

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790245

研究課題名 (和文) Glioma stem cell の "stemness" 維持に関わる遺伝子の探索

研究課題名 (英文) Search for genes involved in the maintenance of glioma stem cells

研究代表者

砂山 潤 (SUNAYAMA JUN)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80466606

研究成果の概要 (和文)：

本研究課題では、悪性神経膠腫におけるがん幹細胞の性質を理解するための一つのアプローチとして、神経幹細胞における幹細胞維持に関わる分子メカニズムの解明を試みた。特に悪性神経膠腫においてしばしば過剰活性化が認められる PI3K、mTOR の神経幹細胞維持における役割について検討を行ったところ、これらが新規機序により神経幹細胞維持に関与していることが明らかになった。すなわち、PI3K、mTOR の単独抑制が神経幹細胞の幹細胞としての性質 (幹細胞形質) に影響を与えなかったのに対し、両者の同時抑制は幹細胞形質を失わせ分化を誘導した。また、従来 mTOR の活性は PI3K に依存すると考えられてきたが、少なくとも神経幹細胞においては mTOR の基質の一つ 4E-BP1 が幹細胞形質と同様に PI3K と mTOR の mutually independent かつ redundant な制御を受けていることを見いだした。以上の結果は神経幹細胞の維持が、従来から知られる PI3K・mTOR の "linear pathway" ではなく、"parallel pathway" によって制御されている可能性を示すものである。神経幹細胞と脳腫瘍幹細胞の類似性に鑑み、本研究成果は PI3K/mTOR dual inhibitor による悪性神経膠腫治療の理論的根拠を与えるものである。

研究成果の概要 (英文)：

Control of stem cell state and differentiation of neural stem/progenitor cells is essential for proper development of the nervous system. EGF and FGF2 play important roles in the control of neural stem/progenitor cells, but the underlying mechanism still remains unclear. Here we show, using in vitro primary cultures of mouse neural stem/progenitor cells, that both PI3K and mTOR are activated by EGF/FGF2 but that inhibiting the activation of either PI3K or mTOR alone results in only reduced proliferation of neural stem/progenitor cells without affecting their stem cell state, namely, the capacity to self-renew. However, significantly, concurrent inhibition of PI3K and mTOR promoted exit from the stem cell state together with astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. These findings suggest that PI3K and mTOR are involved in the EGF/FGF2-mediated maintenance of neural stem/progenitor cells and that they may act in parallel and independent pathways, complementing and backing up each other to maintain the stem cell state. These findings are also expected to help understand the molecular mechanism by which glioma stem/initiating cells are maintained, given the similarity between neural stem cells and glioma stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：glioma, stemness

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍を構成するがん細胞には大きく分けて2種類存在することが明らかになってきた。すなわち無限の自己複製能と真の造腫瘍能を有するがん幹（創始）細胞 (cancer stem/initiating cell、以降「がん幹細胞」と呼ぶ)と、自己複製能が限られておりそれゆえ腫瘍形成能をもたない非幹（創始）がん細胞 (non-stem cancer cell、以降「非幹がん細胞」と呼ぶ)である。がん幹細胞は分裂により自分自身ないし非幹がん細胞を生み出すことができる一方、非幹がん細胞の細胞分裂により生ずるのは非幹がん細胞のみで基本的にがん幹細胞に戻ることはないなど、両者の間にはヒエラルキーが存在する。少なくとも一部のがん種では、腫瘍はその大部分を構成する非幹がん細胞とごく一部のがん幹細胞からなっていることが明らかになりつつある。重要なことにがん幹細胞は非幹がん細胞と比べて著しい放射線・化学療法耐性を有している。従って、治療によって非幹がん細胞が死滅し腫瘍の大部分が消失した後もがん幹細胞がごくわずかながら残存し再発や転移の原因となるなど、がん幹細胞が「がんの治癒」を実現するうえで大きな障壁となっている可能性がある。悪性神経膠腫についてもこれまでの知見からその腫瘍形成にがん幹細胞の関与が指摘されており、従って難治を極める悪性神経膠腫の治療抵抗性克服を克服し、治癒を目指すためには悪性神経膠腫がん幹細胞を幹細胞たらしめている遺伝子・分子を明らかにすることが必要不可欠な最優先課題である。これら遺伝子・分子が同定されれば、それらを標的とした治療法を開発し幹細胞を非幹細胞へと変質させ、悪性神経膠腫を「治癒可能な腫瘍」とすることも可能となる。ところで、悪性神経膠腫のがん幹細胞につ

いて研究を行うためには十分量の悪性神経膠腫がん幹細胞を確保することが絶対的に必要であるが、現時点での幹細胞培養技術では悪性神経膠腫がん幹細胞を純化した状態で長期にわたり継代、増幅することは容易ではない。

2. 研究の目的

そこで今回我々は悪性神経膠腫を含む脳腫瘍のがん幹細胞がその対応する組織幹細胞である「神経幹細胞」と多くの面で共通の性質を有していること、また神経幹細胞であれば実験に必要な細胞数を常時十分量確保できる点に着目した。すなわち本研究ではまず神経幹細胞を対象として幹細胞形質維持に必要な遺伝子・分子の同定を行い、そこから得られた情報をもとに限られた悪性神経膠腫幹細胞を用いて効率よく目的の研究を進めるといった戦略を選択した。

3. 研究の方法

神経幹細胞としては、マウス胎児脳 (E14.5) より分離培養した神経幹細胞を用いた。神経幹細胞の維持培養には、DMEM/F12 培地をベースとした無血清培地を用い、Epidermal Growth Factor (EGF, 20 ng/ml)、Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2, 20 ng/ml)、N2 supplement を添加した。PI3K 阻害薬としては LY294002、mTOR 阻害薬としては rapamycin を用いた。PI3K、mTOR の活性化状態は phosphorylated Akt(Ser473)および phosphorylated p70 S6 kinase(Thr389) (ないし phosphorylated 4E-BP1(Thr37/46)) の発現レベルを western blot 法でそれぞれ検討し、評価した。神経幹細胞の自己複製能は sphere

formation assay にて、未分化 / 分化状態の評価は未分化 / 分化マーカーである Sox2、GFAP、betaIII-tubulin の発現を western blot 法にて検討し、評価した。

4 . 研究成果

本研究課題で得られた主な知見は、神経幹細胞の幹細胞としての性質 (= 未分化性) の維持における PI3K、mTOR の役割とその相互作用の発見である。以下、研究成果につき具体的に述べる。

神経幹細胞は EGF/FGF2 の存在下で幹細胞培養を行うと Sox2 に代表される未分化マーカーを発現する未分化状態のまま自己複製 (= 幹細胞状態を維持) することができる。このことは EGF/FGF2 により活性化される細胞内シグナル伝達経路が幹細胞形質の維持に重要であることを意味している。EGF/FGF2 により活性化される細胞内シグナル伝達経路としては種々考えられるが、今回我々は特に PI3K-mTOR 経路に関心をもって検討を行った。その理由は悪性神経膠腫、特に膠芽腫において EGFR 遺伝子、PTEN 遺伝子の異常等により PI3K-mTOR 経路が過剰に活性化されていることが知られているためである。

PI3K-mTOR 経路活性化が EGF/FGF2 による神経幹細胞形質維持に関与しているかを調べるため、まず EGF/FGF2 処理により神経幹細胞内で PI3K、mTOR が活性化されるか否かにつき検討を行った。その結果、EGF/FGF2 により Akt、p70 S6 kinase のリン酸化が誘導され、かつこれらのリン酸化はそれぞれ PI3K の阻害薬 LY294002、mTOR 阻害薬 rapamycin により抑制されることが確認された。この結果は神経幹細胞において EGF/FGF2 が確かに PI3K、mTOR を活性化していることを示している。次いで我々は、この EGF/FGF2 による PI3K、mTOR の活性化が EGF/FGF2 による神経幹細胞形質の維持に必要であるか検討した。神経幹細胞の特徴的かつ重要な性質に culture dish に接着せず、浮遊球状細胞塊として増殖する能力 (sphere formation 能) があり、この sphere formation 能を調べることにより自己複製能を評価することが可能である (sphere formation assay)。そこで LY294002 による PI3K 抑制条件下および rapamycin による mTOR 抑制条件下でこの sphere formation assay を行ったところ、予想に反してこれらの薬剤は神経幹細胞の sphere formation を抑制しなかった。また、神経幹細胞マーカー (未分化マーカー) である Sox2、神経細胞およびアストロサイトの分化マーカーである betaIII-tubulin や GFAP の発現についても検討を行ったが、やはり LY294002、rapamycin が

神経幹細胞の未分化性を抑制し分化を誘導しているという所見は得られなかった。実験に用いた濃度においてそれぞれの阻害薬は PI3K、mTOR の活性を有効に抑制していたことから、これらの結果は少なくとも PI3K、mTOR のそれぞれを単独で抑制しても神経幹細胞の幹細胞としての性質が維持されることを示している。そこで次に PI3K と mTOR を同時に抑制した場合、神経幹細胞にどのような影響があるか検討を試みてみた。その結果、LY294002、rapamycin 単独では全く抑制されなかった sphere formation 能が両者の共存下で抑制される傾向が認められた。ここでもしこの両薬剤共存下での sphere formation 能抑制が単に神経幹細胞の生存や分裂の抑制によるものではなく幹細胞形質の喪失によるものであれば、sphere formation 能も非可逆的に喪失しているはずであり、両薬剤により一旦失われた sphere formation 能はその後両薬剤の非存在下で sphere formation assay (= secondary sphere formation assay) を行ったとしてももはや回復しないはずである。そこで LY294002、rapamycin 存在下で sphere formation assay を行った細胞を、薬剤の wash out 後再度 (secondary) sphere formation assay に供してみたところ、両薬剤存在下で行った最初の sphere formation assay (= primary sphere formation assay) の時よりも、さらに明瞭な sphere formation 能の低下が認められた。この結果は一過的な PI3K、mTOR の同時抑制により神経幹細胞が幹細胞形質を失い非可逆的に分化細胞へと運命づけられた可能性を示唆するものである。そこで次に細胞の分化状態を神経幹細胞マーカー (未分化マーカー) Sox2 ならびに分化マーカー betaIII-tubulin、GFAP の発現を指標に検討を行った。その結果、LY294002 と rapamycin の同時処理を受けた細胞においてのみ Sox2 の発現低下と GFAP の発現上昇が認められた。これらの結果は PI3K、mTOR の少なくともいずれかの活性が保たれていることが神経幹細胞の幹細胞形質の維持に必須であり、両者の活性が失われると幹細胞としての性質が失われ分化細胞へと運命づけられることを示している。

ところで、従来 mTOR は単純に PI3K の制御下にあると考えられてきたが、このような考えでは今回の結果は説明できない。つまり、PI3K を抑制すれば mTOR も抑制されるため、mTOR 抑制による相乗的な効果は見られないはずである。実際、p70 S6 kinase のリン酸化状態については LY294002 のみで十分リン酸化が抑制され、rapamycin の上乗せ効果は認められない。しかしながら mTOR のもう一つの基質として知られる 4E-BP1 のリン酸化状態を観察すると、PI3K、mTOR いずれかの抑制ではそのリン酸化は十分に抑制されず、両者の抑制によって初めて顕著なリン酸化抑

制が観察された。この結果は PI3K、mTOR の制御下にある分子の中には、従来から言われている PI3K→mTOR→基質という単純な直線的経路により制御されるものの他に、PI3K と mTOR による mutually independent かつ redundant な制御を受けるものが存在することを示している。従って今回得られた知見からは、神経幹細胞の維持機構にもこのような制御を受ける分子が関与しているものと推察される。また、神経幹細胞と脳腫瘍幹細胞の類似性に鑑みて、悪性神経膠腫がん幹細胞においても同様に PI3K と mTOR による mutually independent かつ redundant な制御を受ける分子が幹細胞維持に関与している可能性が考えられ、PI3K/mTOR の dual inhibition によるがん幹細胞を標的とする治療戦略に理論的根拠を与えるものと期待される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

- 1) Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Tachibana K, Sakurada K, Tomiyama A, Kayama T, Kitanaka C. Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR. *Neurosci Lett* 470:115-120, 2010. 査読有
- 2) Mouri W, Tachibana K, Tomiyama A, Sunayama J, Sato A, Sakurada K, Kayama T, Kitanaka C. Downregulation of Ras C-terminal processing by JNK inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 371:273-277, 2008. 査読有

[学会発表](計6件)

- 1) Sunayama J, Sato A, Matsuda K, Tachibana K, Tomiyama A, Sakurada K, Kayama T, Kitanaka C: Effect of rapamycin (mTOR inhibitor) and LY294002 (PI3K inhibitor) on glioblastoma stem-like cells.第68回日本癌学会総会. 2009年10月3日, 横浜.
- 2) Tomiyama A, Sunayama J, Tachibana K, Matsuda K, Ando K, Kayama T, Kitanaka C: Mechanism of heavy ion radiation-induced glioma cell death. 第68回日本癌学会総会. 2009年10月3日, 横浜.
- 3) 佐藤篤, 砂山潤, 松田憲一朗, 立花研, 富山新太, 櫻田香, 北中千史, 嘉山孝正: ヒ

トグリオーマ細胞株 A172 における腫瘍幹細胞の単離・同定の試み. 第26回日本脳腫瘍学会. 2008年11月30日, 松山.

- 4) Sato A, Sunayama J, Sakurada K, Matsuda K, Tachibana K, Tomiyama A, Kitanaka C, Kayama T: Isolation and characterization of cancer stem-like cells from a human glioblastoma cell line A172. 第67回日本癌学会総会. 2008年10月28-30日, 名古屋.
- 5) Mouri W, Tachibana K, Tomiyama A, Sunayama J, Sato A, Sakurada K, Kayama T, Kitanaka C: Downregulation of Ras C-terminal Processing by JNK Inhibition. 第67回日本癌学会総会. 2008年10月28-30日, 名古屋.
- 6) 佐藤篤, 砂山潤, 松田憲一郎, 立花研, 櫻田香, 北中千史, 嘉山孝正: 神経幹細胞における c-Jun N-terminal kinase (JNK) の役割. 第67回日本脳神経外科学会. 2008年10月, 1-3日盛岡.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

砂山 潤 (SUNAYAMA JUN)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80466606