

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700966

研究課題名(和文) 脳腫瘍における幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the maintenance of stemness of glioma initiating cells

研究代表者

古室 暁義 (KOMURO, AKIYOSHI)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：50512274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：我々はTGF-ファミリーシグナルが脳腫瘍幹細胞に与える影響について検討した。その結果、骨形成因子4(Bone morphogenetic protein 4: BMP4)による脳腫瘍幹細胞の未分化性維持の阻害に与与することが確認できた。次に、マイクロアレイとRNA-Seqを用いて、脳腫瘍幹細胞における新たなBMP4の応答遺伝子を同定した。同定した遺伝子について強制発現やノックダウンを行うと、脳腫瘍幹細胞の分化や浸潤性獲得に与与することが明らかになった。同定した新規BMP4標的遺伝子をターゲットにした治療薬が脳腫瘍に対する新たな治療法になると期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of TGF-beta family signaling on the stemness of glioma initiating-cells (GICs), we observed that Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) had inhibitory effects of the maintenance of stemness of GICs. And we identified novel BMP4 signal target genes in GICs by using gene expression microarray analysis and RNA-seq. Using overexpression or knockdown of these novel BMP4 target genes, we found that these genes were correlated with differentiation and infiltration of GICs. Target therapy of BMP4 signaling target genes may provide a novel strategy for glioma patients.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：癌幹細胞 脳腫瘍 TGF-ファミリーシグナル BMP

1. 研究開始当初の背景

近年、癌幹細胞という腫瘍組織における特定の細胞が転移性の高い癌細胞を生み出すことや、薬剤に強い抵抗性を持つことが明らかになってきている。癌幹細胞の存在が癌の悪性度に密接に関与しているとともに、癌幹細胞を標的とした治療法の開発が重要であることが分かってきた。さまざまな癌において癌幹細胞の役割が注目を集めているが、膠芽腫(glioblastoma)もその一つである。

膠芽腫は脳腫瘍の中でも極めて予後の悪い癌の一つで、1年以内に50%の患者が死亡し、5年生存率は約3%である。膠芽腫に対しては手術以外にも抗がん剤や γ ナイフなどの放射線療法が行われているが、治療効果の劇的な改善は望めないのが現状である。

当研究室の報告により膠芽腫においては Transforming growth factor- (TGF-) が脳腫瘍幹細胞における Sox4 転写因子ならびにその下流の Sox2 の発現を誘導することで幹細胞の形質を維持していることが明らかとなった(Ikushima et al. 2009)。

一方で、TGF- シグナルファミリー因子である BMP (Bone morphogenetic protein) が脳腫瘍幹細胞の維持を抑制するという報告がある(Piccirillo SG. et al. 2006)。しかし、その後は研究が進んでおらず詳細なメカニズムは未だ不明なままであった。BMP による脳腫瘍幹細胞の未分化性を阻害することは報告されていたものの、詳細なメカニズムが明らかになっていないうえ、依然として治療への応用も進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は脳腫瘍幹細胞の未分化性の制御を明らかにすることを目的とした。特に TGF-

ファミリーシグナル因子による脳腫瘍幹細胞の未分化性の制御に焦点を当てて研究を行った。さらに、TGF- ファミリーシグナ

ル因子である Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) による、脳腫瘍幹細胞の未分化性の阻害のメカニズムを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

TGF- ファミリーシグナル因子(TGF-, Activin, BMP2, BMP4 など)が膠芽腫患者由来脳腫瘍幹細胞 (TGS-01) に与える影響を、癌幹細胞マーカーの発現変動や Sphere 形成能に影響を与えるか検討した。

BMP シグナルが脳腫瘍幹細胞 (TGS-01) に与える影響を検討した。BMP4 がいくつかの癌幹細胞マーカーの発現や脳腫瘍幹細胞の未分化性 (Sphere 形成能や細胞形態) への影響を観察した。

マウス頭蓋内移植モデルにおいて、BMP4 処理をした TGS-01 を移植し腫瘍形成能に影響を与えるか検討した。腫瘍形成の観察には、Luciferase を恒常的に発現する TGS-01 を移植することで、マウスを屠殺することなく、腫瘍形成や増大を Luciferin の発光で検出できる in vivo imaging system を用いて観察した。BMPシグナルを増強する目的で、BMPシグナル抑制因子を siRNA でノックダウンし、さらに BMP4 で処理した TGS-01 をヌードマウスに移植し腫瘍形成能を in vivo imaging system を用いて観察した。

BMP シグナルがどのように脳腫瘍幹細胞の未分化性や腫瘍形成能を阻害するかを検討するために、DNA microarray や RNA-seq を行い BMP シグナルの新たな標的因子の同定を行った。

さまざまな癌における予後不良関連因子を簡便に判断できる Prognoscan (<http://www.prognoscan.org>) というデ

ータベースサイトを用いて、DNA microarray や RNA-seq の解析から得られた新たな BMP シグナルの標的因子について、膠芽腫における予後不良因子と関連があるものを絞り込んだ。

DNA microarray や RNA-seq、Prognoscan で解析候補として絞り込まれた新たな BMP シグナルの標的因子について強恒常的に発現させた、もしくはノックダウンさせた脳腫瘍幹細胞を樹立した。

BMP の標的因子を発現させた場合やノックダウンした際の影響を、in vitro においては sphere 形成、および、癌幹細胞マーカーの発現を定量的 PCR 法によって検出した。

4. 研究成果

最初に TGF- β ファミリーシグナル因子 (TGF- β , Activin, BMP2, BMP4 など) が膠芽腫患者由来脳腫瘍幹細胞 (TGS-01) に与える影響を、癌幹細胞マーカーの発現変動や Sphere 形成能について検討した。その結果、BMP2 や BMP4 といった BMP シグナルが癌幹細胞マーカーである CD133 の発現を抑制することが確認できた。次に、BMP シグナルに焦点を当てて、脳腫瘍幹細胞 (TGS-01) に与える影響を検討した。その結果、特に BMP4 が脳腫瘍幹細胞の未分化性やいくつかの癌幹細胞マーカーの発現を強く阻害し、TGF- β とは相反する作用を持つことが確認できた。さらに、マウス頭蓋内移植モデルを用いて、BMP4 処理をした TGS-01 を移植した。しかし、BMP4 処理をした TGS-01 を移植しただけでは無処理と比べ劇的な延命効果は得られなかった。そこで、さらに BMP シグナルを増強する目的で、BMP4 刺激と共に BMP シグナル抑制因子をノックダウンした TGS-01 をマウス頭蓋内に移植した。その結果、マウスの生存率が上昇することが明らか

かとなった。BMP シグナルがどのような因子を介して脳腫瘍幹細胞の未分化性や腫瘍形成能を阻害するかを明らかにするために、BMP4 処理した TGS-01 における DNA microarray や RNA-seq を行った。解析の結果、転写因子、増殖因子、ケモカインなど、様々な癌関連因子や新たな BMP シグナルの標的因子を同定することに成功した。また、がんの予後不良因子であるか評価することができるデータベースウェブサイト (Prognoscan) を用いて、脳腫瘍幹細胞の分化や浸潤性獲得に関わると考えられる数種類の解析候補遺伝子を絞り込んだ。TGS-01 や他の脳腫瘍幹細胞において、同定された標的遺伝子を恒常的に発現させた脳腫瘍幹細胞やノックダウンさせた脳腫瘍幹細胞を樹立し、in vitro における影響を検討した。その結果、BMP シグナルの下流で、いくつかの遺伝子を制御することの有用性を示唆する結果を得た。現在、解析候補となった遺伝子が脳腫瘍に対する新たな分子標的治療のターゲットとなり得るか、引き続き検討を行っている。

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 1 件)

Kimihiko C. Kawabata, Shogo Ehata, Akiyoshi Komuro, Kengo Takeuchi and Kohei Miyazono.

TGF- β -induced apoptosis of B-cell lymphoma Ramos cells through reduction of MS4A1/CD20.

Oncogene. 32 (16): 2096-2106, (2013) 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

Akiyoshi Komuro, Satoshi Sakai, Erna Raja, Yasushi Ino, Tomoki Todo, Nobuhito Saito, Tetsuro Watabe, Caname Iwata, Daizo Koinuma, Kohei Miyazono

「BMP4 suppresses tumorigenic activity of glioma-initiating cells

through loss of stemness properties」
TGF- β ファミリーシグナル 国際共同
研究拠点 第3回国際シンポジウム
2013年10月28日~2013年10月29
日 愛媛

Akiyoshi Komuro, Satoshi Sakai,
Yasushi Ino, Tomoki Todo, Nobuhito
Saito, Tetsuro Watabe, Caname Iwata,
Daizo Koinuma, Kohei Miyazono
「BMP4 suppresses tumorigenic
activity of glioma-initiating cells
through loss of stemness properties」
第86回日本生化学会大会
2013年9月13日 横浜

Akiyoshi Komuro, Hiroaki Ikushima,
Satoshi Sakai, Yasushi Ino, Tomoki
Todo, Nobuhito Saito, Tetsuro Watabe,
Daizo Koinuma, Kohei Miyazono
「BMP4 suppresses tumorigenic
activity of glioma-initiating cells
through loss of stemness properties」
Ninth AACR-Japanese Cancer
Association Joint Conference
2013年2月21日~2013年2月25日
Maui (USA)

Akiyoshi Komuro, Hiroaki Ikushima,
Satoshi Sakai, Yasushi Ino, Tomoki
Todo, Nobuhito Saito, Tetsuro Watabe,
Daizo Koinuma, Kohei Miyazono
「BMP4 suppresses tumorigenic
activity of glioma-initiating cells
through loss of stemness properties」
国際癌化学診療シンポジウム
2012年12月5日 東京

古室 暁義, 生島 弘彬, 稲生 靖, 藤堂
具紀, 渡部 徹郎, 鯉沼 代造, 宮園
浩平
「骨形成因子(BMP)4による膠芽腫腫
瘍形成細胞の治療効果の検討」
第19回BMP研究会
2012年7月22日 東京

古室 暁義, 生島 弘彬, 江幡 正悟, 渡
部 徹郎, 鯉沼 代造, 稲生 靖, 藤堂 具
紀, 宮園 浩平
「Glioma Cancer Initiating Cell を標
的とした TGF- β シグナル阻害剤と
BMP4の併用治療効果の検討」
第16回日本がん分子標的治療学会学術
集会
2012年6月27日~2012年6月29日
福岡

〔図書〕(計 1 件)

古室 暁義, 宮園 浩平.

「治療の分子標的としての TGF- β シグナ
ル」日本臨床 70 巻増刊号 8 (通巻 1031
号) p256-262, 2012 年 査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古室 暁義(AKIYOSHI KOMURO)
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究
員
研究者番号: 50512274

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし