

令和元年5月16日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19585

研究課題名(和文)がん未分化性獲得過程におけるゲノム異常と転写調節のクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between genomic abnormality and transcription activity for acquisition of stem cell property of cancer

研究代表者

平尾 敦 (HIRAO, Atsushi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：90343350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術を用いて、ヒトグリオーマで認められる主要遺伝子変異(CDKN2A, PTEN, NF1, TP53)を初代培養アストロサイトに導入したところ、不死化や増殖能の亢進が観察された。しかし、この不死化アストロサイトは、患者由来サンプルと比較して、僅かなスフィア形成能を有するのみであった。既知の幹細胞性獲得転写因子の強制発現は、分化した脳腫瘍細胞においては未分化性獲得に寄与したものの、アストロサイトでは不十分であり、更なる遺伝子異常あるいはシグナル異常が必要であると考えられた。一方、本研究において、新規の幹細胞可視化システムを構築したため、今後の未知因子の探索に有用であると期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、がんの幹細胞特性の獲得には多くの因子の異常が複雑に関連していることが明らかとなった。また、本研究で得られた解析ツールを用いることにより、今後、未分化性獲得に必須のシグナルや治療標的を特定することにつながると期待された。本研究を通して得られた成果は、がんの診断、予防、治療の発展に寄与すると考えられ、将来、健康福祉の観点から社会に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand relationship between genomic abnormality and transcription activity for acquisition of stem cell property of brain tumor. We found that primary human astrocytes were immortalized by introducing gene mutations of 4 major tumor suppressors or oncogenes, however, they did not form remarkable tumor mass in vivo, unlike patient-derived glioma samples. In addition, introduction of 4 transcription factors which reportedly contribute to acquisition of stem cell property of differentiated glioma cells were not able to transform immortalized astrocytes into malignant status, indicating that additional mutations are required. In the paralleled experiments, we successfully generated a patient-derived glioma cell clone, in which GFP was inserted at the locus of a stem cell marker gene. Since this GFP system is useful for visualization of stemness of tumor, we expect that it contributes to discovery of factors essential for acquisition of cancer stemness.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：脳腫瘍 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの発生や悪性化においては、数多くの遺伝子変異が組み合わさり、その結果として、多様かつ不均一な形質を示すがん細胞が生みだされる。このようながん組織の不均一性や多様性は、極めて複雑な要素から構成されているため、その統合的理解への糸口は未だ見つかっていない。近年、がんの悪性化の過程で、幹細胞的形質(ステムネス)が獲得される現象がしばしば観察され、幹細胞性の制御機構は、がんの悪性化の本質と深く関連していると考えられる。悪性神経膠腫(グリオーマ)は、グリア細胞由来の腫瘍であり、グレード IV にあたる膠芽腫(グリオブラストーマ)は、臨床的病理像が多彩で、かつ最も予後不良の悪性腫瘍である。大規模ゲノム解析の結果、EGFR などの受容体型チロシンキナーゼの活性化異常、PTEN の活性抑制変異などによる PI3K-AKT 経路の活性化、RAS の活性化変異と NF1 の活性抑制変異などによる RAS-MAPK 経路の活性化、p53 変異、RB 経路の抑制、その他クロマチン修飾に関わる遺伝子異常が示された。起源細胞としては、神経幹・前駆細胞のほか、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどの分化したグリア細胞の可能性を示す知見も報告され、がん化の過程では、分化型グリア細胞での遺伝子異常が、細胞の脱分化(幹細胞性の獲得)や悪性化を誘導するのではないかと考えられている。このような遺伝子変異のシグナルが、いかに幹細胞性・未分化性の獲得という分化プログラムに影響するのか未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト初代培養アストロサイトへの遺伝子変異の導入と転写因子発現誘導を組み合わせた人工的がんモデルの作製を通して、脳腫瘍(グリオーマ)の発生過程において、いかに幹細胞性・未分化性が獲得されるのか、その分子基盤の包括的な理解を目指した。研究の中では「ゲノム異常ががん特有の転写調節を司る」というコンセプトに基づき、幹細胞性獲得のための遺伝子発現情報を得ることを目標とした。これらの情報を基に、不均一性や多様性からなるがん悪性化の本態を理解する。

3. 研究の方法

1) 初代培養ヒトアストロサイトを用いた新規がん(グリオーマ)モデルの作製

(1) 細胞増殖変化

ヒトグリオーマにおいて高頻度で変異がみられる遺伝子(CDKN2A, PTEN, NF1, TP53 等)の CRISPR プラスミドを作製し、初代培養アストロサイトに導入し細胞増殖を評価した。

(2) 幹細胞性の評価

上記の遺伝子変異導入アストロサイトを用いて、スフィア形成能、幹細胞マーカー(CD133 等)の発現、免疫不全マウスの頭蓋内への移植による腫瘍形成能を解析し、幹細胞性形質を評価した。

2) 幹細胞性獲得のための転写因子の特定

転写因子スクリーニングのためには、Public Database による情報を用いる。候補転写因子を個別に、不死化アストロサイト、あるいは、分化型腫瘍細胞に導入し、スフィア形成を指標として幹細胞性獲得能を持つ転写因子の評価を行った。得られた候補転写因子について、さらに、幹細胞形質を詳細に検討した。

4. 研究成果

1) 主要遺伝子変異の導入

ゲノム編集技術を用いて、ヒトグリオーマで認められる主要遺伝子変異(CDKN2A, PTEN, NF1, TP53)を初代培養アストロサイトに導入し表現型解析を行った。これら 4 遺伝子すべてをノックアウトすると、不死化や増殖能の亢進が観察された。この不死化アストロサイトは、患者由来サンプルと比較して、僅かなスフィア形成能を有するのみであった。また、免疫不全マウスの頭蓋内への移植による腫瘍形成能を解析したところ、患者由来腫瘍細胞は、100 日以内にマウスが腫瘍細胞の増大により死亡するのに対して、不死化アストロサイトでは、明確な腫瘍形成は認められなかった。以上の結果より、本実験で用いた条件では、悪性化に必要な未分化性の獲得には至らず、幹細胞性の獲得には、追加的な遺伝子発現調節機構が必要であると考えられた。そこで、未分化性獲得のために必要な因子を特定するため、これらの不死化アストロサイトと患者由来腫瘍細胞との遺伝子発現解析を行った。その結果、患者由来腫瘍細胞でより高い発現を示す転写因子群の存在が認められた。

2) 転写因子の導入

次に幹細胞性獲得に重要な転写因子の探索を実施した。文献的には、Olig2 をはじめとした 4 つの転写因子が幹細胞性の獲得に十分であることが報告されている。そこで、これらの 4 因子によって、幹細胞性が獲得できるかどうか検討した。これらの 4 因子は、脳腫瘍患者由来細胞を血清入り付着培養で分化させると顕著に発現低下が認められた。また、スフェロイド形成能を喪失した分化腫瘍細胞に 4 因子を再導入すると、スフェロイド形成能を再び獲得するなど、幹細胞の機能獲得に重要であることを検証できた。そこで、これらの 4 因子を、不死化アストロサイト細胞に導入したが、現時点では十分な幹細胞獲得効果は観察できていない。このことから、不死化アストロサイトでは、遺伝子異常が十分ではない、あるいはエピジェネティック

な状態が腫瘍とは異なるのではないかと考えられた。

3) 幹細胞性獲得のための未知の因子の探索

未知の因子を探索するためのツールの作製を試みた。上記転写因子のうち、特に腫瘍細胞の分化と相関する遺伝子を選択し、その遺伝子の発現を可視化するシステムの構築を試みた。そのため、脳腫瘍患者検体でスフェロイド培養している株を用い、幹細胞特異的発現遺伝子のコーディング領域の3'端にIRES-EGFPを挿入したクローンを作製した。その結果、スフェロイド状態ではGFP由来の蛍光が確認された一方で、血清入り付着培養においては、GFPの発現が消失するなど、GFPの輝度により未分化状態を反映するツールを作製することができた。本ツールは、生体内における腫瘍組織の未分化状態をモニターする上で有用であると考えられた。また、上記の転写因子の機能解析やCRISPR/CAS9ライブラリーを用いた幹細胞性獲得因子の探索に有用であると考えられた。

4) まとめ

本研究の成果によって、がんの幹細胞特性の獲得には多くの因子の異常が複雑に関連していることが判明し、今後、更なる因子の同定に有用な知見となった。さらに、本研究を推進することで、未分化性獲得に必須のシグナルや治療標的を特定することにつながると期待された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. Imanishi T, Unno M, Kobayashi W, Yoneda N, Matsuda S, Ikeda K, Hoshii T, Hirao A, Miyake K, Barber GN, Arita M, Ishii KJ, Akira S, Saito T. Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function. *Life Sci Alliance*. 2019 Jan 25;2(1). pii: e201800282.
2. Vu HT, Kobayashi M, Hegazy AM, Tadokoro Y, Ueno M, Kasahara A, Takase Y, Nomura N, Peng H, Ito C, Ino Y, Todo T, Nakada M, Hirao A. Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas. *Cancer Sci*. 2018 Aug;109(8):2497-2508.
3. Li R, Gunarta IK, Suzuki R, Boldbaatar J, Nakazato R, Yuliana D, Davaakhuu G, Oyunsuren T, Takamatsu N, Kobayashi M, Hirao A, Yoshioka K. JLP-JNK signaling protects cancer cells from reactive oxygen species-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jun 27;501(3):724-730
4. Tadokoro Y, Hoshii T, Yamazaki S, Eto K, Ema H, Kobayashi M, Ueno M, Ohta K, Arai Y, Hara E, Harada K, Oshima M, Oshima H, Arai F, Yoshimura A, Nakauchi H, Hirao A. Spred1 Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress. *Cell Stem Cell*. 2018 May 3;22(5):713-725.e8.
5. Peng H, Kasada A, Ueno M, Hoshii T, Tadokoro Y, Nomura N, Ito C, Takase Y, Vu HT, Kobayashi M, Xiao B, Worley PF, Hirao A. Distinct roles of Rheb and Raptor in activating mTOR complex 1 for the self-renewal of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):1129-1135
6. Dong Y, Furuta T, Sabit H, Kitabayashi T, Jiapaer S, Kobayashi M, Ino Y, Todo T, Teng L, Hirao A, Zhao SG, Nakada M. Identification of antipsychotic drug fluspirilene as a potential anti-glioma stem cell drug. *Oncotarget*. 2017 Dec 4;8(67):111728-111741
7. Ali MAE, Fuse K, Tadokoro Y, Hoshii T, Ueno M, Kobayashi M, Nomura N, Vu HT, Peng H, Hegazy AM, Masuko M, Sone H, Arai F, Tajima A, Hirao A. Functional dissection of hematopoietic stem cell populations with a stemness-monitoring system based on NS-GFP transgene expression. *Sci Rep*. 2017 Sep 12;7(1):11442.

[学会発表](計11件)

1. 平尾敦: 造血幹細胞自己複製の制御と腸内細菌叢北海道大学「感染・免疫・がん・炎症」シンポジウム 2019年3月27日
2. Hirao A: The nutrient signals in self-renewal of hematopoietic stem cells and tumorigenesis 2019 US-Japan Symposium on Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies 2019年2月19日 ハワイ, 米国
3. Hirao A: Metabolic Regulation of Stemness in Malignant Hematopoiesis Eleventh AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine 2019年2月12日 ハワイ, 米国
4. Hirao A: Metabolic Control of Cancer Stemness. The 2nd NanoLSI Symposium in London Towards Establishment of New Research Field: Nanoprobe Life Science- Nov.19, 2018, London

5. Hirao A. Regulation of stem cell properties by metabolic signals in hematopoietic neoplasm. JSPS - National University of Singapore (NUS) 2nd Symposium. Jan 18th-20th, 2018, Kumamoto, Japan
6. Hirao A: Metabolic Regulation of Stemness in Malignant Hematopoiesis. International symposium on drug discovery (Joint symposium of Univ. of Tokyo and Novartis Institute) Oct.22, 2018, Tokyo
7. 平尾敦:造血幹細胞の運命決定機構—自己複製の異常と疾患— 第7回細胞再生医療学会, 2017
8. 平尾敦: 幹細胞 第10回研修医のための血液学セミナー2017年7月8日, 大津
9. Hirao A: Regulation of stem cell properties by nutrient signals in hematopoietic neoplasms. 2017 Cancer Biology Symposium. Jun 23, 2017, Taiwan
10. Hirao A: Hematopoietic stem cell homeostasis under diet-induced systemic stress. The joint symposium on tumor microenvironment and precision medicine. May 22, 2017, Seoul, Korea
11. 平尾敦:造血幹細胞の運命決定機構—自己複製の異常と疾患—, 臨床分子医学会 2017年4月14日, 東京

〔図書〕(計1件)

1. Naka K, Hirao A. Regulation of Hematopoiesis and Hematological Disease by TGF-Family Signaling Molecules. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017 Sep 1;9(9). pii: a027987

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 脳腫瘍治療組成物

発明者: 中田光俊, 平尾敦, 北林朋宏, サビエルジャンジャパル

権利者: 国立大学法人金沢大学

種類: 特許権

番号: 2017-149468

出願年: 平成 29 年 8 月 1 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/about/department/cscr07/>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 小林昌彦

ローマ字氏名: Masahiko Kobayashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。