

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08969

研究課題名(和文) 膠芽腫における間葉系形質を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Development of targeted therapy for glioblastoma by suppression of mesenchymal property

研究代表者

中城 登仁(Nakajo, Takahito)

高知大学・医学部・短期研究員

研究者番号：30311830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫には、高い造腫瘍性を持つ幹細胞が存在し、腫瘍再発や治療抵抗性に寄与している。これまでに様々ながん転移や浸潤、悪性度に関連するCD146遺伝子が膠芽腫幹細胞において高発現することを見出していた。本課題において、CD146の抑制が膠芽腫幹細胞の増殖、自己複製能を抑制すること、細胞周期を負に制御することを明らかにした。また、マウス脳腫瘍モデルにおいてCD146を標的とした遺伝子治療は、強い抗腫瘍効果を示した。トランスクリプトーム解析により、CD146の下流分子となる候補遺伝子を同定した。本課題の結果から、膠芽腫に対する治療法開発においてCD146が有望な標的分子であることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性の原発性脳腫瘍である膠芽腫において、細胞の間葉系の形質が予後や治療感受性に関与することが報告されている。我々が膠芽腫幹細胞で高発現する遺伝子として同定したCD146は、元来、様々ながんの浸潤や転移において機能する遺伝子として知られ、間葉系幹細胞のマーカーとしても報告されている。本課題において、CD146が分裂期にある膠芽腫幹細胞で高発現し、細胞の増殖を制御することを明らかにしたことで、幹細胞に対する治療効果を測定するマーカー遺伝子や膠芽腫の治療標的分子として有用であることを示すことが出来た。将来的には、膠芽腫における間葉系形質の抑制を介した治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma contains tumor stem cells or tumor-initiating cells possessing high tumorigenicity and resistance to chemotherapy and radiotherapy. We previously observed that CD146 gene involved with metastasis, invasion and malignancy of various tumors was highly expressed in glioma stem cells (GSCs). In this study, we revealed a function of CD146 involving cell growth, self-renewal activity and cell cycle regulation in GSCs. Furthermore, our results demonstrated that CD146 silencing was capable of eradicating experimental glioma. Also, candidates for downstream genes of CD146 were identified by transcriptome analysis. This study suggests that CD146 is a potential therapeutic target for malignant gliomas.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 がん幹細胞 遺伝子治療

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究開始当初の背景

原発性脳腫瘍の約 10%を占める膠芽腫患者の平均余命は一年から一年半であり、今後とも既存の治療法を試みる限り、飛躍的な治療効果は期待できない。膠芽腫には、造腫瘍性や治療抵抗性、浸潤性が高い幹細胞が存在するために腫瘍の除去を困難にしていることから、この幹細胞を標的とした治療法の開発が待ち望まれている。

我々は、これまでに膠芽腫幹細胞が間葉系幹細胞マーカーCD146を高発現することを見出している。CD146は、様々ながんで高発現し、腫瘍の転移、浸潤、悪性度と関連することが報告されている。しかしながら、膠芽腫におけるCD146の機能や治療標的分子としての評価はなされていない。

## 2. 研究の目的

本課題では、様々な腫瘍の間葉系形質に機能するCD146の膠芽腫幹細胞における機能の解明とその阻害による新規治療法開発への可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 膠芽腫細胞株や膠芽腫組織由来の初代培養細胞を従来の血清を用いた培養に加え、スフェロイド培養を行い、幹細胞を多く含む細胞を得た。膠芽腫を含む神経膠腫組織からRNAとタンパクを抽出した。RT-PCR法及びqRT-PCR法、ウエスタンブロット法により、CD146、幹細胞マーカーCD133、SOX2の発現量を定量した。フローサイトメトリーと組織化学免疫染色法を用いて腫瘍細胞及び組織におけるCD146とCD133の陽性率を算出した。プラスミドベクターによるshRNAやsiRNAを用いてCD146をノックダウンし細胞増殖への影響をWST-8試験、細胞周期の変動をフローサイトメトリーにより測定した。

(2) CD146を標的とする遺伝子治療の効果の検討は、マウスグリオーマ細胞RSV-Mの脳内移植により作製したマウスグリオーマモデルを用いた。RSV-M細胞に遺伝子導入したルシフェラーゼ遺伝子の発光をin vivoイメージングにより定量することで腫瘍の増減を観察した。CD146に対するsiRNAは葉酸を結合したキトサンから構成される100 nm程度のナノパーティクルを用いて腫瘍組織へデリバリーされた。

## 4. 研究成果

(1) フローサイトメトリーを用いたCD146遺伝子の発現量の解析により、CD146とCD133との二重陽性細胞が多く観察された。(図1)

神経膠腫組織においては、CD133とCD146陽性率の正の相関性が得られた。細胞周期の解析により、CD146は分裂期にある膠芽腫幹細胞で高発現することが観察された。幹細胞マーカーCD133も過去の異なるがん細胞における報告で分裂期にある細胞で高発現することが示されているが、CD146はCD133のケースよりもさらに高い頻度で分裂期にある細胞で発現することが明らかになった。

(2) 従来の血清を含む培養液で培養した分化細胞を多く含む膠芽腫細胞株においてshRNAを用いてCD146をノックダウンした場合、細胞増殖に大きな変化は観察されなかった。一方、膠芽腫細胞株や膠芽腫腫瘍組織からスフェロイド培養した未分化細胞を多く含む細胞では、強制発現の効果は得られなかったが、CD146のノックダウンにより顕著な細胞増殖の抑制が観察された。(図2)

この時に、細胞周期を解析するとG0/G1期の細胞が増加し、G2/M期の細胞が減少していた。(図3)

この結果から、CD146は膠芽腫幹細胞の増殖に必要な遺伝子であることが考えられた。

(3) 正常脳組織10と神経膠腫組織86を含む組織アレイを用いて、CD146の発現と腫瘍の悪性度の相

関性を解析した。CD146の発現は、神経膠腫のグレード 以上で有意に高頻度で認められた。

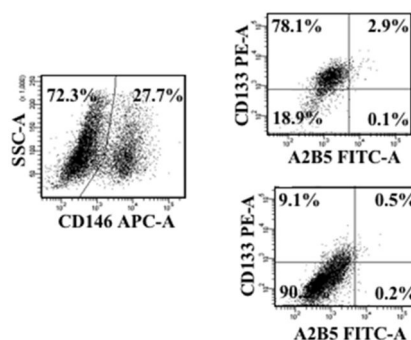


図1. 膠芽腫スフェロイド培養細胞のCD133とCD146の発現左のグラフのCD146陽性細胞(右上)と陰性細胞(右下)のCD133の発現を解析した。

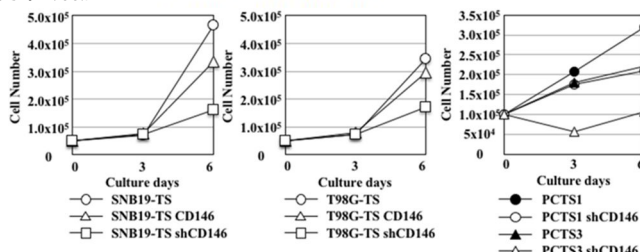


図2. CD146をノックダウンした膠芽腫幹細胞の増殖CD146は強制発現細胞、shCD146はノックダウン細胞。

CD146は悪性神経膠腫のマーカー遺伝子として有用であると考えられた。

(4) 次に、マウスグリオーマモデルを用いて生体内におけるCD146のノックダウンによる発現阻止の腫瘍の増殖に対する抑制効果について検討した。葉酸を結合したキトサンナノパーティクルにCD146に対するsiRNAをクロスリンクさせ、尾静脈を介した投与により脳内の腫瘍組織へsiRNAをデリバリーした。対照となる生理的食塩水またはスクランブル配列を含むsiRNAをクロスリンクしたナノパーティクルを投与した群では治療開始後3-5週で腫瘍の顕著な増大を観察した。一方、CD146に対するsiRNA

をデリバリーした群では腫瘍の増殖は抑制され、完全に消失した個体も観察された。この実験の腫瘍組織の組織化学的解析では、CD146の発現阻害により細胞増殖の指標であるKi-67の陽性率の低下や膠芽腫の診断に用いられる間葉系マーカーVimentinの発現低下が観察された。この結果からCD146は膠芽腫の新規治療法開発に有用な遺伝子である可能性が示唆された。

(5) さらに、CD146のリガンドとして報告されている分子に関して、膠芽腫幹細胞の増殖との関連性を検討した。CD146リガンドのガレクチン1と3の組替えタンパクの添加は膠芽腫幹細胞の増殖に影響を与えなかった。しかしながら、OTX-008によるガレクチン1の阻害は膠芽腫幹細胞の増殖を抑制した。ガレクチン1の組替えタンパクの添加により部分的に増殖を回復させたことから、この分子が膠芽腫の増殖に作用していることが考えられた。また、siRNAを用いて14のCD146の候補リガンドをノックダウンし、膠芽腫幹細胞の増殖への影響を観察した。そのうち、FGF4とNTN1をノックダウンした場合、それぞれ用いた6つの全て及び5つの細胞で増殖抑制を示した。

(6) 最後にCD146の下流に存在する情報伝達経路について、マイクロアレイを用いてCD146ノックダウン細胞において発現変動する遺伝子を解析した。CD146はGタンパク質共役受容体の経路と相互作用することが考えられた。

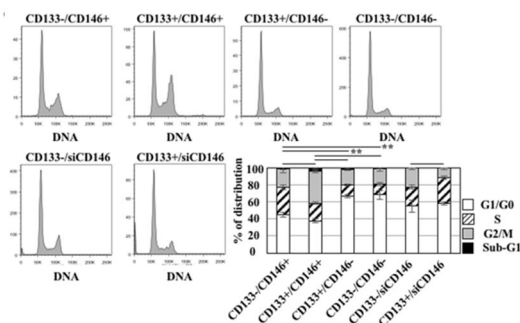


図3. CD133とCD146の発現様式による細胞周期の解析  
siCD146はCD146ノックダウン細胞を示す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yawata Toshio, Higashi Youichiro, Kawanishi Yu, Nakajo Takahito, Fukui Naoki, Fukuda Hitoshi, Ueba Tetsuya	4. 巻 144
2. 論文標題 CD146 is highly expressed in glioma stem cells and acts as a cell cycle regulator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03200-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniuchi Keisuke, Yawata Toshio, Tsuboi Makiko, Ueba Tetsuya, Saibara Toshiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficient delivery of small interfering RNAs targeting particular mRNAs into pancreatic cancer cells inhibits invasiveness and metastasis of pancreatic tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 2869 ~ 2886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukui Naoki, Yawata Toshio, Nakajo Takahito, Kawanishi Yu, Higashi Youichirou, Yamashita Tatsuyuki, Aratake Takaaki, Honke Koichi, Ueba Tetsuya	4. 巻 134
2. 論文標題 Targeting CD146 using folic acid-conjugated nanoparticles and suppression of tumor growth in a mouse glioma model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1772 ~ 1782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2020.4.JNS193078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八幡俊男、福井直樹、川西 裕、中城 登仁、上羽 哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞で高発現するCD146を標的とした治療法の開発
3. 学会等名 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 直樹、八幡 俊男、上羽 佑亮、川西 裕、門田 知倫、木田 波斗、松岡 溪太、山崎 大智、道上 怜奈、濱田 史泰、野中 大伸、中居 永一、岡田 憲二、福田 仁、中城 登仁、上羽 哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞で高発現するCD146の治療標的としての有用性の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 直樹、八幡 俊男、川西 裕、福田 仁、門田 知倫、岡田 憲二、濱田 史泰、道上 玲奈、木田 波斗、松岡 溪太、山崎 大智、野中 大伸、中居 永一、中城 登仁、上羽 哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞で高発現するCD146の治療標的としての有用性の検討
3. 学会等名 日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井直樹、八幡俊男、川西 裕、福田 仁、上羽佑亮、門田知倫、野中大伸、濱田史泰、帆足 裕、金子昌憲、細川雄慎、道上 怜奈、中居永一、中城登仁、上羽哲也
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第19回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井直樹、八幡俊男、川西 裕、福田 仁、上羽佑亮、門田知倫、野中大伸、濱田史泰、帆足 裕、金子昌憲、細川雄慎、道上 怜奈、中居永一、中城登仁、上羽哲也
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第77回学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	上羽 哲也  (Ueba Tetsuya)  (00314203)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授   (16401)	
研究 分担者	八幡 俊男  (Yawata Toshio)  (40380323)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教   (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------