihiko Shiraki , Shinji Mii , Naoya Asai , Atsushi Enomoto , Masahide Takahashi
2. 発表標題 The role of CD109 in Brain tumor stem cells derived from PDGFB-induced glioma mouse model
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三井 伸二、白木 之浩、榎本 篤、高橋 雅英
2. 発表標題 Dissection of the function of CD109 in lung adenocarcinoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------