

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19980

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞を標的としたNotchシグナル阻害による新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy with inhibition of Notch signaling for glioma stem cells

研究代表者

齋藤 紀彦 (SAITO, Norihiko)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：60459766

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)：近年グリオーマ幹細胞におけるNotchシグナル発現が報告されている。今回、グリオーマ幹細胞に対するNotchシグナル阻害効果に関する検討を行った。-セクレターゼ阻害剤の薬剤感受性試験を行い、高感受性群を抽出した。高感受性群に特徴的な17遺伝子の活性化が同定された。またNotchシグナル阻害により、グリオーマ幹細胞性維持が阻害されることが明らかになった。

本研究によりNotchシグナルが活性化している神経膠芽腫が-セクレターゼ阻害剤に高い感受性を示す可能性を示唆された。Notchシグナルは神経膠芽腫における新たな分子標的治療のターゲットの有力な候補の一つになり得るものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The Notch signaling is an evolutionarily conserved pathway that plays an important role in multiple cellular processes. We investigated the effects of Notch inhibition in glioma stem cell (GSC) populations using secretase inhibitors. Drug cytotoxicity testing showed differential growth responses to the inhibitors. Responder GSCs had an enriched proneural gene signature in comparison to nonresponders. Analysis of TCGA dataset identified a group (43.9%) of tumors with proneural signature showing high Notch pathway activation. Inhibition of Notch pathway by secretase inhibitor treatment attenuated proliferation and self-renewal of responder GSCs and induces both neuronal and astrocytic differentiation. Our results suggest that proneural GBM characterized by high Notch pathway activation may exhibit greater sensitivity to secretase inhibitor treatment, holding a promise to improve the efficiency of current glioma therapy.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経膠腫 グリオーマ幹細胞 神経膠芽腫 Notch 新規治療 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫は化学療法と放射線療法のどちらに対しても強い抵抗性を示し、最も予後不良な脳腫瘍である。近年、グリオーマ幹細胞の存在が証明され、腫瘍再発や治療抵抗性の重要な要因と考えられている。このような背景のもと、我々はグリオーマ幹細胞研究が治療抵抗性克服に必須であると考え、グリオーマ幹細胞に対する新規分子標的治療の研究開発に取り組んできた。

The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトは神経膠芽腫を Neural, Proneural, Classical, Mesenchymal の4つの分子生物学的サブタイプに分類し、それぞれに特徴的な遺伝子異常、シグナル伝達系の活性化などが明らかにした。我々はこのデータをもとに、グリオーマ幹細胞に対する分子標的治療の新たな標的になり得るシグナル伝達系の検討を行ってきた。その中の一つである Notch シグナルは proneural type の特徴的なシグナル伝達系であり、グリオーマ幹細胞において細胞増殖、幹細胞能維持などに重要な役割を果たしていることが明らかにされている。我々はヒト由来グリオーマ幹細胞 25 株を用いて遺伝子プロファイル解析を行い、TCGA データによる膠芽腫のサブタイプに極めて類似した4つのサブタイプに分類し、それぞれ Neural, Proneural, Classical, Mesenchymal と名付けた。この結果の中で、Notch シグナルが proneural type で特異的に活性化していることを見出した。代表者らはこのデータより Notch シグナルの治療標的としての可能性を見出し、グリオーマ幹細胞に Notch 阻害薬を投与した所、proneural type のグリオーマ幹細胞のみ Notch 阻害薬によって抗腫瘍効果が得られることを明らかにした (Saito et al. Stem Cells 2014)。

以上より Notch シグナルは分子標的治療の新しいターゲットとなり得るが、すべてのグリオーマ幹細胞に対して有効であるわけではないと推測し、さらなる検討が必要であると考えた。我々が所有するグリオーマ幹細胞株は 50 株まで増えており、この豊富な研究材料を用いて Notch シグナル活性化の頻度や Notch 関連遺伝子異常などを含めた詳細な検討を行い、グリオーマ幹細胞を治療標的とした治療抵抗性克服への足がかりをつかみたい。

## 2. 研究の目的

本研究では、グリオーマ幹細胞を標的とした Notch シグナル阻害薬による新規分子標的治療の臨床応用の可能性を検討する。まずグリオーマ幹細胞における Notch シグナルの機能を明らかにし、グリオーマ幹細胞の分子生物学的特徴を解析する。次にグリオーマ幹細胞に対する Notch シグナル阻害薬の抗腫瘍効果を明らかにし、さらにバイオフィーマティクス的手法で治療反応群に特徴的な遺伝子の抽出を目的とした。

本研究により遺伝子プロファイルに基づく Notch 阻害有効症例の選択が可能になり、新規分子標的治療の臨床応用への展開が期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 研究試薬：本研究ではグリオーマ幹細胞に Notch 阻害薬として3種類のセクレターゼ阻害薬 (DAPT, BMS-708163, R04929097) を使用した。薬剤感受性試験の試薬として Cell Titer assay (Promega) を使用した。

(2) セクレターゼ阻害薬に対する薬剤感受性試験：グリオーマ幹細胞を様々な濃度のセクレターゼ阻害薬投与下で 72 時間培養し、薬剤感受性を評価する。

(3) セクレターゼ阻害薬による幹細胞性維持阻害作用の解析：グリオーマ幹細胞は培養条件下において neurosphere を形成する。これが幹細胞の特徴の一つとされており、幹細胞性維持の評価として使われる。本研究ではセクレターゼ阻害薬によって neurosphere 形成能が阻害されるかを観察し、Notch シグナルの幹細胞性維持に対する機能を明らかにする。

(4) セクレターゼ阻害薬による分化誘導作用の解析：グリオーマ幹細胞をセクレターゼ阻害薬投与下で 5 日間培養し、その後 Nestin, GFAP, TuJ-1, CNPase の蛍光免疫染色を行う。通常のグリオーマ幹細胞は Nestin のみが陽性を示す。セクレターゼ阻害薬投与による各マーカーの染色性の変化を観察し、neuron, astrocyte, oligodendrocyte などの方向に分化しているのかを検証する。

(5) Notch ノックダウン細胞株の樹立：グリオーマ幹細胞に Lentivirus による shRNA の手法で Notch 発現を選択的に抑制する Notch ノックダウン細胞株の樹立

グリオーマ幹細胞に Lentivirus による shRNA の手法で Notch 発現を選択的に抑制する

(6) Notch ノックダウングリオーマ幹細胞の幹細胞性維持能の解析：Notch ノックダウングリオーマ幹細胞の neurosphere 形成能を観察する。

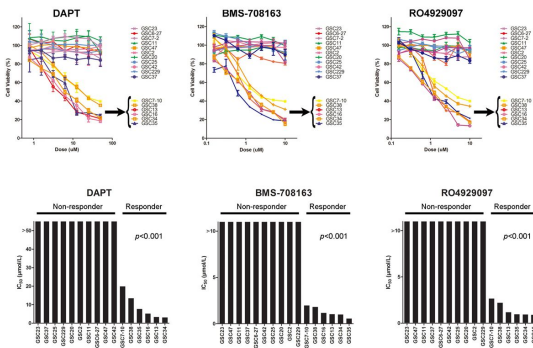
(7) Notch 発現抑制による分化誘導の解析：Notch ノックダウングリオーマ幹細胞に対して、Nestin, GFAP, TuJ-1, CNPase の蛍光免疫染色を行いどの方向に分化しているのかを検証する。

(8) グリオーマ幹細胞の遺伝子発現プロファイル解析：マイクロアレイによるグリオーマ幹細胞の遺伝子発現プロファイル解析を行い、セクレターゼ阻害薬に治療反応を示す細胞における特徴的な遺伝子群を抽出する。

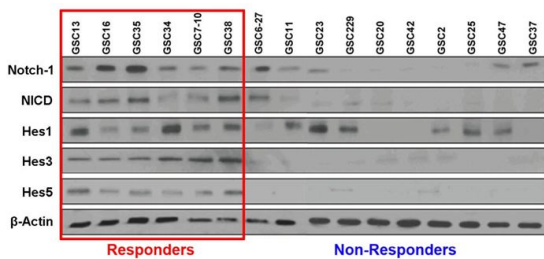
## 4. 研究成果

(1) グリオーマ幹細胞に Notch 阻害薬として3種類のセクレターゼ阻害薬 (DAPT, BMS-708163, R04929097) を 72 時間投与し薬剤感受性試験を行ったところ、6 細胞株 (治

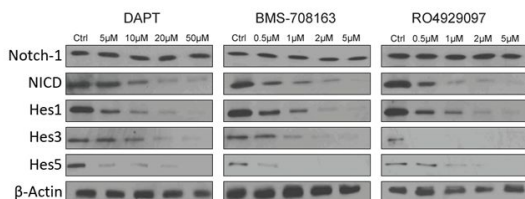
療反応群)が3種類のセクレターゼ阻害薬で増殖抑制を示した。



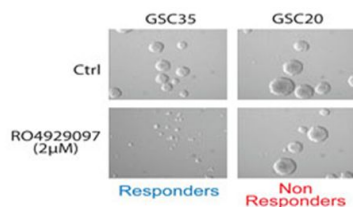
(2) 治療反応群と治療抵抗群に対して Notch シグナル発現解析を行ったところ、治療反応群において Notch シグナルが活性化していることが明らかになった。



(3) また治療反応群においては濃度依存性に Notch と治療抵抗群に対して Notch シグナル阻害作用が増強されることが明らかになった。

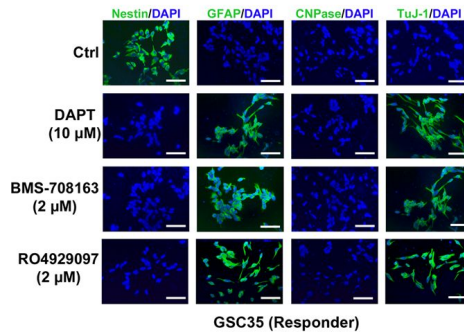


(4) Sphere assay を行った所、セクレターゼ阻害薬投与により、primary neurosphere, secondary neurosphere とともに阻害されることが明らかになった。

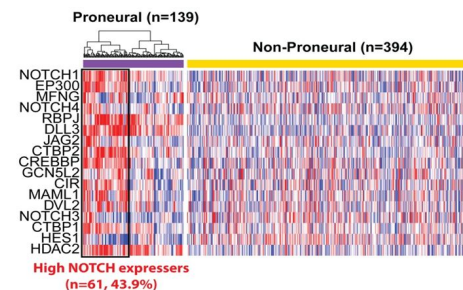
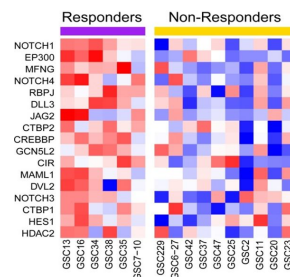


(5) セクレターゼ阻害薬による分化誘導作用の解析を行うべく、グリオーマ幹細胞をセクレターゼ阻害薬投与下で5日間培養したところ、Nestin の発現低下を示し、GFAP, TuJ-1 の発現上昇を示すことが示された。

Astrocyte へ分化誘導することが示唆された。



(6) 治療反応群に特徴的な遺伝子の発現解析を行った所、17 遺伝子が抽出された。それらはすべて proneural signature を示す遺伝子であった。それらを TCGA データに適応させると proneural type の 43.9% でこの遺伝子群が高発現しており、これらの症例はセクレターゼ阻害薬が有効である可能性が示唆された。



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)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Saito N (計 10 名第 1 番目), Aoki K, et al. Bevacizumab-induced normalization of tumor vasculature in glioblastoma. *Neuro Oncol* 18 Supplement6, DOI: <https://doi.org/10.1093/neuonc/now212.059>, 2016 査読有.
2. Saito N (計 11 名第 1 番目), Aoki K, et al. A proneural signature profile predicts resistance to bevacizumab therapy in glioblastoma. *Neuro Oncol* 17 Supplement5, DOI:

- https://doi.org/10.1093/neuonc/nov219.15.v127, 2015 査読有.
3. Saito N (計 19 名第 1 番目), Aoki K, et al. Effect of Notch expression in glioma stem cells on therapeutic response to chemo-radiotherapy in recurrent glioblastoma. Brain tumor pathology 32 (3) :176 -183 , 2015. 査読有.
  4. Wu S, Saito N (計 4 名第 2 番目), et al. Targeting glioma stem cells for therapy: Perspectives and challenges. Journal of Cell Science & Therapy 6 (Issue3), 2015. 査読有  
〔学会発表〕(計 7 件)
  1. Saito N (計 10 名第 1 番目), Aoki K, et al. Bevacizumab-induced normalization of tumor vasculature in glioblastoma. 21st Annual Meeting and Education Day of The Society for Neuro-Oncology, Arizona, USA, 2016/11/19
  2. Saito N (計 10 名第 1 番目) Aoki K, et al. Levetiracetam downregulates O6-Methylguanine DNA methyltransferase expression and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells. 13th Asian Society for Neuro-Oncology Meeting, Sydney, Australia, 2016/09/12
  3. 齋藤紀彦 (計 10 名第 1 番目), 青木和哉: 神経膠芽腫に対するベバシズマブ療法による腫瘍血管正常化作用の検討. 第 34 回日本脳腫瘍病理学会学術集会、東京コンファレンスセンター有明(東京都・江東区) 2016/05/28
  4. Saito N (計 10 名第 1 番目), Aoki K, et al. Molecular and lineage analysis of Glioblastoma Stem cells identifies clinically relevant models of glioblastoma. The 4th Tokyo Shanghai Friendship Neurosurgical Forum, Hotel Grand Palace (Tokyo, Chiyoda-ku) , 2016/03/25
  5. 齋藤紀彦 (計 11 名第 1 番目), 青木和哉: グリオーマ幹細胞における Olig2 の機能解析と分子的治療への応用. 第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会, グランドプリンスホテル京都(京都府,京都市) 2015/12/7
  6. Saito N (計 10 名第 1 番目), Aoki K, et al. A proneural signature profile predicts resistance to bevacizumab therapy in glioblastoma. 20th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, San Antonio, USA, 2015/11/21
  7. 齋藤紀彦 (計 13 名第 1 番目), 青木和哉: 神経膠芽腫における Notch シグナル発現解析. 日本脳神経外科学会第 74 回

学術総会, ロイトン札幌(北海道,札幌市), 2015/10/14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

齋藤 紀彦 (SAITO, Norihiko)  
東邦大学・医学部・講師  
研究者番号: 60459766

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

( )