

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18446

研究課題名（和文）グリオーマの増殖を抑制する転写因子の解明

研究課題名（英文）Elucidation of transcription factors that suppress glioma

研究代表者

山村 奈津美（YAMAMURA, Natsumi）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90809914

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）：がんの再発の原因として、がん幹細胞の存在が注目されている。本研究では、手術で切除されたグリオーマから、がん幹細胞を樹立した。そして、抗てんかん薬のペランパネルにより細胞増殖が抑制されるがん幹細胞株を見いだした。RNAシーケンス解析により、がん幹細胞においてAMPA3受容体の発現を認めた。その転写因子としてMEF2AおよびGATA4を明らかにした。以上の成果は、AMPA3受容体がグリオーマの治療の標的に成り得る可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマは強い浸潤能がある。そのため、腫瘍細胞は脳の正常部位に深く染み渡り、外科手術では全摘出できない。さらに化学療法と放射線治療の集学的治療を行っても、治療抵抗性をもつがん幹細胞が増殖をくりかえす。再発の根源であるがん幹細胞をターゲットとした治療法は有効であると考えられる。本研究成果は、がん幹細胞が発現する受容体と転写因子を明らかにした。これらの分子は、グリオーマの治療の標的になりうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The presence of cancer stem cells is drawing attention as a cause of cancer recurrence. In this study, we established cancer stem cells from surgically resected gliomas. Then, we found glioma stem cell lines in which proliferation was suppressed by the antiepileptic drug perampanel. RNA sequence analysis revealed the expression of AMPA3 receptor in the glioma stem cells. MEF2A and GATA4 were identified as the transcription factors. These results suggest that the AMPA3 receptor may be a potential therapeutic target for glioma.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：グリオーマ AMPA受容体

## 1. 研究開始当初の背景

悪性度の高いグリオーマ(膠芽腫)は、治療後にならず再発し、平均余命は約1年である。ここ30年間、生存期間がほとんど延長しておらず、根治療法の確立にはさらなる病態の解明が必要である。

最近、がんの再発や転移の原因としてがん幹細胞の存在が注目されている。グリオーマは強い浸潤能がある。そのため、腫瘍細胞は脳の正常部位に深く染み渡り、外科手術では全摘出できない。さらに化学療法(テモゾロミド)と放射線治療の集学的治療を行っても、治療抵抗性をもつがん幹細胞が増殖をくりかえす。再発の根源であるがん幹細胞をターゲットとした治療法は有効であると考えられる。しかし、血液脳関門があるため、脳に適用できる薬剤は限られている。

私たちはグリオーマの患者からがん幹細胞を樹立し、幹細胞が間葉系に転換する分子メカニズムを明らかにした(Cancer Cell 29(2): 201-13, 2016)。そして、抗てんかん薬のペランパネルにより細胞増殖が抑制されるグリオーマ幹細胞株を見いだした。ペランパネルはAMPA受容体の非競合的拮抗薬であることから、mRNA発現パターンを調べたところ、AMPA2(GRIA2)分子がダウンレギュレーションしていた。

## 2. 研究の目的

AMPA受容体はGRIA1-4のサブユニットからなる四量体で構成される。GRIA2サブユニットの無いAMPA受容体はCaイオン透過性をしめず。そして、細胞内Caイオンシグナル伝達系が活性化し、細胞が増殖する。本研究は、グリオーマ幹細胞の増殖に関わる分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのためにGRIAの分子発現に焦点を当て、RNA発現量および転写因子を調べた。

## 3. 研究の方法

(1) グリオーマ由来のがん幹細胞は三次元スフェア培養法を用いて樹立した(Neuro Oncol 22(3): 333-44, 2020)。手術で切除されたがん組織(0.1-1g)をはさみにより細かく刻んだ。細切された組織を細胞剥離液(Accumax(TM); ナカライテスク)2mLをいれた試験管に移し、37度の恒温槽で5分間振盪(20回/分)した。細胞培養液8mLを加え混和し、遠心(40×g, 5分)した。上清を捨て、細胞培養液10mLを加え混和し、超低接着表面ディッシュ(100mm; Corning)で培養した。培養は、5% CO<sub>2</sub>/95%空気、37度の湿潤な環境で行った。細胞培養液は、D-MEM/Ham's F-12(和光純薬)に、NaHCO<sub>3</sub>(49mM)、グルコース(26mM)、L-グルタミン(3mM)、MACS NeuroBrew-21(5mL; Miltenyi Biotec)、上皮成長因子(EGF, 20ng/mL; PeproTech)、線維芽細胞増殖因子(bFGF, 20ng/mL; PeproTech)、およびペニシリン(100U/mL)とストレプトマイシン(0.1mg/mL)を添加したものを使用した。

(2) がん幹細胞を試験管に移し、遠心(40×g, 5分)した。上清を捨て、トリプシン-EDTA溶液(Sigma-Aldrich)2mLを加え、37度の恒温槽で5分間インキュベートした。細胞培養液を加え混和し、遠心した。上清を捨て、細胞培養液を加えた。細胞数を計測し、2000個の細胞を96ウェル超低接着表面プレート(Corning)に移した。各被験薬を加えた細胞培養液0.1mLで4日間培養した。生細胞数測定試薬SF(ナカライテスク)を用いて、生細胞数を計測した。

(3) RNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いて、がん幹細胞からRNAを抽出した。バイオアナライザ電気泳動システム(Agilent 2100; Agilent)を用いて、RNAの品質を確認した。strand-specificライブラリー調製法(NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module; New England Biolabs)でシーケンスライブラリーを作製した。次世代シーケンサー(NovaSeq 6000; Illumina)を用いて、ライブラリー調製したサンプルの塩基配列を1検体あたり12GBで取得した。ソフトウェアFastQCを用いて、クオリティスコアを確認し、シーケンスの品質に問題がなかった。ソフトウェアTrimmomaticを用いて、シーケンスリードをトリミングした。ソフトウェアHISAT2を用いて、トリミング後のシーケンスリードをリファレンスゲノム(hg38)へマッピングした。リードのマッピング率は86-98%であった。ソフトウェアfeatureCountsを用いて、マッピングされたrawリード数をカウントした。ソフトウェアfeatureCountsを用いて、マッピングされたフラグメントのカウントを行い、TPM値を算出した。ソフトウェアDESeq2を用いて、リードカウントの値をもとにRLE正規化し、サンプル間の発現量差を算出し、発現変動遺伝子(DEG)を抽出した。プログラムDAVIDを用いて、GeneOntology(GO)解析を行なった。IPA解析ソフトウェア(Qiagen)を用いて、遺伝子間ネットワークおよび、当該ネットワークが関与する生体内での機能を可視化した。ソフトウェアbcftoolsを用いて、マッピングされたリードにおいて、リファレンスゲノムと異なる塩基を変異として抽出した。

## 4. 研究成果

(1) 抗てんかん薬のペランパネル(100μM, Per)を細胞培養液に添加すると、がん幹細胞の増殖が抑制された(図1)。この抑制効果は8株中4株のがん幹細胞において認められた。

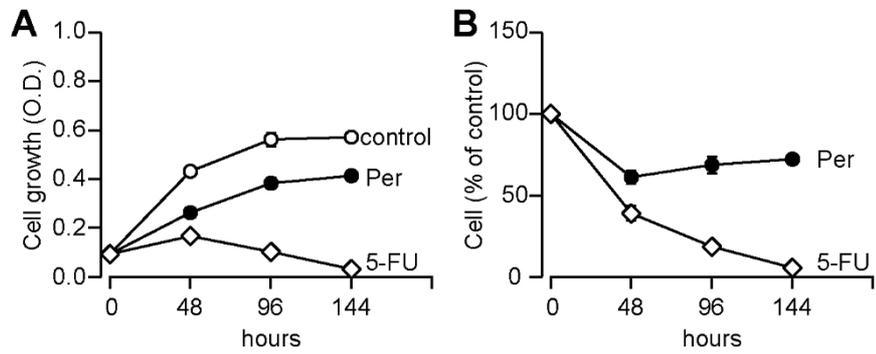


図1 ペランパネルによる細胞増殖の抑制

(2) ペランパネルに感受性を示した 4 株のがん幹細胞から、RNA を抽出し RNA シーケンス解析を行った。AMPA 受容体をコードする GRIA 分子の発現量は、GRIA1 (54 TPM) > GRIA3 (19 TPM) > GRIA2 (8 TPM) = GRIA4 (4 TPM)の順位であった。また、4 患者に共通して、GRIA3 において、アミノ酸置換の変異 (R775G) を発見した。

(3) ペランパネル投与から 4 日後において抵抗性を示した細胞および親細胞 (3 株) から RNA を抽出し、RNA シーケンス解析を行った。発現変動遺伝子 (DEG) を抽出し、GO 解析を行なった(図 2)。IPA 解析ソフトウェアを用いた上流解析により、転写因子である MEF2A および GATA4 を見出した。

以上の研究成果は、AMPA3 受容体が Ca イオン透過性に関わること、および MEF2A や GATA4 がグリオーマ治療の分子標的に成り得る可能性を示唆する。

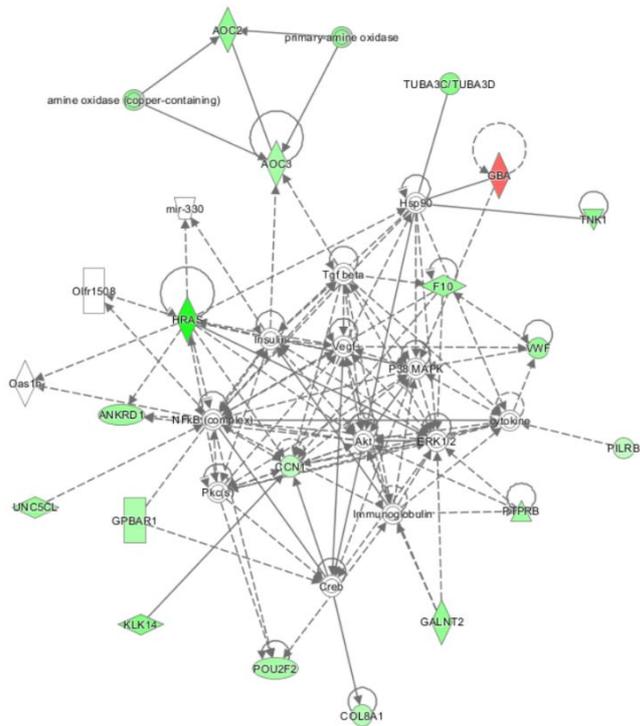


図2 ペランパネル処置により変動した遺伝子

< 引用文献 >

Kim SH, Ezhilarasan R, Phillips E, et al. Serine/Threonine Kinase MLK4 Determines Mesenchymal Identity in Glioma Stem Cells in an NF-kappaB-dependent Manner. *Cancer Cell*. 2016; 29(2):201-213.

Iwata R, Lee JH, Hayashi M, et al. ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2020; 22(3):333-344.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 岩田 亮一, 須山 武裕, 吉村 晋一, 山村 奈津美, 磯崎 春菜, 李 一, 宮田 真友子, 内藤 信晶, 亀井 孝昌, 小森 裕美子, 島田 志行, 羽柴 哲夫, 桒中 正博, 浅井 昭雄	4. 巻 41
2. 論文標題 破裂脳動脈瘤に対するコイル塞栓術後の血腫増大例の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 CI研究	6. 最初と最後の頁 87~93
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 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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山村奈津美, 岩田亮一, 須山武裕, 川野晴香, 上野勝也, 内藤信晶, 李強, 小森裕美子, 磯崎春菜, 亀井孝昌, 羽柴哲夫, 吉村晋一, 桒中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 破裂脳底動脈血豆状動脈瘤に対するステントアシスト下コイル塞栓術の1例
3. 学会等名 第35回日本脳神経血管内治療学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山村奈津美, 岩田亮一, 須山武裕, 川野晴香, 上野勝也, 内藤信晶, 李強, 小森裕美子, 磯崎春菜, 亀井孝昌, 羽柴哲夫, 吉村晋一, 桒中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 破裂脳底動脈血豆状動脈瘤に対するステントアシスト下コイル塞栓術の1例
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩瀬正顕, 川上勝弘, 山村奈津美, 浅井昭雄
2. 発表標題 内視鏡FED導入に伴う手術環境整備
3. 学会等名 第35回日本脊髄外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩瀬正顕, 須山武裕, 島田志行, 山村奈津美, 浅井昭雄
2. 発表標題 前頭蓋底骨折に合併した髄液漏の再発に外科的修復を要した1例
3. 学会等名 第44回日本脳神経外傷学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田志行, 須山武裕, 岩瀬正顕, 山村奈津美, 浅井昭雄
2. 発表標題 静脈洞直接穿刺によるアプローチにて治療し得た上矢状洞硬膜動静脈瘻の1例
3. 学会等名 第50回日本脳卒中の外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村晋一, 福田晃大, 上野勝也, 内藤信晶, 宮田真友子, 山村奈津美, 李一, 武田純一, 羽柴哲夫, 須山武裕, 桒中正博, 浅井昭雄
2. 発表標題 クリップとコイルの併用で親動脈閉塞を施行した大型部分血栓化動脈瘤の1例
3. 学会等名 第50回日本脳卒中の外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩瀬正顕, 浅井昭雄, 須山武裕, 島田志行, 山村奈津美
2. 発表標題 脑海綿状血管腫に伴う気分障害に抗てんかん薬が著効した1例
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------