

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：11501
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390402
 研究課題名（和文） 腫瘍幹細胞維持機構の解明を通じたグリオーマの治療抵抗性克服と根治に向けた取り組み
 研究課題名（英文） Overcoming therapy resistance of glioma via elucidation of the mechanisms underlying glioma stem cell maintenance
 研究代表者
 北中 千史 (KITANAKA CHIFUMI)
 山形大学・医学部・教授
 研究者番号：70260320

研究成果の概要（和文）：

本研究ではグリオブラストーマ幹細胞の維持に関わる細胞内シグナル・分子の探索を行った。その結果、PI3K/mTORならびにMAPKの関与が明らかになった。重要なことに、これら両経路は転写因子FOXO3のリン酸化を介する抑制によりグリオブラストーマ幹細胞を維持していることが明らかになった。これらの結果は、これらの分子がグリオブラストーマ幹細胞を標的とする治療におけるよい分子標的となる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we searched for intracellular signals as well as signaling molecules involved in the maintenance of glioblastoma stem cells and demonstrated critical roles for PI3K/mTOR and MAPK in glioblastoma stem cell maintenance. Significantly, PI3K/mTOR and MAPK acted on a common molecule, i.e., the FOXO3 transcription factor, whose activity was restrained through phosphorylation by these kinases in glioblastoma stem cells. Our results suggest that FOXO3 as well as these kinases could be rational molecular targets for stem cell-targeted glioblastoma therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

従来、腫瘍を構成する腫瘍細胞は等しく腫瘍を形成できるものと信じられてきたが、近年腫瘍細胞は腫瘍形成能をもったごく一部の「幹細胞」と腫瘍形成能を持たない大多数の「非幹細胞」からなるという腫瘍幹細胞仮説が注目されるようになった。グリ

オーマについては過去数年のうちに幹細胞の存在を支持する報告が相次いでなされ、その存在が確実視されるようになった。重要なことにグリオーマ幹細胞は、「非」幹細胞と比較して、顕著な放射線・化学療法耐性を有していることが示されている。このことは、放射線や化学療法により大多数の

「非」幹細胞が死滅して一見治療に反応したように見えても、治療抵抗性のグリオーマ幹細胞が残存する限り再度腫瘍を形成し、再発を免れないことを意味している。逆になんらかの方法でグリオーマ幹細胞を排除することができれば、残る大多数の「非」幹細胞の増殖能は有限であることから腫瘍制御が可能となり、理論的には根治も期待できる。したがって、グリオーマ幹細胞を幹細胞たらしめている分子機構（幹細胞性維持の分子機構）を明らかにし、そこに関わる分子を標的とした治療法を開発することは、グリオーマのもつ著しい治療耐性を克服し根治への道を切り開く上で、極めて重要な意義をもつものと考えられる(*Nat Rev Cancer* 6:425-436, 2006)。

しかしながら、現時点では「グリオーマ幹細胞がいかにしてその幹細胞性を保っているか」ということについてはほとんどわかっていない。これまでのところ *Nature* 誌に BMP4 処理によりグリオーマ幹細胞の幹細胞性/造腫瘍能が抑制されることが報告されているが、BMP4 が如何なる細胞内シグナル伝達により幹細胞性を抑制するかは示されていない(*Nature* 444:761-765, 2006)。また、SHH-GLI のシグナル伝達がグリオーマ幹細胞の幹細胞性の維持に関与しているとする報告もあるが、データから判断する限り少なくともグリオーマに関してはこのシグナル伝達経路の関与は限定的である(*Curr Biol* 17:165-172, 2007)。また、後述のごとく、我々自身もすでにグリオーマ幹細胞の幹細胞性維持に重要な役割を果たしていると考えられるシグナル伝達分子を同定しており、今後グリオーマ幹細胞をターゲットとする新規治療法を開発するうえで有力な情報を有している。しかしながらこれら断片的情報のみではグリオーマ幹細胞の幹細胞性維持機構の全体像の把握からは程遠く、また、これら限られた分子標的に対する薬剤が必ずしも実際に臨床上有用な治療薬になるという保証もない。そこで本研究ではできるだけ多くの分子標的を同定し、それらに作用する（分子標的）薬剤の中から臨床的に有用な治療薬を見つけ出すことを目標とする。

2. 研究の目的

本研究ではグリオーマ幹細胞の幹細胞性維持に必要とされる分子や遺伝子を種々の機能性分子に対する活性化薬・阻害薬あるいは siRNA 等のスクリーニングにより同定する。同定された分子・遺伝子の機能を修飾する薬剤を開発し、それらがグリオーマ幹細胞の制御を通じてグリオーマのもつ治療抵抗性克服に有用かを治療モデルの作成を通じて検証する。

3. 研究の方法

まずは種々の機能性分子に対する活性化薬・阻害薬ないし siRNA がグリオーマ幹細胞に対して及ぼす影響をスクリーニングする。スクリーニングの結果得られた候補分子・遺伝子について、真にグリオーマ幹細胞の「幹細胞性維持に関わる遺伝子」か否かを検討する。グリオーマ幹細胞の幹細胞性維持に必須であることが明らかとなった遺伝子についてはその遺伝子産物の機能を阻害する薬剤（分子標的薬剤）を用いて実際にグリオーマ幹細胞の造腫瘍能が抑制されるかを動物実験レベルで確認する。また、グリオーマ幹細胞のもつ治療耐性が、そのような分子標的薬剤によって克服可能かについても検討を行う。

4. 研究成果

種々の機能性分子に対する機能修飾薬剤を、sphere形成能を指標にスクリーニングする過程で、PI3K, mTORがグリオーマ幹細胞の制御に関与している可能性が明らかになった。そこで実際にグリオーマ幹細胞において幹細胞形質がPI3K, mTORの制御を受けているかについて検討を行った。幹細胞形質に関する検討の方法論としては、自己複製能をsphere形成アッセイにより、未分化/分化状態はそれぞれのマーカーの発現状態を検討することにより、評価した。グリオーマ幹細胞としてはグリオーマ培養細胞株から単離培養したもの、手術摘出したグリオブラストマ組織から直接単離培養したものの両者を用いた。検討の結果、PI3K, mTORの阻害薬(LY294002, rapamycin)は単独でもある程度幹細胞形質に対する抑制効果、分化誘導効果を示したものの、両者の併用でより効果的にこれらの変化が生じることが確認された。さらにPI3K, mTORの同時阻害がグリオーマ幹細胞の造腫瘍能に与える影響をPI3K, mTORのdual inhibitorであるNVP-BE2235を用いて検討したところ、NVP-BE2235は予想通りグリオーマ幹細胞に分化を誘導したが、この分化細胞を薬剤のwash out後にヌードマウス皮下ないし頭蓋内に移植したところ、皮下では腫瘍増大の抑制が、頭蓋内では腫瘍増大の抑制ならびに生存期間の延長が観察された。

これらの結果はPI3KとmTORの同時阻害によりグリオーマ幹細胞の幹細胞形質ならびに造腫瘍能を効果的に抑制できることを示しており、PI3K, mTORのdual inhibitorがグリオーマ幹細胞を標的とした治療戦略上有用である可能性を示唆するものである。ところがその一方、PI3K, mTORのdual inhibitorをもってしても造腫瘍能の抑制が部分的であることも判明した。つまりグリオーマ幹細胞の維持にはPI3K/mTOR以外の細胞内シグナル伝達に関与している可能性が示唆された。そこでやはり

スクリーニングの過程でグリオーマ幹細胞制御に関与する可能性が示され、かつPI3K/mTOR経路とならんでグリオーマで異常活性化が知られるMAPK経路 (MEK-ERK経路) に着目し、以降の検討を行った。

検討の結果、MEK阻害剤によりグリオーマ幹細胞の分化が誘導されること、MEK阻害剤により前処理されたグリオーマ幹細胞をヌードマウス脳内に移植するとコントロール細胞を移植した場合に比べてマウスの生存期間が延長することなどが明らかになった。これらの結果はMAPK経路もまたグリオーマ幹細胞の維持に関与している可能性を示唆するものである。さらなる詳細な検討の結果、PI3K経路とMAPK経路の両シグナル伝達経路はグリオーマ幹細胞内ではクロストークしており、相互抑制的に作用していることが判明した。このことは一方の経路の抑制のみでは他方がバックアップ機序により活性化されるため幹細胞抑制効果が減弱すること、両経路同時に阻害することで相乗的なグリオーマ幹細胞抑制効果が得られることを意味している。実際、両経路の同時阻害によりグリオーマ幹細胞の腫瘍形成能が顕著に抑制されることが確認された。

そこで次にこれら両経路がどのような分子機序によりグリオーマ幹細胞の制御に関与しているかにつき検討を行った。その結果、以下のようなデータから、核内転写因子FOXO3が両経路からのシグナル伝達の標的となっていることが明らかとなった。まずFOXO3をノックダウンすると両経路の阻害による分化誘導が見られなくなったことから、FOXO3が両経路阻害によるグリオーマ幹細胞の分化誘導に必須の役割を果たしていることが示された。さらに、FOXO3はPI3K経路のAkt、MAPK経路のERKによりリン酸化を受けるアミノ酸配列を有しているが、これらの2つのリン酸化部位のいずれかがリン酸化させた状態ではFOXO3は細胞質に係留され核内に移行できないことも明らかになった。逆に両部位のリン酸化が失われた状態ではFOXO3は核内に移行して活性化状態となり、グリオーマ幹細胞の分化を誘導するとともにその腫瘍形成能を失わせることが示された。以上の所見よりグリオーマ幹細胞はFOXO3を不活性状態に維持することで幹細胞状態を保っていると考えられるようになった。このことはまたFOXO3を活性化できる薬剤がグリオーマ幹細胞治療薬として有用である可能性を示唆するものであり、グリオーマ幹細胞標的治療開発における貴重な知見を与えることとなった。

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10件)

- 1) Matsuda K, Sato A, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Targeting JNK for therapeutic depletion of stem-like glioblastoma cells. *Sci Rep* 2012;2:516 (査読有)
- 2) Sato A, Sunayama J, Okada M, Watanabe E, Seino S, Shibuya K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:811-824 (査読有)
- 3) Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Tachibana K, Tomiya A, Kayama T, Kitanaka C: MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis. *Stem Cells* 2011;29:1942-1951 (査読有)
- 4) Sunayama J, Sato A, Matsuda KI, Tachibana K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiya A, Kitanaka C: FoxO3a functions as a key integrator of cellular signals that control glioblastoma stem-like cell differentiation and tumorigenicity. *Stem Cells* 2011;29:1327-1337 (査読有)
- 5) Kaneko MK, Tian W, Takano S, Suzuki H, Sawa Y, Hozumi Y, Goto K, Yamazaki K, Kitanaka C, Kato Y: Establishment of a novel monoclonal antibody SMab-1 specific for IDH1 R132S mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406:608-613 (査読有)
- 6) Sunayama J, Matsuda KI, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiya A, Kitanaka C: Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Stem Cells* 2010;28:1930-1939 (査読有)
- 7) Sunayama J, Sato A, Matsuda KI, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T,

Tomiyama A, Kitanaka C: Dual blocking of mTOR and PI3K elicits a pro-differentiation effect on glioblastoma stem like-cells. Neuro-Oncol 2010;12:1205-1219 (査読有)

- 8) Tomiyama A, Tachibana K, Suzuki K, Seino S, Sunayama J, Matsuda KI, Sato A, Matsumoto Y, Nomiya T, Nemoto K, Yamashita H, Kayama T, Ando K, Kitanaka C: MEK-ERK-dependent multiple caspase activation via mitochondrial proapoptotic Bcl-2 family proteins is essential for heavy ion irradiation-induced glioma cell death. Cell Death Dis 2010;1:e60 (査読有)
- 9) Sato A, Sakurada K, Kumabe T, Sasajima T, Beppu T, Asano K, Ohkuma H, Ogawa A, Mizoi K, Tominaga T, Kitanaka C, Kayama T: Association of stem cell marker CD133 expression with dissemination of glioblastomas. Neurosurg Rev 2010;33:175-184 (査読有)
- 10) Sato A, Sunayama J, Matsuda KI, Tachibana K, Sakurada K, Tomiyama A, Kayama T, Kitanaka C: Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR. Neurosci Lett 2010;410:115-120 (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

- 1) 北中千史: グリオーマ幹細胞に着目した脳腫瘍研究 ~治療への応用を目指して~. 第1回 Neuro-Oncology West 研究会, 大阪 (ヒルトン大阪); 2012年12月8日
- 2) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第7回鹿児島脳腫瘍セミナー特別講演, 鹿児島 (城山観光ホテル); 2012年11月16日
- 3) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第5回玄海脳腫瘍セミナー特別講演, 福岡 (ソラリア西鉄ホテル); 2012年7月6日
- 4) 北中千史: グリオーマ幹細胞の維持に関わる分子機構. 第3回東京前立腺会議招待講演, 東京 (帝国ホテル); 2012年7月5日
- 5) 北中千史: 脳腫瘍の cell biology ~グリオーマ幹細胞~. 第30回日本脳腫瘍病理

学会生涯教育セミナー, 名古屋 (名古屋国際会議場); 2012年5月25日

- 6) 北中千史: グリオーマ幹細胞 ~診断/治療への応用を目指して~. 第45回東北脳腫瘍研究会研究会特別講演, 仙台 (江陽グランドホテル); 2012年4月7日
- 7) 北中千史: グリオーマ幹細胞に着目した脳腫瘍研究 ~診断治療への応用を目指して~. 第66回山形脳神経外科懇話会特別講演, 山形 (パレスグランドール); 2012年1月28日
- 8) 佐藤篤, 砂山潤, 松田憲一朗, 立花研, 渡部江梨子, 清野静香, 鈴木香, 成田善孝, 渋井壮一郎, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における FoxO3a を介した分化と造腫瘍能の制御. 第29回日本脳腫瘍学会学術総会, 下呂 (水明館); 2011年11月27日
- 9) Kitanaka C: Glioma stem cell - Dissecting the molecular mechanism involved in the maintenance of stem-like glioblastoma cells for future application to glioblastoma treatment -. The 24th International Symposium on Cancer Research, Tokyo (National Cancer Center); Nov 23 2011
- 10) 北中千史: グリオブラストーマ克服を夢見て脳神経外科専門医が迷い込んだ道 ~グリオーマ幹細胞研究を中心に~. 第3回山梨脳腫瘍研究会, 甲府 (富士屋ホテル); 2011年10月21日
- 11) 佐藤篤, 松田憲一朗, 砂山潤, 清野静香, 鈴木香, 渡部江梨子, 立花研, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における MGMT 発現制御の分子機構に関する検討. 第12回日本分子脳神経外科学会, 横浜 (パシフィコ横浜); 2011年10月15日
- 12) 北中千史: 腫瘍幹細胞仮説はグリオブラストーマに根治をもたらすか?. 第70回日本脳神経外科学会総会, 横浜 (パシフィコ横浜); 2011年10月13日
- 13) 佐藤篤, 松田憲一朗, 砂山潤, 清野静香, 鈴木香, 櫻田香, 立花研, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: MEK 経路阻害による MGMT 発現およびテモゾロミド感受性に関する検討. 第70回日本脳神経外科学会総会, 横浜 (パシフィコ横浜); 2011年10月12日

14) Kitanaka C: Molecular pathways involved in the maintenance and differentiation of stem-like glioblastoma cells. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (名古屋国際会議場); 2011年10月3日

15) Sato A, Matsuda KI, Sunayama J, Sakurada K, Tachibana K, Tomiyama A, Kitanaka C, Kayama T: MEK inhibition enhances temozolomide sensitivity of glioma stem-like cells via MGMT down-regulation. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋 (名古屋国際会議場); 2011年10月3日

16) 佐藤篤, 松田憲一郎, 砂山潤, 清野静香, 鈴木香, 櫻田香, 立花研, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における MGMT 発現とテモゾロミド感受性に関する検討. 第28回日本脳腫瘍学会, 軽井沢 (軽井沢プリンスホテル); 2010年11月28日

17) Sato A, Sunayama J, Matsuda KI, Tachibana K, Sakurada K, Tomiyama A, Kayama T, Kitanaka C: Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR. The 18th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Travemuende (Gran Spa Resort Arosa Travemuende); May 18 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北中 千史 (KITANAKA CHIFUMI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 70260320

(2) 研究分担者

根本 建二 (NEMOTO KENJI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 10208291

(3) 連携研究者

砂山 潤 (SUNAYAMA JUN)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 80466606

富山 新太 (TOMIYAMA ARATA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 40385810

立花 研 (TACHIBANA KEN)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 10400540

野宮 琢磨 (NOMIYA TAKUMA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 60436201