

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830088

研究課題名(和文) 誘導型ヒト人工がん幹細胞を用いたがん再発モデルの構築ならびに再発責任分子の同定

研究課題名(英文) Development of recurrence mouse brain tumor model using inducible iCSCs and identification of target molecules in recurrence tumor

研究代表者

大西 伸幸 (ONISHI, NOBUYUKI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40534540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がんの再発・転移の原因は治療後に残存するがん幹細胞であると考えられている。本研究ではマウス神経幹細胞(NSCs)に活性化型ALKを導入してマウス脳内に移植する発がんモデルを応用し、移植後にマウス脳内で遺伝子発現を誘導/消失できる誘導型発がんモデルを構築した。また、活性化型ALKならびに活性化型H-RAS導入によるNSCsの染色体異常を解析したところ、導入遺伝子毎に特徴的な染色体毎のコピー数異常が検出された。今後、誘導型発がんモデルを用いてコピー数異常の変化を解析し、発がん・再発時における責任分子の同定を目指したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The cancer stem cells (CSCs) are thought that the cause of local recurrence or distant organ metastasis following therapy. In this study, we have established the inducible mouse brain tumor model transplanting the genetically modified neural stem cells (NSCs) using Tet-On system. Inducible expression of activated-ALK could transform the NSCs in the presence of Dox treatment in mice. Next, we performed the exome sequence analysis to investigate the genetic aberration in the activated-ALK or -H-RAS expressing NSCs. Exome data showed that characteristic change of copy number in each chromosomes were observed in these cells. Using the inducible mouse brain tumor model, we would like to establish the recurrence mouse brain tumor model and identify the target molecules in recurrence tumors by analyzing copy number change.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：神経幹細胞 ALKキナーゼ 脳腫瘍モデル

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍、特にグリオブラストーマ (glioblastoma multiforme: GBM) は原発性脳腫瘍のうち悪性度が最も高く、浸潤の早さから手術による全摘は困難とされており、平均生存期間は約1年と極めて予後不良な悪性腫瘍である。GBMは放射線・化学療法に抵抗性を持ち、効果的な治療法は未だ確立されていない。GBMの性状を理解し新たな治療戦略を考案することを目的に、我々は、ヒトGBMにおいて高頻度に異常がみられる *Ink4a/Arf* 遺伝子の欠損マウス神経幹細胞 (neural stem cell: NSC) にマウスレトロウイルスを用いて活性型 H-RAS (H-RAS V12) を導入し同系マウス脳内に移植することでマウス脳腫瘍モデルを構築した (Neoplasia. 13:784-91. 2011)。続いて、GBMの一部で高発現していることが報告されている Anaplastic lymphoma kinase (ALK) の活性型変異体 (ALK R1275Q) を同マウスに導入することで、高い細胞密度で周囲の脳実質に浸潤性に増殖し、ヒトGBMに酷似した特徴を有する脳腫瘍を形成することができた (論文準備中)。また、ALK R1275Q を野生型マウス NSC に導入することで、

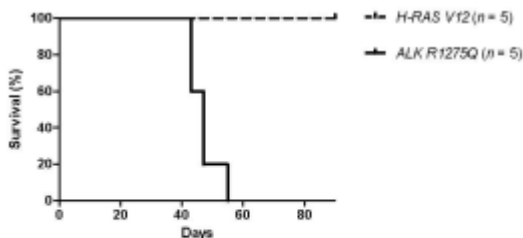


図 1. H-RAS V12 および ALK R1275Q 導入

野生型 NSC の脳内移植によるマウス生存曲線

Ink4a/Arf 欠損マウス NSC の時と同様に悪性度の高い脳腫瘍を形成することができた (図 1)。

野生型マウス NSC への導入では脳腫瘍を形成できなかった H-RAS V12 とは異なり、ALK R1275Q は単一遺伝子導入による発がんが可能であることが示唆された。次に、このモデルを基に、ヒト NSC を用いた GBM 発がんモデルの構築を試みた。マウス NSC と同様に、既に培養方法を確立していたヒト NSC (慶應義塾大学医学部生理学教室 岡野栄之教授より供与) からヒト人工がん幹細胞 (induced Cancer Stem Cells: iCSC) を誘導する準備段階として、ヒト iPS 細胞誘導に用いられていた Takahashi ら (Cell. 131:861-72. 2007) の方法に従い、レンチウイルスを用いてマウスレトロウイルス受容体遺伝子 (京都大学 iPS 細胞研究所 山中伸弥教授より供与) をヒト NSC に導入し、その細胞にマウスレトロウイルスを用いて ALK R1275Q を導入した。こうして樹立した細胞をヌードマウス脳内に移植したところ、マウス NSC の時と同様にヒト GBM に酷似した特徴を有する脳腫瘍を形成す

ることができ、ヒト iCSC の樹立に成功したことが確認できた (図 2)。

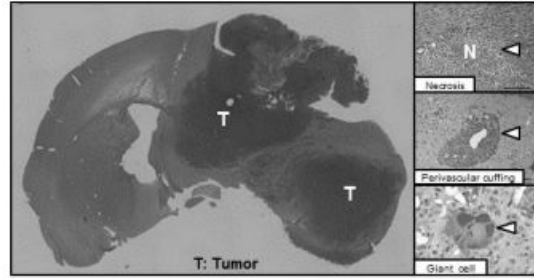


図 2. ALK R1275Q 導入ヒト NSC をヌードマウス脳内に移植して作製した脳腫瘍病理像

2. 研究の目的

がんの再発・転移はがん死要因の約 9 割を占めており、再発・転移性がんに対する効果的な治療が求められる。近年、がんの再発・転移の原因は治療後に残存するがん幹細胞であると考えられており、幹細胞様性質に加えて治療抵抗性を有することなどが報告されているが、がん幹細胞による再発・転移機構については未だ不明な点が多い。本研究では、これまでに申請者らが構築してきた人工がん幹細胞 (induced Cancer Stem Cells; iCSCs) を用いたマウス発がんモデルを応用し、マウス体内で腫瘍を発生・退縮させた後に再発する腫瘍について経時的に詳細な解析を行うことで、がん再発機構の責任分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでのシステムを発展させ、誘導型発がんモデルを構築することを目的に、Tet-On system を用いて Doxycyclin (Dox) 添加依存的に遺伝子発現を誘導できる Tet-On NSC を樹立した (図 3)。

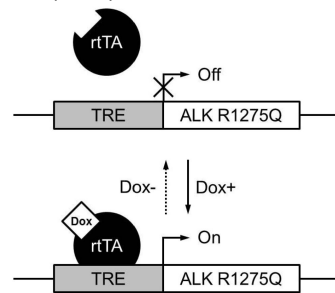


図 3. Tet-On system を用いた ALK R1275Q 遺伝子発現誘導

さらに、Tet-On NSC を用いて安定的な誘導型発がんモデルの構築ならびに解析を行った。(1) Tet-On-ALK R1275Q-NSC をヌードマウス脳内に移植後、Dox 含有餌を投与し発現誘導することで *in vivo* イメージングを用いて腫瘍形成を確認した。(2) Dox 投与依存的な脳腫瘍形成を確認後、Dox 不含有餌に切り替えて腫瘍退縮を確認した。(3) H-RAS V12 ならびに ALK F1174L、ALK

R1275Q-NSC よりゲノム DNA を抽出し、エクソーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) Tet-On-ALK R1275Q-NSC をヌードマウス脳内に移植後、Dox 含有餌を投与群で脳腫瘍を形成することができた(図4)。

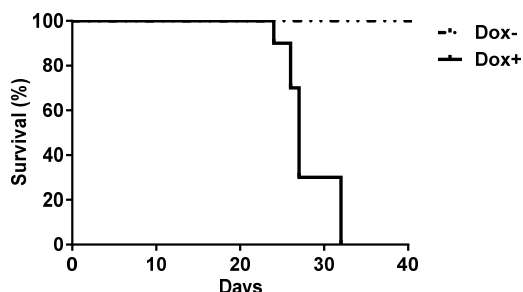


図4. Tet-On ALK R1275Q 導入野生型 NSC の脳内移植によるマウス生存曲線

(2) in vivo イメージングを用いて脳腫瘍形成を確認後、Dox 不含有餌に切り替えることで生存曲線を延長することができた(図5)。

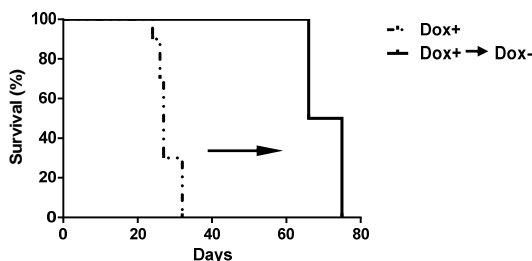


図5. Dox 投与中止によるマウス生存曲線の延長

(3)エクソーム解析により導入遺伝子に特徴的なゲノム DNA のコピー数異常が観察された(図6)。

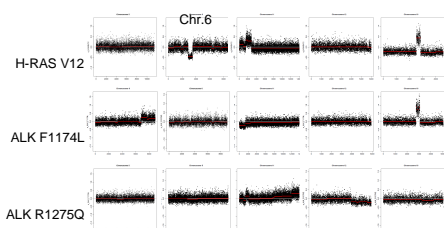


図6. H-RAS V12 および ALK F1174L、ALK R1275Q 導入によるゲノム DNA コピー数の変化

今後、誘導型発がんモデルを用いて遺伝子の発現誘導/消失によってコピー数異常が変化するかと解析し、発がん・再発時におけるがん細胞の機能解析を行うことで責任分子の同定を目指したいと考えている。

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 7件)

Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Tamaki S, Koyama Y, Kamei W, Ueki A,

Ishikawa T, Chiyoda T, Osuka S, Onishi N, Ikeda H, Kamei J, Matsuo K, Fukuchi Y, Nagai T, Toguchida J, Toyama Y, Muto A, Saya H.

IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress.

Cancer Res. 74:6531-41, 2014. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0914. (査読あり)

Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H, Kano K.

Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation.

Nat Commun. 5:3368, 2014. doi: 10.1038/ncomms4368. (査読あり)

Oikawa T, Nakamura A, Onishi N, Yamada T, Matsuo K, Saya H.

Acquired expression of NFATc1 downregulates E-cadherin and promotes cancer cell invasion.

Cancer Res. 73:5100-9, 2013. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0274. (査読あり)

Kitagawa M, Fung SY, Onishi N, Saya H, Lee SH.

Targeting Aurora B to the equatorial cortex by MKIIP2 is required for cytokinesis.

PLoS One. 8:e64826, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0064826. (査読あり)

Ishikawa T, Shimizu T, Ueki A, Yamaguchi SI, Onishi N, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Yamaguchi R, Miyano S, Saya H.

Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells.

Cancer Sci. 104:880-8, 2013. doi: 10.1111/cas.12163. (査読あり)

Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E, Okubo J, Fujita S, Takano S, Matsumura A, Saya H.

IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells.

Stem Cells. 31:627-40, 2013. doi: 10.1002/stem.1328. (査読あり)

Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H, Nagano O.

xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 73:1855-66, 2013. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3609-T. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2件)

大西 伸幸

Oncogenic stress をバイパスする ALK 発がんシグナルの解析
日本癌学会シンポジウム・共同利用共同
研究拠点シンポジウム
2015年1月22日
石川県立音楽堂交流ホール

Nobuyuki Onishi, Oltea Sampetean,
Eiji Sugihara, Hideyuki Saya

Development and analysis of mouse
brain tumor models derived from neural
stem cells expressing activated ALK
American Association for Cancer
Research Annual Meeting 2014
2014年4月9日
SAN DEGO Convention Center

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.genereg.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 伸幸 (ONISHI NOBUYUKI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 40534540