

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830067

研究課題名(和文) 脳腫瘍がん幹細胞の未分化性の維持機構の遮断とその臨床応用

研究課題名(英文) Inhibition of the maintenance of stemness of glioma initiating cells for clinical applications

研究代表者

古室 暁義 (KOMURO, Akiyoshi)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：50512274

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)：我々は難治性癌である膠芽腫において骨形成因子BMP4に加えてBMPシグナル抑制因子 Smad6の特異的siRNA (siSmad6)でBMPシグナルをさらに増強したところ、脳腫瘍がん幹細胞の未分化性を顕著に阻害し、腫瘍形成能を劇的に抑制することを見出した。さらに、BMP4とsiSmad6によって発現が変動する標的遺伝子の中で脳腫瘍がん幹細胞の未分化性維持の阻害に関与が予測される因子を多数同定した。また、今回の研究においてRNA-Seqを用いたことによって、脳腫瘍がん幹細胞内でいくつかの融合遺伝子を発見し、このうちの1つにおいて、トランスフォーム活性や腫瘍形成能を有することが分かった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to enhance Bone Morphogenetic Protein (BMP) signal in glioma initiating-cells (GICs) by using of siRNA for Smad6 which is the intracellular inhibitor of BMP signal, we observed that BMP4+siSmad6 dramatically inhibited the maintenance of stemness of GICs. Furthermore, we identified several target genes of BMP4+siSmad6 that had the inhibitory effects of the maintenance of stemness of GICs. Additionally, we discovered several novel fusion genes in GICs by using RNA-Seq of this study, and we found that one of fusion genes identified had the transforming potential and high tumor-forming capacity.

研究分野：腫瘍生物学、分子生物学

キーワード：がん幹細胞 脳腫瘍 BMP 融合遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は脳腫瘍の中でも極めて予後の悪いがんの一つで、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 $\gamma$ 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。ゆえにより効果的な治療法の開発が必要となっている。

近年、難治性のがんや転移性の高いがんを生み出す要因として、がん幹細胞という存在の寄与が高いことが分かってきた。特に、がん幹細胞は薬剤耐性能が強いため、難治性である原因になっている。このため、がん幹細胞を標的とした効果的な治療薬の開発が急務となっている。

膠芽腫においても脳腫瘍幹細胞の存在が難治性の原因となっていることが報告されている。さらに、脳腫瘍幹細胞の未分化性の維持に Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) が関与していることが分かった。これに対して、TGF- $\beta$  ファミリーの一種である骨形成因子 Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) が脳腫瘍幹細胞の未分化性維持を阻害することで治療効果を発揮したという報告が、近年発表された。しかし、詳細な作用メカニズムは未だ不明なままであった。BMPシグナルによって脳腫瘍幹細胞の分化を引き起こし、腫瘍形成能を阻害するメカニズムを明らかにし、より効果的な BMPシグナルの導入方法を開発することが、新たな膠芽腫の治療法につながると期待される。

がんにおいて、転座や挿入、逆位といった染色体異常が起きることで、正常では存在しない融合遺伝子が形成され、異常なたんぱく質を発現する場合がある。しかし、大抵の場合は、異常なたんぱく質として、機能的に作用しなかったり、分解されたりすることで、直接的にがん化には結びつかない場合が多い。しかし、まれに恒常活性化型のキナーゼ

や転写因子が発現することで、細胞の増殖や生存に影響を与え、異常な増殖を引き起こすことでがん化に結びつく場合がある。

最近、米国の NIH で膠芽腫患者検体の大規模な RNA-Seq データ (The Cancer Genome Atlas: TCGA) を使用した染色体異常についてのスクリーニングが行われ、多数の融合遺伝子が発見された。そのうちの数種類において、腫瘍形成や腫瘍増殖に影響を与える遺伝子変異が起きていることが明らかになったが、すべての融合遺伝子について、がん化につながる変異なのかまでは明らかにはされていない。この報告以外にも膠芽腫における新規融合遺伝子の発見や融合遺伝子の発生から生じる新たながん化のメカニズムが明らかになる可能性がある。

## 2. 研究の目的

最近の報告で、骨形成因子 Bone Morphogenetic Protein (BMP)シグナルが脳腫瘍幹細胞の未分化性を阻害し、膠芽腫の悪性を抑制することが報告された。本研究は、脳腫瘍幹細胞 (TGS-01)において、BMP4に加えてBMPシグナル抑制因子である Smad6 を特異的 siRNA (siSmad6)を用いてノックダウンすることで、BMPシグナルをさらに増強することが可能かを試みるとともに、BMP4単独よりもBMP4+siSmad6で脳腫瘍幹細胞の未分化性を顕著に阻害し、腫瘍形成能を劇的に抑制することが可能か検討することを目的とした。さらに、BMP4だけでなく、BMP4+siSmad6で発現が変動する標的遺伝子の中で脳腫瘍幹細胞の未分化性維持の阻害に関与しているものを同定することを目的とした。本研究で得られた成果は神経幹細胞維持におけるBMPシグナルの役割という基礎的知見のみならず、癌幹細胞を標的とした膠芽腫の新たな治療法の開発につながる研究となることが期待された。

また、今回、脳腫瘍幹細胞をサンプルとし

て RNA-Seq を行ったことで、染色体異常に伴って発生した融合遺伝子などの探索が可能となった。これにより、膠芽腫の元となる遺伝子変異や欠損、新規の融合遺伝子などを探索することが可能となるだけでなく、脳腫瘍幹細胞の発生に寄与する新たな遺伝子変異を報告できることも期待された。本研究で見つかった融合遺伝子の脳腫瘍幹細胞に与える影響を観察するとともに、その悪性化を伴うメカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究で見つかった融合遺伝子が原因となってがんの悪性化を引き起こすメカニズムが明らかになった場合、この機能を抑制する阻害剤を選定し、*in vitro* および *in vivo* の両方から、腫瘍形成能や腫瘍増殖などを抑制するか検討することにした。本研究で明らかになった融合遺伝子を発現する膠芽腫に対しては、今回効果が確認できた阻害剤が膠芽腫や脳腫瘍幹細胞に対する新たな治療法として提示できる可能性があった。

### 3 . 研究の方法

脳腫瘍幹細胞 TGS-01 において、BMP4 と BMP シグナルの細胞内抑制因子である Smad6 に対する特異的な siRNA (siSmad6) を用いて BMP シグナルが増強するか、Id1 の発現や BMP responsible element を用いたレポーターアッセイによって評価した。

BMP4 単独よりも BMP4+siSmad6 によって、TGS-01 の未分化性の阻害や腫瘍増殖の抑制が増強するか、癌幹細胞マーカーの発現や Sphere 形成能や細胞形態など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+siSmad6 を処理した TGS-01 を移植し腫瘍形成能に影響を与えるか検討した。腫瘍形成や腫瘍増殖の観察には、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 を用いた。

BMP4+siSmad6 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、脳腫瘍幹細胞の未分化性や腫瘍形成能を阻害する因子の同定を行った。

本研究で得られた RNA-seq のデータをもとに融合遺伝子の探索解析によって、脳腫瘍幹細胞 TGS-01 内で発現する新規融合遺伝子を探索した。

同定した新規融合遺伝子がトランスフォーム活性や腫瘍形成能を持つか明らかにするために、NIH3T3 細胞に強制発現させて細胞形態や増殖の様子を観察するとともに、ヌードマウスの皮下に移植して腫瘍を形成するか検討を行った。本研究で見つかった新規融合遺伝子をヒト膠芽腫細胞 U87-MG に安定発現させた細胞株を樹立し、細胞内シグナルへの影響を Western Blotting などで検討した。

今回の融合遺伝子を安定的に発現する U87-MG を頭蓋内同所移植モデルとしてヌードマウスに移植し *in vivo* imaging system を用いて腫瘍増殖を観察した。

今回見つかった融合遺伝子に対するキナーゼ阻害剤を予測して選び、TGS-01 の sphere formation への影響を調べた。TGS-01 を用いたマウス頭蓋内同所移植モデルに対して、で選定したキナーゼ阻害剤を用いることで治療効果が得られるか *in vivo* imaging system と生存曲線で評価した。

#### 4. 研究成果

これまでも骨形成因子 Bone Morphogenetic Protein (BMP)シグナルが脳腫瘍幹細胞の未分化性を阻害し、腫瘍増殖を抑制するとの報告があった。我々も同様な結果を脳腫瘍幹細胞 TGS-01 において観察していたが、今回、我々はより強く BMP シグナルを導入することが可能か検討したところ、BMP4 に加えて BMP シグナル抑制因子 Smad6 の特異的 siRNA (siSmad6) を TGS-01 に作用させることで BMP シグナルを増強することに成功した。この時、BMP4 単独よりも BMP4+siSmad6 の方が TGS-01 の未分化性を顕著に阻害し、腫瘍形成能を劇的に抑制することを見出した。Microarray や RNA-seq を用いて、BMP4 と siSmad6 によって発現が変動する標的遺伝子の中で脳腫瘍幹細胞の未分化性維持の阻害に関与が予測される因子を多数同定した。引き続き、その阻害メカニズムを転写因子や Hedgehog シグナル関連因子などに注目しながら明らかにすることを進めている。

この他に、今回の研究で RNA-Seq を用いたことで、脳腫瘍幹細胞内でいくつかの融合遺伝子を発見することに成功した。そのうちの1つの融合遺伝子に着目し、機能解析や腫瘍形成への関与について調べた。その結果、この融合遺伝子を強制的に発現すると NIH3T3 細胞をトランスフォームし腫瘍形成能を獲得することが分かった。さらにヒト膠芽腫細胞 U87-MG にこの融合遺伝子を過剰発現させると腫瘍形成能や腫瘍増殖が増強した。また、この融合遺伝子は自身を恒常的にリン酸化しているとともに、下流の細胞内シグナル伝達因子も活性化していることが分かった。本研究で見つかった融合遺伝子に対するキナーゼ阻害剤を予測して、TGS-01 の sphere formation への影響を調べたところ、優位に抑制することがわかった。さらに TGS-01 のマウス頭蓋内同所移植モデ

ルと in vivo imaging system を用いて、このキナーゼ阻害剤を投与したところ、TGS-01 の腫瘍増殖を抑制しマウスの生存を延長することが分かった。

本研究で得られた成果は膠芽腫の新たな治療法の開発への基礎的な研究となるとともに、今回発見した融合遺伝子による癌の発生と増殖のメカニズムを明らかにした。また、この融合遺伝子を発現するがんには、今回利用した阻害剤が治療効果を生む可能性があるという知見として重要な研究となった。

#### 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)

〔学会発表〕(計 2 件)

古室 暁義, 岩田 要, 曾田 学, 磯谷 一暢, 鈴木 啓道, Melissa Ranjit, 稲生 靖, 藤堂 具紀, 油谷 浩幸, 夏目 敦至, 武笠 晃丈, 斉藤 延人, 間野 博行, 宮園 浩平, 鯉沼 代造

「膠芽腫における新規融合遺伝子 HMGA2-EGFR の同定」

第 38 回 分子生物学会

2015 年 12 月 2 日, 神戸国際展示場 (神戸市)

Akiyoshi Komuro, Caname Iwata, Manabu Soda, Kazunobu Isogaya, Yasushi Ino, Tomoki Todo, Hiroyuki Aburatani, Atsushi Natsume, Akitake Mukasa, Nobuhito Saito, Hiroyuki Mano, Kohei Miyazono, Daizo Koinuma

「Identification of a novel fusion gene, HMGA2-EGFR in glioblastoma」

Joint international symposium on TGF- family and cancer, Signal network in tumor microenvironment

2015 年 1 月 12 日, つくば国際会議場 (つくば市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

古室 暁義(KOMURO, Akiyoshi)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：50512274

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし