

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15533

研究課題名（和文）微小環境に応答するPolycomb群依存的ながん幹細胞性質の獲得メカニズムの解明

研究課題名（英文）Dissection of the roles of Polycomb complexes for tumor heterogeneity including Cancer Stem Cell in response to microenvironmental shift

研究代表者

原地 美緒（Harachi, Mio）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・特別研究員

研究者番号：60905553

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：最悪性の脳腫瘍である神経膠芽腫（グリオブラストーマ）の完治の主な一因と考えられている“がん幹細胞”について、EGFR-Polycomb群シグナルに着目した、培養系におけるメカニズム探索を行った。腫瘍幹細胞（Neurosphere）誘導前後でのトランスクリプトームをバルクで調べた結果として、成長シグナルであるEGFRや、Polycomb群をはじめとする様々なクロマチン結合タンパクの発現やDNAを含むクロマチン修飾状態がダイナミックに変動していることがわかった。これらの結果は、エピゲノム状態をもとに戻すことが治療耐性を獲得したがん細胞への治療標的となる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん細胞が治療抵抗を示す際に何が起きているのかという問いについて、発生学の観点から腫瘍分野に持ちこみ、Polycomb群によってがん細胞が初期化を起し、結果として治療抵抗を示す可能性を示唆する結果を得た。これはがん細胞の治療抵抗性の本質に迫る研究であり、治療標的候補としての可能性を広げる社会的な貢献性だけでなく、正常幹細胞で使われているPolycomb群の機能が、腫瘍になると治療抵抗を獲得する結果となるという、学術的な新規性をもつ。

研究成果の概要（英文）：We conducted a mechanistic exploration in a cultured system, focusing on the EGFR-Polycomb group signaling in relation to cancer stem cells, which are considered a primary factor in the cure of glioblastoma, the most malignant type of brain tumor.

A bulk transcriptome analysis was performed before and after the induction of cancer stem cells (Neurospheres). The results revealed dynamic changes in the expression of growth signals such as EGFR, various chromatin-binding proteins including the Polycomb group, and chromatin modifications involving DNA. These findings suggest that reverting the epigenomic state could be a potential therapeutic target for cancer cells that have acquired treatment resistance.

研究分野：エピゲノム

キーワード：エピゲノム Polycomb 悪性脳腫瘍 幹細胞 治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

最悪性度の脳腫瘍である神経膠芽腫（グリオブラストーマ）は、当初は治療効果が見られる抗がん剤や放射線などの標準治療に対して急速に治療抵抗を示すことが知られており、これが完治の大きな障壁となっている。その主な一因として“腫瘍幹細胞”と呼ばれる治療抵抗を持つ細胞集団が腫瘍内に残ることが再発の原因となっていると考えられている。近年、腫瘍幹細胞は正常幹細胞のように元々生体に内在する細胞でなく、過酷な環境変化に応答して誘導される、可塑的な表現型に過ぎないとの大胆な仮説が提唱されている [Taga, 2004]。すなわち、腫瘍内に幹細胞という確固たる細胞集団が存在するのではなく、治療ストレスや、低栄養・低酸素などの過酷な微小環境にさらされた腫瘍細胞の一部が、幹細胞性を獲得することで、生存・再発に寄与する可能性があるという仮説である。これは治療学的な観点から見ると、環境変化と幹細胞性の獲得をつなぐ細胞内シグナルの変化を捉えることができれば、治療抵抗性を克服できる新しい治療戦略が可能となることを示唆している。

2. 研究の目的

腫瘍の治療抵抗性の原因となっている幹細胞性質や不均一性をもたらす分子メカニズムについて、エピゲノムの変化に着目する。細胞分化や未分化維持などに重要な発生関連遺伝子を主なターゲットとする Polycomb 群 (PRC1、PRC2) に着目し、治療抵抗性を示す腫瘍細胞と Polycomb 群との関係、およびその分子メカニズムに踏み込む。細胞の分化状態を制御する Polycomb 群が、腫瘍細胞では腫瘍幹細胞性と治療抵抗性に寄与する可能性について検討し、将来の治療標的としての可能性を模索する。

3. 研究の方法

本研究では、膠芽腫細胞株の培養系による治療抵抗を示すモデルを確立し、分子レベルで何が起きているのか調べるためのアッセイを行う。具体的には、膠芽腫細胞株 U87 を用いて、微小環境を模倣した栄養欠乏条件下での培養により膠芽腫幹細胞 Neurosphere へ誘導したモデルを用いた。本モデルは、治療抵抗性を獲得する細胞の形質変化を、同一の培養系で再現したモデルで動物解析を行うため、異なる細胞間での遺伝学的背景（多型、SNP）など無視できるなど、簡易なモデル故の詳細解析が可能というメリットがある。本研究はこの Neurosphere 誘導前後における Polycomb 群の変化に着目した解析を行った。

4. 研究成果

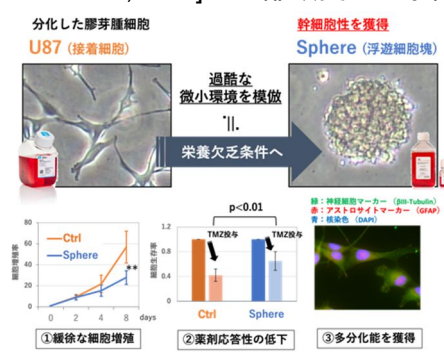
(1) Neurosphere 形成モデルにおける形態観測を実施

Neurosphere 誘導モデルは、Laks らのプロトコル [Stem Cells, 2009] を一部改変した条件で実施した。誘導後の時間変化を追跡し、およそ 7 日間の培養にて完全なスフェア形態をとる。

Neurosphere となった U87 は、コントロールとなる接着細胞時と比較して、細胞増殖能の大幅な低下 (図 1 -) 抗がん剤テモゾロミド

(Temozolomide; TMZ) に対する感受性が低下していた (図 1 -)。さらに、Neurosphere へ誘導した U87 は、他の細胞 (神経細胞) への分化能を獲得していることがわかった (図 1 -)。

以上の結果から膠芽腫幹細胞への誘導を確立したことを確認し、以下このモデルにおける転写変動およびエピゲノム修飾の変化を網羅的に調べた。



(2) バルクでのトランスクリプトーム解析の実施

多分化能を確認できた誘導後 7 日の Neurosphere とコントロールとなる接着細胞時における U87 の転写変動の比較を行った。Neurosphere そのものは不均一性に富んだ細胞塊であるため、ここでの目的は詳細な解析ではなく Pilot study である。転写レベルでどれだけの幹細胞化が進んでいるかの確認と、不均一性に富むとはいえ、その中で大きく変動している因子に着目するためである。バルクで細胞回収したトランスクリプトーム解析の結果、腫瘍幹細胞として知られているマーカーの発現がのきなみ上昇していることは確認したものの、特定の系統の細胞種あるいは幹細胞への濃縮は見られなかった (図 2: 腫瘍幹細胞マーカーの発現上昇)。さらに GO (Gene Ontology enrichment analysis) 解析による特定のシグナルや Biological process への傾向を調べた結果、Neurosphere において有意に偏向する特徴を抽出することはできなかった。正確に調べるためにはシングルセル解析が必須ではあるが、バルク比較のなかで、成長因子受容体である EGFR (Epidermal Growth

Factor Receptor) と、Polycomb 群の 1 つである PRC2 のサブユニット EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) タンパクおよび PRC2 のターゲットであるヒストン修飾 H3K27me3 のレベルがのきなみ低下していることが、トランスクリプトームおよびウェスタンブロットの結果から明らかとなった (図 2 : EGFR と EZH2 および H3K27me3 レベルの低下)。

以上の結果から、腫瘍幹細胞化における詳細な遺伝子発現変動を調べるためにはシングルセルが必須ではあるものの、バルク解析でも確認できるほど特に変動の激しかった PRC2 に着目するという方針を固めた。当初はここから種々のエピゲノム修飾を解析するため ChIPseq や CUT&Tag など予定していたが、トランスクリプトームの結果からバルクでは解析と解釈が困難であることをふまえ、詳細な分子解析より PRC2 に着目した形態観測を先行して行った。

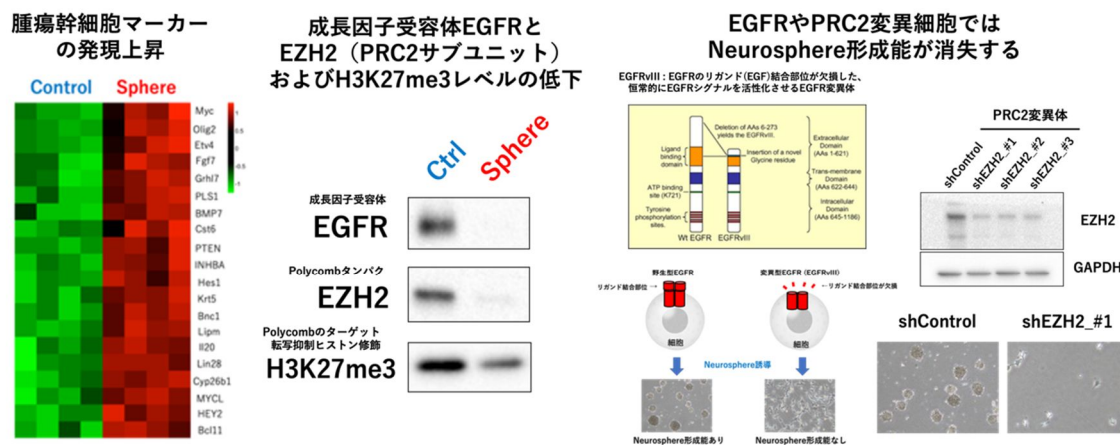


図 2 EGFR-PRC2シグナルによる腫瘍幹細胞化が示唆される

(3) EGFR-PRC2 シグナル変異 U87 の作製および Neurosphere 誘導を実施

Neurosphere 形成過程において EGFR-Polycomb 群 (PRC2) シグナルが責任となっている可能性について、それぞれの因子を変異させた U87 を用いて検証した。EGFR 変異に関しては、ヒト膠芽腫において最も高頻度に報告されている EGFR 活性化型変異 (EGFRvIII) [Oncogene, 2018] を用いた。EGFRvIII は受容体である EGFR のリガンド結合部位が欠損しており、本来のシグナルに非依存的な EGFR の自己リン酸化によって恒常的に活性化する代表的な変異であり、膠芽腫を含む多くの難治性腫瘍で見られる変異である。驚くべきことに、EGFRvIII では Neurosphere 形成が起こらなかった。さらに、shRNA をウイルス感染させた EZH2 ノックダウン変異 U87 では、Neurosphere 誘導が起こらず、細胞死となった。

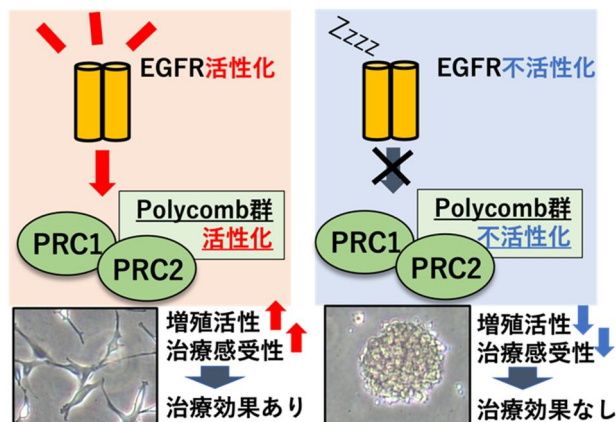
これらの結果から、幹細胞化が起こるためには EGFR などの外部シグナルを感知する機能が必須であると同時に、そのシグナルの下流で、幹細胞化へのスイッチを制御している 1 つが PRC2 であることが示唆されるデータを得た。

【結論】

本研究は、治療抵抗性がん細胞の原因の 1 つである腫瘍の幹細胞化について、培養細胞で再現した改変モデルを用いてメカニズムに踏み込む研究展開を行った。結果、腫瘍幹細胞化をきたす原因の 1 つが EGFR-PRC2 シグナルであることが示唆されるデータを取得した。EGFR-PRC2 シグナルは、先行研究にて我々が新規に見出した遺伝子異常とエピゲノムを繋ぐメカニズムの 1 つであり、これによって膠芽腫の異常な細胞増殖能を亢進していることを明らかとしてきた [J. Biol. Chem., 2019; Molecular Cancer Research, 2020]。通常の増殖時には活性化している EGFR-PRC2 が、微小環境下に曝された際にはそのシグナルを落とし、増殖活動の活発状態から細胞死を免れるための守りの体制に入っていることが示唆される。これによって細胞周期 G0 に入った細胞は抗がん剤などの影響を受けず、結果として治療抵抗に繋がるというメカニズムが示唆される。

今後は NGS を用いた詳細な分子メカニズムを解析することで、より直接的なターゲットの探索と将来の新規治療に向けた応用研究を実施する予定である。

図 3 EGFR-PRC2シグナルによる治療抵抗性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------