

令和元年6月24日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10771

研究課題名(和文) エピジェネティクス制御による、膠芽腫の幹細胞化を阻止する新治療戦略開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategies to prevent stem cell formation of glioblastoma by epigenetics control

研究代表者

新田 雅之(Nitta, Masayuki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70588269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の成果として以下の結果が得られた。膠芽腫において、再発時と初発時では再発時においてcMycやSox2といった幹細胞マーカーの発現がより上昇していた。このことは腫瘍の再発には腫瘍細胞の幹細胞化が関わっていることを示唆した。次に腫瘍組織からの培養細胞を確立し、cMyc発現の高い細胞株を用いてcMyc発現を抑制させる薬剤と、DNA損傷抗がん剤を投与したところ、単独投与に対して抗腫瘍効果を示した。これらの知見は、膠芽腫において、腫瘍の幹細胞化を抑制する治療法の基礎となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

致死性が高く、有効な治療法が存在しない膠芽腫は平均生存期間が2年に満たない非常に悪性度の高い腫瘍で、腫瘍の中に存在する幹細胞が治療抵抗性の原因の一つと考えられている。今回の成果は、腫瘍の幹細胞化を抑制することを用いた新たな治療法の開発の基礎となったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The following results were obtained as a result of this research.

In glioblastoma, the expression of stem cell markers such as cMyc and Sox2 was higher at the time of relapse than at the time of relapse. This suggested that tumor recurrence is associated with stem cell formation of tumor cells. Next, when cultured cells from tumor tissue were established, and a drug that suppresses cMyc expression was administered using a cell line with high cMyc expression, and a DNA-damaging anticancer agent, it showed an antitumor effect against single drug administration. These findings form the basis for a treatment that suppresses stem cell formation in glioblastoma.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma stem cell cMyc anti tumor effect

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

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は原発性脳腫瘍の中で最も悪性で、手術を含めた集学的治療行っても予後は極めて不良で、新たな治療法の開発が望まれている。当施設では2000年から術中MRIを用いた情報誘導手術室を構築し、膠芽腫は手術で主病変を全摘出しても周囲に浸潤した残存腫瘍細胞から高頻度に再発するため、その機序の解明が極めて重要である。

最近、がん組織の中に幹細胞の性質および腫瘍形成能を有する腫瘍幹細胞の存在が明らかになり、膠芽腫でも幹細胞の性質を有する少数の細胞の存在が示された。腫瘍の再発は、腫瘍幹細胞から生じると考えられているが、その病態はまだ解明されていない。最近の研究では、がん組織における腫瘍幹細胞は、正常幹細胞から発生する場合と、iPS細胞形成過程で見られるように、分化した腫瘍細胞がリプログラミングによって幹細胞の性質を獲得する可能性がある事が示されており、その機序としてゲノム異常を伴わないエピジェネティックな遺伝子制御の関与が示唆されている。最近我々は、膠芽腫細胞およびマウスモデルを用いて、1)分化した膠芽腫細胞が腫瘍幹細胞の性質を獲得できること、2)それはMYC癌遺伝子の、ゲノム異常を伴わないエピジェネティックな発現上昇によって生じること、3)MYC発現制御は、ヒストン脱メチル化酵素であるLSD1によるヒストン修飾によって制御される事、を見出した。

この事は、手術による腫瘍摘出後の周囲浸潤細胞からの再発に、エピジェネティックなMYC発現上昇による腫瘍の幹細胞化が関わっている事を示唆する。

### 2. 研究の目的

これら基礎研究で得られた結果を、実際のヒト膠芽腫で証明する事、および新規治療として、エピジェネティクス制御によるMYC発現上昇を抑える事により、膠芽腫細胞の幹細胞化を阻止し、腫瘍再発を防ぐ治療を開発し、臨床応用の構築を目指した。

### 3. 研究の方法

- ・ 膠芽腫患者の手術摘出組織より初代継代細胞株の確立

- ・ 膠芽腫症例で初発と再発で手術を行った組織における幹細胞マーカー発現の比較

- ・ 確立した初代継代細胞株における幹細胞マーカー発現の比較

- ・ 確立した細胞株を用いてcMyc発現を抑制することで抗腫瘍効果が得られるかの検討

- ・ 細胞株を用いてマウス脳腫瘍モデルを確立し、in vitroで抗腫瘍効果が得られた薬剤を用いた動物実験

### 4. 研究成果

研究計画に従って、H28年度では、まず手術で摘出した膠芽腫腫瘍から初代継代細胞株の確立を行い、それぞれ接着培地での培養(分化腫瘍細胞)と浮遊培地(neuro sphere)での培養(幹細胞)を10の腫瘍にて確立することができた。

それらの培養細胞株において、接着培地での培養条件でcMyc発現が高い腫瘍ほどneuro sphereとして増殖できる確率が高かった。またneuro sphere状態の方が、接着状態と比較してcMycの発現が上昇していた。

また、膠芽腫症例で、初発時と再発時に摘出術を行い初発腫瘍と再発腫瘍組織が得られた症例におけるcMyc、Sox2の発現を免疫染色にて調べたところ、再発腫瘍において、cMycおよびSox2の発現が上昇している傾向が見られた。また、初発および再発膠芽腫において、cMycやSox2の発現が高い症例の方が予後が悪い傾向を示した。しかしながら現段階では観察期間が短いため、今後さらに観察期間を延ばして予後との相関を検討する予定である。

続いて、cMyc発現の高い細胞株においてcMyc発現を抑制する薬剤にてcMyc発現を低下させた上で、DNA損傷薬剤を投与した場合に抗腫瘍効果が高まるかを検討した。

cMyc発現の高い細胞株にcMyc阻害剤を単独で投与しても明らかな腫瘍細胞死は得られなかった。しかしながら、DNA損傷薬剤を加えると、cMyc阻害剤投与群において、高い増殖抑制効果が得られた。

次に、これらの培養細胞株を用いたマウス脳内膠芽腫モデルの作成を試みた。しかしながら、すべての培養細胞株で脳腫瘍モデルを確率することはできなかった。Neuro sphereで培養できた細胞株では脳内への投与で腫瘍を形成する場合もあったが、その確率が低く、また腫瘍の増殖もマウス間で不均一であったため、抗腫瘍効果を調べるための動物実験を行うには不十分と判断した。今後は、他の研究機関からすでに確立されたマウス膠芽腫モデル用の細胞株を入手して、動物実験を行うことを検討している。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

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

取得状況（計 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：増井憲太

ローマ字氏名：Masui Kenta

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：第1病理学

職名：助教

研究者番号（8桁）：60747682

研究分担者氏名：前林勝也

ローマ字氏名：Maebayashi Katsuya

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：放射線腫瘍学

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60332350

研究分担者氏名：赤川浩之

ローマ字氏名：Akagawa Hiroyuki

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：統合医科学研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60398807

研究分担者氏名：丸山隆志

ローマ字氏名：Maruyama Takashi

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：脳神経外科

職名：講師

研究者番号（8桁）：40301543

研究分担者氏名：都築俊介

ローマ字氏名：Tsuzuki Shunsuke

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：脳神経外科

職名：助教

研究者番号（8桁）：90746794

研究分担者氏名：安田崇之

ローマ字氏名：Yasuda Takayuki

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：脳神経外科

職名：助教

研究者番号（8桁）：70725366

(2)研究協力者

研究協力者氏名：村垣善浩

ローマ字氏名：Muragaki Yoshihiro

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。