

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K17980
研究課題名（和文）膠芽腫に対するアミノ酸代謝酵素を標的とした分化誘導療法の前臨床研究

研究課題名（英文）Basic research of differentiation therapy for glioblastoma

研究代表者
山室 俊（YAMAMURO, Shun）
日本大学・医学部・助教

研究者番号：30790886
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）：膠芽腫に対する新規治療法として、神経膠芽腫幹細胞を標的とした分化誘導療法の開発およびその効果の検討を行うべく、本研究を行なった。我々は、先行研究やこれまでの報告から、ID01を阻害することにより、神経膠腫幹細胞を含む膠芽腫細胞の分化が促進されると考えた。ID01阻害剤のindoximodを神経膠腫幹細胞の細胞株に投与したところ、形態学的変化として神経膠腫幹細胞株のsphereが小さくなり、一部接着細胞化した。また、神経膠腫幹細胞のマーカー分子のタンパク発現が減少した。動物実験では、indoximodで治療したマウス群は、無治療群よりも生存期間が延長した。

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。膠芽腫の悪性度に神経膠腫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、ID01を阻害することで、in vitroで神経膠腫幹細胞の分化が誘導されることが分かった。膠芽腫の分化が誘導されれば、それ自体の抗腫瘍効果のみならず、放射線治療や他の化学療法との相乗効果も期待されるため、本研究の成果は膠芽腫の新規治療法を考えるうえで重要な知見になると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was carried out to develop a new therapy for glioblastoma, targeting glioma stem like cells, and to investigate efficacy of the therapy. Based on previous studies and reports, we hypothesized that inhibition of ID01 promotes the differentiation of glioblastoma cells, including glioma stem like cells. The glioma stem like cells demonstrated morphological change after the administration of ID01 inhibitor. In addition, protein expression of glioma stem like cells marker were decreased. Furthermore, the mice treated by ID01 inhibitor survived longer than untreated mice.

研究分野：脳神経外科学

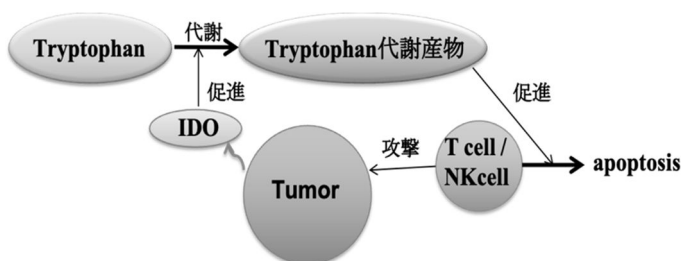
キーワード：膠芽腫 神経膠腫幹細胞 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系悪性腫瘍である神経膠腫 (glioma) は 2009 年度版脳腫瘍全国集計調査報告によると全脳腫瘍の 23.8% を占めている。また、その中でも最も高悪性度 (WHO grade IV) である膠芽腫 (glioblastoma; GBM) は全脳腫瘍の 9.1% を占め、glioma の中で最も頻度が高い。GBM に対しては、手術による摘出と、術後補助療法として放射線治療および化学療法を組み合わせた集学的治療が行われるが、生存期間中央値は 20 ヶ月前後に満たない。近年では分子標的薬を含む様々な新規治療法が研究・開発されているものの、その予後を有意に改善させるには至っていない。そのため、GBM に対する有効な新規治療法を確立することは急務な課題である。

近年の研究により、がん幹細胞のひとつである神経膠腫幹細胞 (glioma stem cells: GSCs) が GBM の悪性度に強く関与していることが明らかになった。GSCs は周辺の微小環境に応じて、GBM 細胞を含む glioma 細胞に分化することが知られている。さらに、分化した glioma 細胞は再び GSCs に脱分化し得る (GSCs と glioma 細胞は相互に変換し得る) ことも報告されている (Natsume A, et al. *Cancer Res* 73: 4559-4570, 2013)(Yamamuro S, et al. *Int J Oncol* 47: 1647-1654, 2015)。従って、GBM の新規治療法を考えるうえでは、glioma 細胞のみならず、この GSCs を標的とすることが重要である。

一方、近年では GBM 治療においても、他がん腫と同様に種々の免疫療法が新規治療法として盛んに研究されている。GBM には自己免疫を抑制する様々な機構が備わっていることが明らかになり、トリプトファンの代謝酵素である indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) もそのひとつとして注目されている (Hanihara M, et al. *J Neurosurg* 124: 1594-1601, 2016)。この IDO1 は、GBM のなかでも特に予後の悪い症例においてより強く発現していることが示されている (Mitsuka K, et al. *Neurosurgery* 72: 1031-1038, 2013)。また、IDO1 は悪性度が低い (WHO grade I または II の) glioma に比べ、GBM および WHO grade III の glioma においてより多く発現していることを示した報告もある (Kesarwani P, et al. *Clin Cancer Res* 24 :3632-3643, 2018)。このように、IDO1 の発現は GBM の悪性度とも関連があると考えられている。



がん細胞における IDO の免疫抑制作用

トリプトファンの代謝産物は、自己免疫細胞である T 細胞や NK 細胞のアポトーシスを誘導する。IDO1 はこのトリプトファンの代謝経路に作用し、代謝を促進する (トリプトファン代謝産物の産生を促進する)。がん細胞は IDO1 を高発現させることで、T 細胞や NK 細胞のアポトーシスを促進し、自身の生存にとって有利な環境を作りだすと考えられている。

このように、GBM に対する免疫療法の分野で研究が進んでいる IDO1 であるが、GSCs との関係に着目した研究はなされていない。そこで、GBM の治療抵抗性に強く関与している GSCs が IDO1 を介した免疫抑制機構を有しているのではないかと考え、本研究を計画した。また、我々はこれまで interferon-beta (IFN- β) に注目し、GBM に対する抗腫瘍効果について報告してきた (Yoshino A, et al. *Int J Oncol.* 35: 139-148, 2009)(Yoshino A, et al. *Int J Oncol.* 39: 529-542, 2011)。しかし、IFN- β が GBM 細胞に対する抗腫瘍効果を示すメカニズムに関してはいまだ十分に解明されているとは言えない。IFN- β の性質 (アポトーシスの誘導等) を考慮すると、GBM の免疫制御機構に作用することで抗腫瘍効果を示す可能性が考えられる。

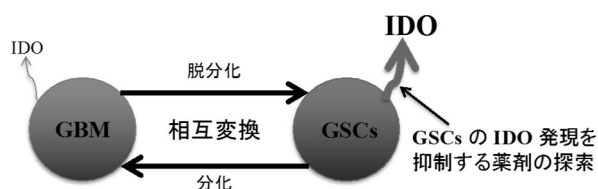
さらに、近年、IDO1 を knock-out したマウスでは IFN- β の発現が上昇していることを示した報告がなされた (Hoshi M, et al. *J Immunol* 185: 3305-3312, 2010)。IFN- β は細胞の分化を促し、抗腫瘍効果を示すことは今までに複数報告されているため (Yuki K, et al. *Cancer Lett* 284: 71-79, 2009) GBM 治療において IDO1 を阻害して IFN- β の発現を上昇させることで、GSCs を中心とした未分化な GBM 細胞の分化を促進する可能性がある。GSCs を含む未分化な腫瘍細胞の分化が促進されれば、化学療法や放射線治療に対する感受性が高まり、GBM が有する治療抵抗性の克服につながるため、分化誘導療法として期待ができる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト GBM 細胞株を用いた基礎的実験を通して、以下の内容を明らかにすることを目的に行われた。

- (1) 「未分化な」GSCs と「分化した」GBM は、周辺環境の変化に伴って相互に変換し得ることを分化マーカーの定量的な比較により明確に証明する (GSCs と GBM 細胞における相互変換の証明)。
- (2) GSCs と GBM 細胞における免疫抑制機構に関与する分子の発現を比較することで、分化度の違いに伴う免疫抑制能の差異を検討する。具体的に、GSCs では GBM 細胞に比べ IDO1 の発現が上

昇していることを示す。



未分化な GSCs と分化した GBM 細胞の相互に変換

GBM が IDO1 を発現することで免疫を抑制していることは既に知られている。本研究では、GSCs における IDO1 の発現を解析した。さらに、既存の医薬品の中に GSCs における IDO1 の発現を抑制することで免疫抑制を阻害し得るものがないかを探索した。

(3) 既存薬剤の中で、GSCs の免疫抑制能を阻害する効果を示す薬剤を探索し、GBM に対する新たな治療戦略を明らかにする (GSCs の免疫抑制機構を標的とした、既存の医薬品の悪性神経膠腫に対する新たな抗腫瘍効果の解明: drug repositioning)。

(4) IDO1 は GBM の分化誘導療法を考えるうえでも重要な標的分子であると考えられるため、GBM 治療において IDO1 が分化誘導療法の標的となり得るかを明らかにする。血液癌治療の分野においては広く行われている分化誘導療法であるが、GBM 治療の分野では、いくつかの研究結果が報告されているものの、いまだに臨床応用に発展し得る有効な報告はなされていない。IDO1 阻害剤を使用することで、IDO1 が介する path way から分化誘導療法にアプローチする。

3. 研究の方法

実験には市販のヒト GBM 細胞株である U-87MG、U-251MG および GBM 患者から手術により摘出した検体から樹立した患者由来 GSCs 細胞株である 0125-GSC を使用した。さらに、U-87MG 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-87MG および Rev-U-251MG とし、GSCs モデル細胞株として実験に使用した。また、0125-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 とし、GSCs から分化した GBM 細胞のモデル細胞株とした。IDO1 阻害剤としては、indoximod を用いた。

はじめに、培養条件や薬剤投与による細胞形態の変化を、顕微鏡で観察した。次に、各細胞株における IDO1 および GSCs 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、各細胞株における IDO1 および GSCs マーカーの mRNA 発現を RT-PCR により解析した。さらに、indoximod や temozolomide、IFN- γ などの薬剤を投与したのち、IDO1 および GSCs マーカーの発現を解析した。

In vitro の実験結果を踏まえ、in vivo の実験を行った。In vivo の研究として、GSCs 細胞株を免疫不全マウスの脳内に定位的に移植し、移植後のマウスに対して indoximod を経腹膜的に全身投与し、生存を非投与群ならびに (現在の GBM に対する標準化学療法剤である) temozolomide 投与群と比較した。

4. 研究成果

はじめに、U-87MG および U-251MG を一定期間無血清培地で培養することで、GSCs モデル細胞株 Rev-U-87MG および Rev-U-251MG を樹立した。U-87MG 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。反対に、GSCs の細胞株である 0125-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 GBM 細胞株と同様の形態に変化した。

次に、樹立した GSCs モデル細胞株である Rev-U-87MG、Rev-U-251MG、および患者由来 GSCs 細胞株 0125-GSC が GSCs 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 の蛋白ならびに mRNA の発現を解析した。Rev-U-87MG、Rev-U-251MG、0125-GSC におけるこれらの発現は、いずれも U-87MG、U-251MG、0125-DGC と比較して多く認められた。

続いて、GSCs と分化した通常の GBM 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 の蛋白ならびに mRNA の発現を解析した。IDO1 の発現は、Rev-U-87MG、Rev-U-251MG、0125-GSC、において、U-87MG、U-251MG、0125-DGC、よりも多く発現していた。これらの結果から、グリオーマ幹細胞 GSCs は IDO1 を通常の GBM 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。

さらに、IDO1 阻害剤の indoximod を Rev-U-87MG、Rev-U-251MG、0125-GSC に投与したところ、形態学的変化として GSCs の sphere が小さくなり、一部接着細胞化した。また、GSCs のマーカー分子である Nanog、Nestin、Sox2 のタンパク発現が減少した。

これらの実験結果を受けて、動物実験を行なった。はじめに、免疫不全マウスの脳内に U-87MG の細胞を移植する実験系を確立し、腫瘍が脳内に生着して無治療であれば一定期間で腫瘍死することを確認した。その上で、移植後マウスを indoximod 投与により治療した群、temozolomide 投与により治療した群、無治療のコントロール群に分けて、生存期間を比較することで、薬剤の抗腫瘍効果を検討した。結果として、indoximod で治療したマウス群は、無治療群のマウスより

も有意に生存期間が延長した。しかし、 indoximod 投与群と膠芽腫の標準治療薬である temozolomide 投与群とで生存期間を比較したところ、両者に有意差は認められなかった。

続いて、GSCs 細胞株である 0125-GSC の細胞を免疫不全マウスの脳内に移植する実験系を確立し、腫瘍が脳内に生着して無治療であれば一定期間で腫瘍死することを確認した。その上で、移植後マウスを indoximod 投与により治療した群、temozolomide 投与により治療した群、indoximod と temozolomide の併用投与により治療した群、無治療のコントロール群に分けて、生存期間を比較する実験を開始し、現在も継続している。今後、GSCs の細胞を移植した免疫不全マウスにおける薬剤の効果を検討していくとともに、治療後に移植後免疫不全マウスから摘出した腫瘍検体における分化あるいは未分化の指標となる蛋白の発現を解析し、抗腫瘍効果や併用療法の有用性についても検討を行っていく。

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 1件）

1. 著者名 Shun Yamamuro, Masamichi Takahashi, Kaishi Satomi, Nobuyoshi Sasaki, Tatsuya Kobayashi, Eita Uchida, Daisuke Kawauchi, Tomoyuki Nakano, Takashi Fujii, Yoshitaka Narita, Akihide Kondo, Kojiro Wada, Atsuo Yoshino, Koichi Ichimura, Arata Tomiyama.	4. 巻 112
2. 論文標題 Lomustine and nimustine exert efficient antitumor effects against glioblastoma models with acquired temozolomide resistance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4736-4747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15141.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山室 俊, 小澤 祥成, 谷澤 元気, 角 光一郎, 佐野 恵海子, 吉野 篤緒.
2. 発表標題 グリオーマ幹細胞におけるアミノ酸代謝酵素を標的とした新たな膠芽腫治療法の検討.
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤 祥成, 山室 俊, 西出 拓馬, 谷澤 元気, 花島 裕也, 角 光一郎 佐野 恵海子, 吉野 篤緒.
2. 発表標題 Glioma stem like cellsのアミノ酸代謝酵素を標的とした新規治療法の検討.
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷澤 元気, 山室 俊, 西出 拓馬, 小澤 祥成, 角 光一郎, 佐野 恵海子, 吉野 篤緒.
2. 発表標題 膠芽腫に対するtemozolomide, interferon- γ , ribavirin 3剤併用療法の効果の検討.
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	吉野 篤緒 (YOSHINO Atsuo)		
研究協力者	小澤 祥成 (OZAWA Yoshinari)		
研究協力者	谷澤 元気 (YAZAWA Genki)		
研究協力者	佐野 恵海子 (SANO emiko)		

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