

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07671

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞が形成するニッチの成立機構解明と阻害方法の確立

研究課題名(英文) Evaluation and targeting of the autonomous niche of glioma stem cells

研究代表者

サンペトラ オルテア (Sampetrea, Oltea)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50571113

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)：治療後半年以内に致死的な再発を引き起こす膠芽腫において、グリオーマ幹細胞(Glioma stem cell, GSC)は周囲環境への依存性が低く、生存、増殖に有利な成分を分泌することで自らニッチを形成する。しかし、そのような自律性ニッチの特性は十分に解明されていない。本研究では自律性ニッチの成立過程の可視化に成功し、そのニッチが腫瘍塊の周辺のみならず、離れた正常脳にも形成されることを明らかにした。また、低分子阻害剤スクリーニングより自律性ニッチの破綻を誘導する薬剤を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性腫瘍である膠芽腫において、その再発を防ぐ新しい治療戦略の確立が急務である。グリオーマ幹細胞が自ら形成するニッチの成立機構の解明、制御因子及び候補阻害剤の同定は膠芽腫再発機構に関する生物学的理解に貢献し、ニッチを破壊することで膠芽腫の根治につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Glioblastomas are fatal because they recur within months after treatment, with limited options for additional therapy. Glioma stem cells (GSCs), the cells causing recurrence form their own niche by secreting components favorable for survival and proliferation. However, the characteristics of the GSC autonomous niche have not been fully elucidated. In this study, we recorded the formation process of the autonomous niche and showed that, consistent with the recurrence patterns of glioblastomas, the niche is formed not only around the tumor mass but also in distant areas within the normal brain. Furthermore, through screening of small molecule inhibitors, we identified several drugs that disrupt the autonomic niche. Importantly, systemic factors were found to significantly influence the response of the tumor to these inhibitors. Further investigations of the interaction of the autonomous niche with systemic factors will thus be necessary to establish anti-niche therapies.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞 悪性脳腫瘍 ニッチ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞はニッチと呼ばれる特殊な微小環境の中に存在する。ニッチは癌幹細胞の性質維持に不可欠であることから、その機能阻害は癌幹細胞を根絶させる方法として注目されている。治療後半年以内に致死的な再発を引き起こす膠芽腫において、血管や低酸素領域がグリオーマ幹細胞 (Glioma stem cell, GSC) にとってニッチになりうる事が報告されている。しかし、ニッチの実態が十分に解明されておらず、有効な阻害方法も確立されていない。これまでの研究で、GSC が血管近傍及び低酸素領域以外にも生存しうる事、そして、一部の GSC が自らもニッチ因子を分泌し、ニッチを構築しつつ腫瘍塊を形成しうる事を見出した。本研究では GSC ニッチ阻害療法の確立を最終目標とし、GSC が構築する自律性ニッチ (GSC autonomous niche, GAuN) ニッチの成立条件、性質及び構成成分を明らかにし、さらに、その制御因子を同定することを目指した。

### 2. 研究の目的

GSC が構築する自律性ニッチの実態解明を最終目標に、本研究ではマウスの膠芽腫モデルを用いて

- (1) GAuN の構成成分同定
- (2) GAuN の制御因子の同定
- (3) GAuN の成立過程の可視化
- (4) GAuN の阻害方法の確立

を目的とした。

### 3. 研究の方法

膠芽腫モデルとして Ink4a/Arf<sup>-/-</sup> HRasV12<sup>+</sup>誘導型脳腫瘍幹細胞に基づいた移植モデルを用いて、in vitro の GSC スフェア、ex vivo の培養脳切片、in vivo の担癌マウスを活用し、以下の解析を実施した。

(1) GAuN 形成能力が高い GSC と低い GSC より RNA 抽出を行い、マイクロアレイ解析にて遺伝子発現プロファイルを評価した。また、GSC が分泌する液性因子を回収し、抗体アレイを用いて解析した。

(2) バイオインフォマティックスの手法を用いて、上記解析の結果及びヒト膠芽腫における遺伝子発現の大型国際データベースから GAuN を制御する因子の候補について検討した。

(3) 蛍光標識抗体及び蛍光色素を用いて、培養脳切片において血管、マイクログリア、低酸素領域等のライブイメージングを行い、GSC とのインターアクションについて検証した。GSC が形成する腫瘍塊並びに正常脳の経時的動画記録により GAuN 成立過程を可視化した。

(4) 自律性の高い GSC からスフェアを作製し、GAuN を形成させた。GAuN に対し低分子化合物ライブラリーを添加し、GAuN が破綻するスフェアの画像解析で細胞死を定量化し、薬剤による GAuN 破綻誘導の判定を行った。同定した薬剤については担癌マウスから作製した培養脳切片に添加し、その効果を評価した。

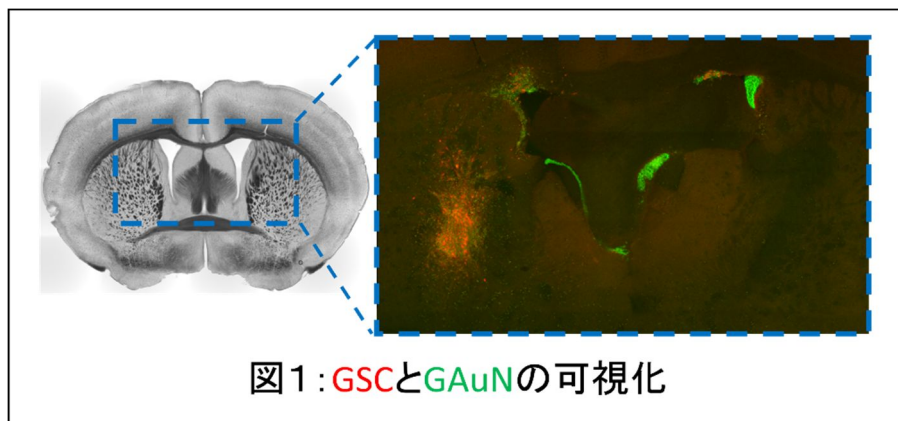
(5) 年齢が異なるマウスより正常神経幹細胞、脳腫瘍幹細胞を再度樹立し、年齢による GAuN 形成への影響を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) GAuN の構成成分解析：すでに樹立していた、自律性の高い GSC と自律性の低い GSC を用いて、その分泌プロファイル並びに遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、自律性の高い GSC は自ら自己複製能を促進する増殖因子の分泌のみならず、血管内皮細胞、免疫細胞の増殖、遊走を促進する因子、細胞外マトリックスのリモデリング関連因子を分泌していることを明らかにした。さらに、自律性の高い GSC において酸化的リン酸化関連の因子が有意に高いことを見出した。

(2) GAuN の制御因子解析：自律性の高い GSC からスフェアを形成させ、外的ニッチ因子を添加せず、GAuN のみが成立している条件で 3D 培養を行った。GAuN 中の GSC に対し酸化的リン酸化阻害剤を投与した結果、一部の阻害剤が活性酸素及び脂質酸化を上昇させることで GAuN の破綻を誘導することを見出した。この結果より、REDOX 関連因子が GAuN のマスター・レギュレーターであることを見出した。

(3) GAuN の可視化：自律性の高い GSC をマウスの前脳に移植し、腫瘍を形成させた。培養脳切片のリアルタイム・イメージングより、GSC が腫瘍塊と離れた正常脳まで微小環境を変性させ、新しいニッチを形成することを明らかにした (図 1)。さらに、酸化的リン酸化阻害剤の投与により GAuN が破綻する過程を動画として記録することに成功した。



(4) GAuN の阻害方法確立：自律性の高い GSC 及び低分子化合物ライブラリーを用いて GAuN 破綻を誘導する薬剤を探索した (図 2、赤：死細胞、黄色：GAuN 破綻誘導薬剤)。その結果、1320 種類の低分子化合物より 10 $\mu$ M でニッチ破綻を引き起こす 14 化合物を同定した。14 化合物から血液脳関門の通過性が高い 5 化合物を選定し、ex vivo の効果検証実験を開始した。担癌マウスより作製した培養脳切片に対し投与を行い、薬剤耐性の出現、併用療法の必要性について判断した。効果が高い薬剤でも一部の幹細胞が内因性の耐性を有することが明らかになったため、酸化的リン酸化阻害剤との併用投与の評価を開始した。

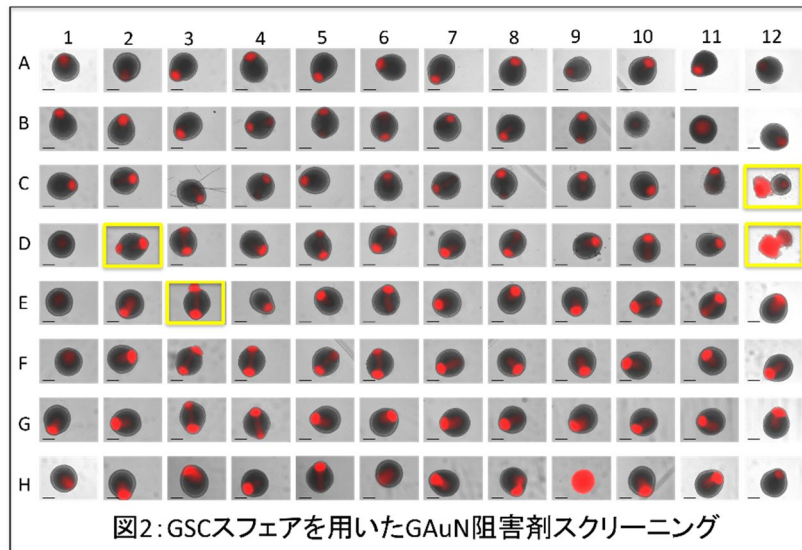


図2: GSCスフェアを用いたGAuN阻害剤スクリーニング

一部の GSC は GAuN 破綻後に再度スフェアを構築したことから、薬剤耐性を有することが疑われた。その原因を検証するため、GAuN 療法の標的となりうる GSC についても再度絞り込みを行った。薬剤耐性の原因となる内的因子探索を開始し、年齢による影響の解析から着手した。8 週齢と 28 週齢の *Ink4a/Arf*<sup>-/-</sup> マウスより神経幹細胞及び GSC を樹立し、GAuN の形成能力を比較した。28 週齢マウス由来の GSC では増殖能、腫瘍形成能とも不均一性が高く、自律性が高い GSC が多く含まれていた。得られた結果より GAuN を形成する確率が年齢と共に上昇する可能性が示唆され、今後、その分子基盤の詳細な解析が必要であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Osuka Satoru, Zhu Dan, Zhang Zhaobin, Li Chaoxi, Stackhouse Christian T., Sampetean Oltea, Olson Jeffrey J., Gillespie G. Yancey, Saya Hideyuki, Willey Christopher D., Van Meir Erwin G.	4. 巻 131
2. 論文標題 N-cadherin upregulation mediates adaptive radioresistance in glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI136098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Namba Naoko, Chonan Yuta, Nunokawa Takehito, Sampetean Oltea, Saya Hideyuki, Sudo Ryo	4. 巻 27
2. 論文標題 Heterogeneous Glioma Cell Invasion Under Interstitial Flow Depending on Their Differentiation Status	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 467-478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2020.0280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagashima Hideaki, Koike Naoyoshi, Yoshida Kazunari, Saya Hideyuki, Sampetean Oltea	4. 巻 69
2. 論文標題 Antifungal Agent Luliconazole Inhibits the Growth of Mouse Glioma-initiating Cells in Brain Explants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 97 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2302/kjm.2020-0001-0A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koike Naoyoshi, Kota Ryuichi, Naito Yoshiko, Hayakawa Noriyo, Matsuura Tomomi, Hishiki Takako, Onishi Nobuyuki, Fukada Junichi, Suematsu Makoto, Shigematsu Naoyuki, Saya Hideyuki, Sampetean Oltea	4. 巻 3
2. 論文標題 2-Nitroimidazoles induce mitochondrial stress and ferroptosis in glioma stem cells residing in a hypoxic niche	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01165-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 サンベトラ オルテア、佐谷 秀行	4. 巻 270(5)
2. 論文標題 がん幹細胞とメタボロミクス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 417-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 サンベトラ オルテア、南 徳明、佐谷 秀行
2. 発表標題 脳内メタボライツによる正常神経幹細胞及び脳腫瘍幹細胞の制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ <a href="http://www.genereg.jp/">http://www.genereg.jp/</a>
---

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
---------	---------