

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861168

研究課題名(和文) 神経膠芽腫幹細胞の代謝特性の解明

研究課題名(英文) Analysis of metabolic characteristics of glioma stem cells

研究代表者

サンペトラ オルテア (Sampetrea, Oltea)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50571113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫幹細胞の代謝特性及び分子背景を解析し、治療標的となりうる代謝関連因子の同定を目標として研究を行った。具体的には、悪性神経膠腫のマウスモデルを用いて、解糖経路を利用する腫瘍幹細胞及びTCA回路を利用する腫瘍幹細胞を樹立し、代謝特性の解析を行った。その結果、各々の幹細胞分画について利用する基質及び代謝特性を規定する酵素群を同定した。さらに、TCA回路を利用する神経膠腫幹細胞が低酸素の条件下では柔軟に代謝経路を変えることができ、代謝可塑性を有することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to analyze the metabolic characteristics of glioma stem cells (GSCs) and identify related targetable factors. With the use of a mouse model of glioblastoma, we established GSCs that rely on glycolysis and GSCs that obtain energy mainly through the tricarboxylic acid cycle and investigated their metabolic characteristics. For each GSC fraction, we identified their preferential substrates and the enzymes supporting their metabolic profile. Furthermore, we showed that GSCs that can use the TCA cycle under normal conditions can flexibly switch to glycolysis in hypoxic conditions and that they display metabolic plasticity.

研究分野：がん

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は自己複製能、分化能が高く、ひとつの細胞からでも腫瘍塊を再構築する能力を持っていることから、腫瘍再発の責任細胞であると考えられている。つまり、癌を根治する上で癌幹細胞の根絶が必須であるといえる。膠芽腫 (Glioblastoma: GBM) は再発率が高く、生存期間が2年に満たない予後不良な腫瘍である。GBM においても、治療成績が向上しない原因の一つは神経膠腫幹細胞 (glioma stem cell: GSC) の存在にあると考えられている。GSC は薬剤を排出する能力、DNA 損傷を修復する能力とも高いため、既存の抗癌剤及び放射線治療では根絶ができない。つまり、GBM の再発を予防するためには GSC の特性を標的とした、新たな発想に基づく治療が求められている。しかし、GSC の性質がまだ十分に解明されていないため、治療標的となりうる特性や分子も未だに同定されていない。申請者はこれまでの研究の遂行過程で、GSC が二つのエネルギー産生経路を利用することができ、正常脳・腫瘍組織の中でも極めて特徴的な代謝プロファイルを示すことを見出した。本研究では、GSC の代謝特性の分子背景をさらに詳しく解析し、GSC のエネルギー産生の規定因子であり、治療標的となりうる代謝関連因子の同定を目標とした。

2. 研究の目的

代謝経路の異なる2種類のマウス GSC モデル細胞を用いて、それぞれの代謝経路についてその規定分子を探索し、GBM において治療標的になりうる代謝制御因子の同定を目標として研究を行った。具体的には、以下の検討を行うものとした。

(1) 2種類の GSC モデル細胞のフェノタイプ解析: GSC、非癌幹細胞、そして正常神経幹細胞 (neural stem cell, NSC) との間で

遺伝子・蛋白質の発現解析、細胞内・外の代謝産物の解析を行い、解糖系 GSC と TCA 回路系 GSC に特異的に発現している因子を探索する。

(2) フローサイトメトリーを用いた解糖系・TCA 回路系 GSC の分取法の確立: ヒト GSC 細胞株から代謝経路が異なる様々な画面の単離、樹立を最終目標に、マウスモデルを用いて2種類の代謝プロファイルの細胞を分取する方法を確立する。

(3) 代謝経路制御因子の解析: (1) で同定した因子についてマウスモデルで役割及び機能解析を行い、解糖系 GSC と TCA 回路系 GSC の代謝経路の規定因子を特定する。さらに、特定した因子について、抗 GSC 治療標的としての有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 2種類の GSC モデル細胞のフェノタイプ解析:

基本特性の解析: 樹立している2種類の GSC の増殖能は細胞数カウント、自己複製能はスフェア形成能より算出した。さらに、GSC をマウスの前脳に移植し、形成された腫瘍の病理組織解析を施行した。

細胞外フラックス解析: シーホース細胞外フラックスアナライザーを用いて、GSC の細胞外液酸性化速度、酸素消費を測定した。また、BP400 バイオケミカル・アナライザーを用いて、酸素、糖、グルタミンの消費、pH の変動、乳酸、グルタミン酸、アンモニアの産生を評価した。

遺伝子発現解析: *Ink4/Arf*^{-/-}NSC、解糖系 GSC と TCA 回路系 GSC のマイクロアレイ (Affimetrix の GeneChip) 解析結果より Gene Set Enrichment Analysis にて各遺伝子群で特異的に上昇している代謝関連酵素を検証した。

(2) フローサイトメトリーを用いた解糖系・TCA 回路系 GSC 分画の分取法の確立:

分取方法 1 の検討: GSC に蛍光標識された酸化ストレスマーカー及び代謝産物類縁体を添加し、フローサイトメトリーにてラベル体の取り込みが異なる分画を分取し、代謝特性の解析を行った。

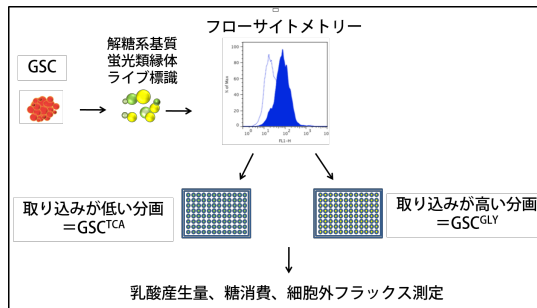


図 1 : 全 GSC より解糖系 GSC (GSC^{GLY}) 及び TCA 回路系 GSC (GSC^{TCA}) を分取する方法の検討

分取方法 2 の検討: GSC に細胞内酸素化状態を反映するマーカーを添加し、フローサイトメトリーにてラベル体の取り込みが異なる分画を分取し、代謝特性の解析を行った。

(3) 代謝経路制御因子の解析:

代謝プロファイルの安定性の評価: 解糖系・TCA 回路系 GSC 分画を低酸素、低栄養などに曝露し、代謝経路の変化を評価した。

代謝経路制御因子の解析: 定常状態及びの条件で培養した GSC における代謝関連酵素の発現を PCR、immunoblot にて検証した。

4. 研究成果

(1) 2種類の GSC モデル細胞のフェノタイプ解析: 解糖系 GSC と TCA 回路系 GSC の増殖能、自己複製能、腫瘍形成能には有意差が認められなかった。それぞれの GSC が形成した腫瘍の病理像にも明らかな違いはみられなかった。一方、細胞外フラックス解析より TCA 回路系 GSC は乳酸産生能のみならず、酸素消費速度も有意に高いことが確認

された。さらに、グルタミンの消費及びグルタミン酸の産生も有意に高いことが明らかになった (表 1)。

幹細胞特性	GSC ^{GLY}	GSC ^{TCA}
自己複製能	36.3±6.5%	25±3%
倍加時間	17.5±0.4 時間	18.4±0.6 時間
腫瘍形成能	100%	100%
平均生存値 (GSC100個移植)	36日	36日
代謝特性	GSC ^{GLY}	GSC ^{TCA}
糖消費	高	低
酸素消費	低	高
グルタミン消費	低	高
グルタミン酸産生	低	高
乳酸産生	高	低

表 1 : GSC^{GLY} 及び GSC^{TCA} の特性比較 (Shibao S, Sampetean O et al, 論文投稿準備中)

遺伝子発現解析より解糖系 GSC において上昇している代謝酵素群として解糖系、糖新生、ペントースリン酸経路、脂肪酸代謝、プリン、ピリミジン代謝関連遺伝子群、TCA 回路系 GSC において発現が上昇している代謝酵素群として酸化的リン酸化、トリプトファン代謝、スフィンゴ脂質代謝関連遺伝子群を同定した (図 2)。各遺伝子群より発現が有意に高い酵素を選択し、immunoblot や免疫染色にてタンパク発現も上昇していることを明らかにした。

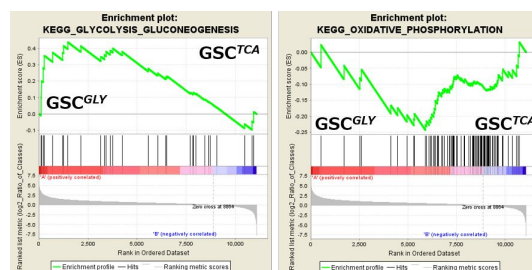


図 2 : 解糖系 GSC (GSC^{GLY}) 及び TCA 回路系 GSC (GSC^{TCA}) における代謝関連遺伝子群の発現差の一例 (Shibao S, Sampetean O et al, 論文投稿準備中)

(2) フローサイトメトリーを用いた解糖系・TCA 回路系 GSC 分画の分取法の確立:

酸化ストレスマーカー及び代謝産物蛍光標識類縁体による単剤ソーティングを行った結果、糖などの基質消費、乳酸などの代謝産物産生速度が異なる分画が樹立できた。しかし、樹立できた分画の増殖能も異なったことから、代謝の違いは増殖速度を反映するものであり、解糖系 GSC と TCA 回路系 GSC に相当する分画の単離には不十分であることが明らかになった。この分取方法については今後、二つのマーカーの組み合わせによる単離の検討を予定している。

一方、細胞内酸素化状態を反映するマーカーによるソーティングでは代謝経路の異なる分画の単離に成功した。ソーティングの結果樹立した GSC 分画は糖消費、乳酸産生などの細胞外代謝産物フラックスが有意に異なっており、また、マウスの脳内に移植した場合、腫瘍形成能、血管新生にも有意差が認められた(図3)。

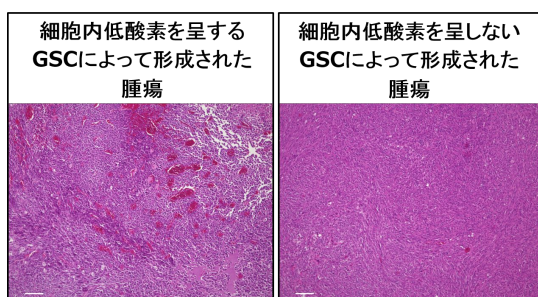


図3：細胞内低酸素を呈する GSC は血管新生、出血及び壊死が顕著な腫瘍を形成する。細胞内低酸素を呈しない GSC は細胞密度が高く、均一な腫瘍塊を形成する。

腫瘍形成能、病理組織像に差異が認められたことから、この方法で単離した GSC は代謝特性が異なるものの、解糖系 GSC、TCA 回路系 GSC と完全に一致しないことが予想されたため、現在はその代謝プロファイルの詳細な解析を進めている。

(3) 代謝経路制御因子の解析:

(1) の解析より解糖系 GSC 代謝のキーファクターとして hexokinase 2 (HK2)、lactate dehydrogenase (LDH)、pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1)を含む解糖系関連酵素の同定に成功した。同定した因子より治療標的となりうるものを選定するため、各々の GSC 分画で低酸素、低栄養などの腫瘍内の環境因子に影響を受ける因子と影響を受けない因子について検証した。その結果、TCA 回路系 GSC が低酸素曝露によって可逆的に解糖系 GSC に変化することを見出した。さらに低酸素下の GSC^{TCA}の代謝プロファイルを明らかにし、発現が変動する関連酵素と変動しない関連酵素の2群を同定した。現在、各群より発現レベルの変動がもっとも大きかった因子について RNAi を用いた機能阻害実験を開始している。

上記の結果より、膠芽腫において解糖系代謝を利用している幹細胞、酸化的リン酸化代謝を利用している幹細胞のいずれも存在し、自己複製、増殖ができることが示唆された。各々の GSC の代謝特性を制御する因子の機能解析とともに、壊死、低酸素、低栄養などの環境因子が誘導する代謝経路の変化のさらなる解明が膠芽腫における抗代謝療法の考案につながると考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計2件)

Fujita S, Osuka S, Shibao S, Igarashi K, Soga T, Sampetean O. Effects of fractionated radiation on murine glioma stem cell metabolism. Toho J Med, 査読有、2016 (in press)

Tsuchihashi K, Okazaki S, Ohmura M, Ishikawa M, Sampetean O, Onishi N, Wakimoto H, Yoshikawa M, Seishima R, Iwasaki Y, Morikawa T, Abe S, Takao A,

Shimizu M, Masuko T, Nagane M, Furnari FB, Akiyama T, Suematsu M, Baba E, Akashi K, Saya H and Nagano O. The EGF receptor promotes the malignant potential of glioma by regulating amino acid transport system xc(-). Cancer Res, 査読有, 2016 76(10):2954-2963, doi: 10.1158/0008-5472. CAN-15-2121

〔和文総説〕(計1件)査読なし

福井伸行、サンペトラ オルテア：脳腫瘍幹細胞研究によるグリオーマ治療戦略（脳神経外科診療プラクティス、7グリオーマ治療の Decision Making、分光堂、2016）

〔学会発表〕(計6件)

Sampetean O, Shibao S, Minami N, Saya H. Metabolic characteristics of stem cells during glioma formation, Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer, Hyatt Regency Maui (Maui, USA), February 18th, 2016

サンペトラ オルテア、公田龍一、小池直義、佐谷秀行：グリオーマ幹細胞の放射線後の細胞周期解析、日本脳神経外科学会第74回学術総会、2015年10月13日-16日、ロイトン札幌（北海道札幌市）

サンペトラ オルテア、柴尾俊輔、佐谷秀行：膠芽腫幹細胞の代謝特性の解析、第3回がんと代謝研究会、2015年7月16日-17日、石川県立音楽堂（石川県金沢市）

Sampetean O, Saya H: Metabolic characteristics of brain tumor stem cells, 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 26th, 2014, Pacifico Yokohama (Kanagawa Prefecture, Yokohama)

サンペトラ オルテア：脳腫瘍幹細胞における治療抵抗性のメカニズム、第47ニュー

ーロオンコロジーの会、2014年8月10日、東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設（東京都葛飾区）

サンペトラ オルテア、柴尾俊輔、嵯峨伊佐子、佐谷秀行：膠芽腫におけるエネルギー代謝の多様性、第2回がんと代謝研究会、東京理科大学葛飾キャンパス 図書館大ホール（東京都）2014年7月10日

〔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〕

<http://genereg.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

サンペトラ オルテア (Sampetean Oltea)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50571113