

令和元年6月13日現在

機関番号：16401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06920

研究課題名(和文) 膠芽腫におけるがん精巢抗原遺伝子を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Development of CTA gene-targeted therapy in malignant glioma

研究代表者

福田 仁 (FUKUDA, Hitoshi)

高知大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：80807917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫に含まれる幹細胞は、がん精巢抗原遺伝子を高発現している。がん精巢抗原遺伝子を標的とした治療法を開発するために、膠芽腫組織から腫瘍幹細胞を含むスフェロイド培養細胞株を樹立し、IDH変異や1p19q欠失等の遺伝型を決定した。膠芽腫組織や幹細胞における発現頻度が高い、または、発現量が膠芽腫患者の予後に相関する67のがん精巢抗原遺伝子に関してsiRNAを用いて発現抑制することで増殖を抑制する遺伝子を探索した。そのうち15のがん精巢抗原遺伝子のノックダウンにより細胞増殖を阻害することが観察された。これらの結果から、がん精巢抗原遺伝子の一部は、膠芽腫細胞の増殖を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は、精力的な新規治療法の開発にも拘わらず、長い間、顕著な治療成績の向上が得られていない原発性脳腫瘍であり、平均余命は僅か1年数ヶ月である。この腫瘍の治療抵抗性は、放射線治療や化学療法への感受性の低さ、浸潤能の高さに起因している。本課題では、膠芽腫の幹細胞において高発現するがん精巢抗原遺伝子細胞増殖の制御に関わることを示した。膠芽腫細胞株において、その発現抑制により、細胞増殖を阻害するがん精巢抗原遺伝子を同定し、治療標的分子として有用である可能性を示すことが出来た。今後、この結果は、新たな脳腫瘍に関連する分子や経路の解析や同定に貢献し、根治を目指した遺伝子治療への応用も見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Glioma stem cells (GSCs) are highly expressing cancer testis antigen (CTA) genes. To develop the CTA gene-targeted therapy for malignant glioma, we established the spheroid culture containing GSCs from glioma tissues and performed the genotyping including IDH mutation and 1p19q co-deletion. Among 67 CTA genes highly expressing in glioma tissue and GSCs or having prognostic correlation with their expression, the CTA genes were screened by siRNA-mediated silencing for an affect on cell growth. Growth inhibitions were found in 15 CTA genes by knockdown. This result suggests that a part of CTA gene family regulates cell growth in malignant glioma.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 がん精巢抗原遺伝子

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、精力的な新規治療法の開発にも拘わらず、長い間、顕著な治療成績の向上が得られていない原発性脳腫瘍であり、平均余命は僅か1年数ヶ月である。この腫瘍の治療抵抗性は、放射線治療や化学療法への感受性の低さ、浸潤能の高さに起因している。悪性脳腫瘍には、造腫瘍性に富む幹細胞が含まれ、この細胞が悪性度の指標となる多くの性質を保持していることから治療標的として注目されている。

がんワクチンの標的分子として知られているがん精巢抗原遺伝子は、約200程度が同定されているが、そのがんや生殖細胞系列に特異的に発現する制御機構や機能の大部分は未知である。この遺伝子群は、殆どの正常組織で発現が無いために安全性の高い治療法の開発にとって有用な分子である。これまでに当科では、膠芽腫細胞株や膠芽腫患者摘出組織から分離培養した幹細胞において、がん精巢抗原遺伝子[1]や薬剤耐性遺伝子[2]、転移浸潤関連遺伝子が高発現することを報告している。がん精巢遺伝子を治療標的分子として評価するために膠芽腫幹細胞におけるがん精巢抗原遺伝子の機能や役割を明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

膠芽腫細胞や幹細胞において、増殖を制御するがん精巢抗原遺伝子を同定し、膠芽腫のサブタイプとその発現や機能の関連性について検討する。

3. 研究の方法

従来から用いられている膠芽腫細胞株に加え、膠芽腫患者由来の幹細胞株をスフェア培養により樹立した。シークエンシングやMLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)法によりゲノタイピングを行い、IDH や TERT プロモーターの変異、1p19q 共欠失を、MS(Methylation specific)-PCR 法によりMGMT プロモーターのメチル化を解析した。脳腫瘍のデータベースである REMBRANDT(REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa, <http://www.betastasis.com/glioma/rembrandt/>) を用いて候補遺伝子の抽出を行った。膠芽腫細胞や膠芽腫幹細胞において、siRNA のミニライブラリーを用いて67のがん精巢抗原遺伝子をノックダウンし、WST-8 アッセイにより細胞増殖の変化を観察した。

4. 研究成果

がん精巢抗原遺伝子のデータベース(CTDatabase, <http://www.cta.lncc.br>) に登録されている全遺伝子に関して、REMBRANDTを用いて膠芽腫患者の予後と相関性のある遺伝子を抽出した。それにこれまでに同定した膠芽腫幹細胞で発現の高い遺伝子を合わせた計67遺伝子に関してsiRNAのミニライブラリーを構築した。膠芽腫細胞株や幹細胞株にsiRNAによりノックダウンすることで15の遺伝子(CTAG1B、CTAG2、FATE1、FBX039、KIAA0100、MAGED1、PAGE1、SPAG4、SPEF2、SSX1、SSX8、TAF7L、TDRD6、TRO、TSGA10)に関して細胞増殖の阻害が観察された。このうちCTAG1B、CTAG2、FATE1、PAGE1、TAF7L、TSGA10では、複数の細胞において細胞増殖が阻害された。これらの多くは、発現様式について報告されているだけで機能に関しては未知である。CTAG1Bは、当科が膠芽腫幹細胞で高頻度に発現することを報告した遺伝子である。膠芽腫患者体内でこの遺伝子産物に対するT細胞の反応性が報告されたことから免疫療法の標的分子として注目されている。一方、当初の予想に反して、ノックダウンすることで増殖が亢進する遺伝子も一部、同定された。理由は不明確であるが、増殖を抑制し未分化に保つことで幹細胞性に関わるがん精巢抗原遺伝子

である可能性が考えられる。情報伝達経路を調べることで幹細胞の維持におけるこれらの遺伝子の役割が明らかにされるかもしれない。

膠芽腫患者組織から樹立した6つの幹細胞と3つの細胞株のゲノタイピングを行った。IDHや1p19qに変異欠失がある細胞は無かった。pTERTでは、膠芽腫細胞株においてc.-124C>Tまたは、c.-146C>Tの変異、rs2853669のSNPが検出された。サンプル数が少ないためか、これらのゲノタイプとがん精巢抗原遺伝子の発現やノックダウンによる増殖抑制効果との関連性は見られなかった。

本課題において、膠芽腫または膠芽腫幹細胞に対して、siRNAを用いた発現阻害により増殖抑制を示すがん精巢抗原遺伝子を同定することが出来た。この現象を詳細に解析し、これらのがん精巢抗原遺伝子の増殖制御機構や幹細胞性との関わりを明らかにすることがさらに必要である。一方、これらの遺伝子を標的とする治療を考える上で、siRNAを用いた遺伝子治療法の確立が避けられない。最近、当科ではキトサンオリゴ糖からなるナノパーティクルを用いて脳腫瘍組織にsiRNAを安定にデリバリーすることに成功した。今後は、このシステムを用いたがん精巢抗原遺伝子を標的とする遺伝子治療法の開発を目指す予定である。

<引用文献>

Yawata T, Nakai E, Park KC, Chihara T, Kumasawa A, Toyonaga S, Masahira N, Nakabayashi H, Kaji T, Shimizu K: Enhanced expression of cancer testis antigen genes in glioma stem cells. *Molecular Carcinogenesis* 49: 532-544 , 2010

Nakai E, Park K, Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, Nakabayashi H, Shimizu K: Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. *Cancer Invest* 27: 901-908, 2009

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計8件）

Yawata T, Higashi Y, Kawanishi Y, Nakajo T, Fukui N, Fukuda H, Ueba T. CD146 is highly expressed in glioma stem cells and acts as a cell cycle regulator. *J Neurooncol*. 査読有, 2019
doi: 10.1007/s11060-019-03200-4

Lo BWY, Fukuda H, Miyawaki S, Koyanagi M. Short review of randomized controlled trials (RCTs) for Surgical Neurology International: Two important RCT articles for 2018 - Part I. *Surg Neurol Int*. 査読有, 2018; 9:138
doi: 10.4103/sni.sni_179_18

Maki Y, Ishibashi R, Fukuda H, Kobayashi M, Chin M, Yamagata S. Subarachnoid Hemorrhage from Vertebral Arteriovenous Fistula without Perimedullary Drainage: Rare Stroke Hemorrhagic Event in a Patient of Neurofibromatosis Type 1. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 査読有, 2018; 58:185-188
doi: 10.2176/nmc.cr.2017-0241

Koyanagi M, Fukuda H, Lo B, Uezato M, Kurosaki Y, Sadamasa N, Handa A, Chin M, Yamagata S. Effect of intrathecal milrinone injection via lumbar catheter on delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*, 査読有, 2018; 128: 717-722
doi: 10.3171/2016.10.JNS162227

Koyanagi M, Fukuda H, Saiki M, Tsuji Y, Lo B, Kawasaki T, Ioroi Y, Fukumitsu R, Ishibashi R, Oda M, Narumi O, Chin M, Yamagata S, Miyamoto S. Effect of choice of treatment modality on the incidence of shunt-dependent hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*, 査読有, 2018, Mar 1:1-7.

doi: 10.3171/2017.9.JNS171806

Jaja BNR, Saposnik G, Lingsma HF, Fukuda H et al. Development and external validation of outcome prediction models for aneurysmal subarachnoid haemorrhage: The SAHIT multinational cohort study. *BMJ*, 査読有, 2018 : 360; j5754

doi: 10.1136/bmj.j5745

Kawasaki T, Kurosaki Y, Fukuda H, Kinoshita M, Ishibashi R, Handa A, Chin M, Yamagata S. Flexible endoscopically assisted evacuation of acute and subacute subdural hematoma through a small craniotomy: preliminary results. *Acta Neurochirurgica (Wien)*, 査読有, 2018: 160; 241-248

doi: 10.1007/s00701-017-3399-2

水口紀代美、福田仁、森木章人、有光誠人、三宅浩久、目代俊彦、古田興之介、上羽祐亮、福井直樹、上羽哲也、3-Tesla MRI装置を用いた椎骨脳底動脈解離における血管内腔構造の描出能の検討、CI研究、査読有、Vol.40、67-74、2018

〔学会発表〕(計2件)

福井直樹、八幡俊男、川西裕、福田仁、他、マウスグリオーマ脳腫瘍モデルに対してナノ粒子を用いた siRNA のデリバリーによる治療効果の検討、第19回日本分子脳神経外科学会、2018年

福井直樹、八幡俊男、川西裕、福田仁、他、マウスグリオーマ脳腫瘍モデルに対してナノ粒子を用いた siRNA のデリバリーによる治療効果の検討、日本脳神経外科学会第77回学術総会、2018