

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16589

研究課題名（和文）悪性脳腫瘍幹細胞のストレス環境下における分裂機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the division mechanism of malignant brain tumor stem cells under stress environment

研究代表者

高口 素史 (Koguchi, Motofumi)

佐賀大学・医学部・病院助教

研究者番号：20794324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍幹細胞は、非対称分裂と対称分裂を使い分けることで、幹細胞性の維持と腫瘍組織の不均一性のバランスをとり、様々な環境に適応する。それが腫瘍形成や増殖、さらには放射線治療や薬物治療に対する抵抗性に深く関わっている。分裂機構を制御して、腫瘍組織から腫瘍形成能を有する腫瘍幹細胞をできる限り排除し、より分化した細胞集団に導くことが有効な治療法のひとつと考えられる。我々は、BMP4の幹細胞性を阻害する作用について検討した。BMP4投与により非対称分裂が誘発されることで、細胞集団の中で幹細胞性の低い細胞の割合が増えていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫幹細胞の非対称分裂を誘導することにより、幹細胞を分化へ導くことが有効な治療の手段となりうる可能性がある。BMP4が分裂で生まれた二つの娘細胞のCD133の非対称分布をもたらすことを示した。

研究成果の概要（英文）：It has also come to be thought that cancer is a heterogeneous, which composes of cancer stem cells (CSCs), which have self-renewal ability, multipotency and treatment resistance. Although various strategies targeting glioma stem-like cells (GSCs) have been studied, a median survival remains to be less than 2 years. In this study, we focused on strategies targeting GSCs through induction of differentiation using BMP4. We examined the expression of CD133, a cancer stem cell marker, under BMP4-treatment in GSCs using flowcytometry analysis, western blotting and qPCR. We also examined immunofluorescent staining of GSCs to study cell division. The treatment of BMP4 caused downregulation of CD133 expression in GSCs. In addition, BMP4-treatment induced to asymmetric cell division in GSCs. Tumor sphere assay showed that BMP4 suppresses self-renewal ability. These findings may provide a new perspective how BMP4 reduces the tumorigenicity of GSCs.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：非対称分裂

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 glioblastoma は、びまん性グリオーマのうち WHO Grade4 の悪性疾患であり、標準治療を行っても、本邦の脳腫瘍レジストリーの報告によると生存期間中央値:18 ヶ月、5 年生存率:約 15%となっている。

腫瘍幹細胞は、非対称分裂と対称分裂を使い分けることで、幹細胞性の維持と腫瘍組織の不均一性のバランスをとり、様々な環境に適応する。それが腫瘍形成や増殖、さらには放射線治療や薬物治療に対する抵抗性に深く関わっている。分裂機構を制御して、腫瘍組織から腫瘍形成能を有する腫瘍幹細胞をできる限り排除し、より分化した細胞集団に導くことが有効な治療法のひとつと考えられる。

### 2. 研究の目的

Glioma stem-like cell: GSLC の幹細胞性の維持に TGF- $\beta$  が関与し、TGF- $\beta$  阻害剤が GSLC の腫瘍形成能を著しく阻害することが報告されている。一方で同じく TGF- $\beta$  ファミリーに属する骨形成因子 Bone morphogenetic protein 4: BMP4 は GSLC の腫瘍形成能を低下させることが報告されている。BMP4 の発現は、正常な脳と比較して GBM でダウンレギュレーションされており、このダウンレギュレーションが薬剤耐性を引き起こす可能性があることを示唆しており、BMP4 が治療標的となり得る。しかしその機序については未解明な部分が多い。そこで我々は、腫瘍幹細胞は非対称分裂をするという現象に眼を向け、BMP4 の幹細胞性を阻害する作用について検討することとした。

### 3. 研究の方法

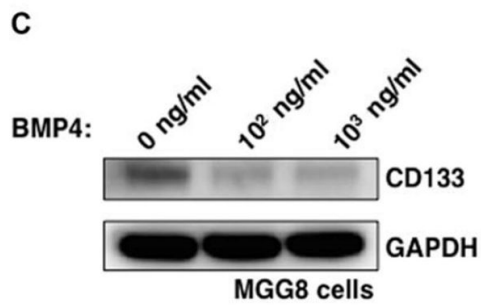
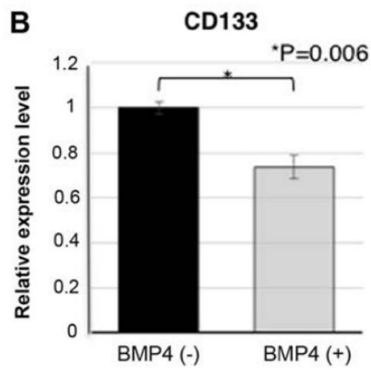
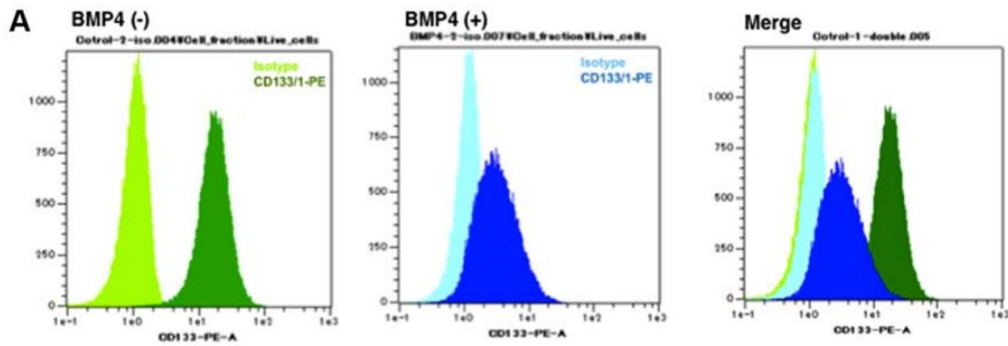
GSCs: MGG8 (from Massachusetts General Hospital, Neuro Oncol 14: 132-144, 2012.)をスフェア培養し、そこに BMP4 を加え、72 時間後に細胞を回収し、下記の方法を用いて検討した。

- ・ Flow Cytometry analysis
- ・ qPCR
- ・ Western blotting
- ・ Immunofluorescence (mitotic image analysis)

神経膠腫組織に含まれるごく少数の CD133<sup>+</sup>細胞亜集団は、高い腫瘍形成能に加えて分化能および放射線治療抵抗性を有することが報告されている。主に、この GSCs の代表的なマーカーの一つである CD133 について検討した。

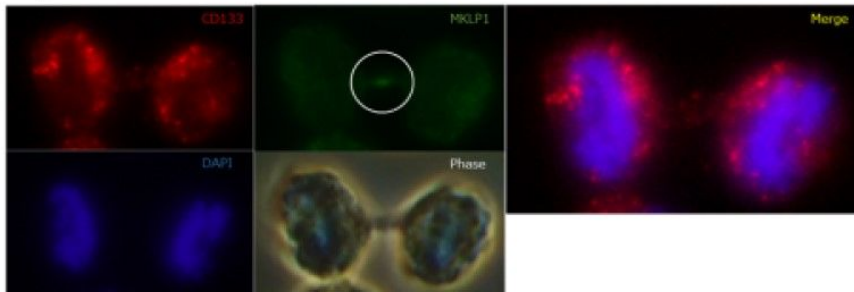
### 4. 研究成果

(1) スフェア培養した MGG8 細胞を BMP4 で 72 時間処理した。フローサイトメトリー分析は、MGG8 細胞が CD133 抗原を発現し、BMP4 処理が CD133 抗原の発現レベルが低い細胞集団をもたらすことを示した (A)。qPCR においても、CD133 の遺伝子発現は BMP4 処理下の MGG8 細胞で減少した ( $P = 0.006$ ; B)。さらに、ウエスタンブロッティングを使用して、CD133 タンパク質の発現レベルを調べた。BMP4 で処理すると、CD133 のタンパク発現が低下した (C)。これらことから、BMP4 曝露が MGG8 細胞における CD133 発現のダウンレギュレーションを引き起こすことが示唆された。

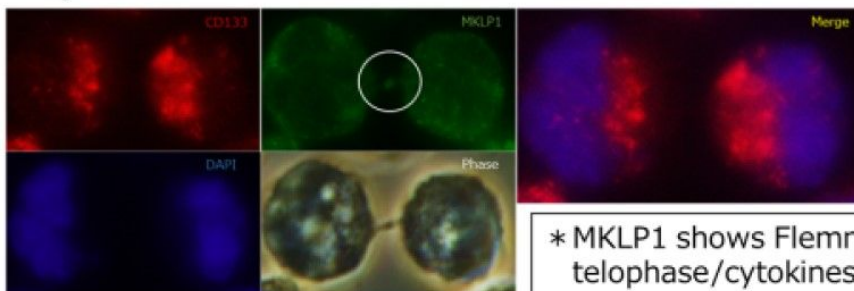


(2) 次に BMP4 処理が MGG8 細胞で ACD を誘導するかどうかを調べた。BMP4 未処理の細胞では ACD 比が 23%( ACD /総細胞分裂:20/86)であるのに対し、BMP4 で処理した細胞では 38%( 33/88)であった (P = 0.004)。したがって、BMP4 は MGG8 細胞で ACD を誘導した (C)。

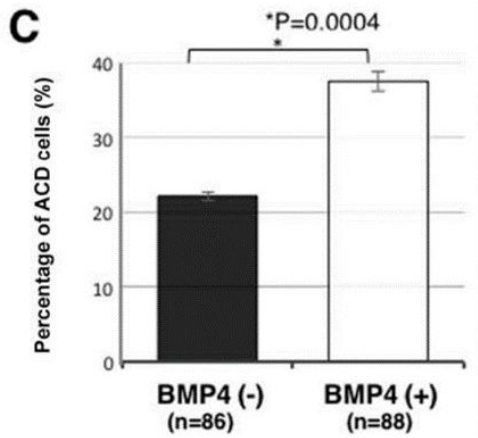
### ○ Symmetric cell division :SCD



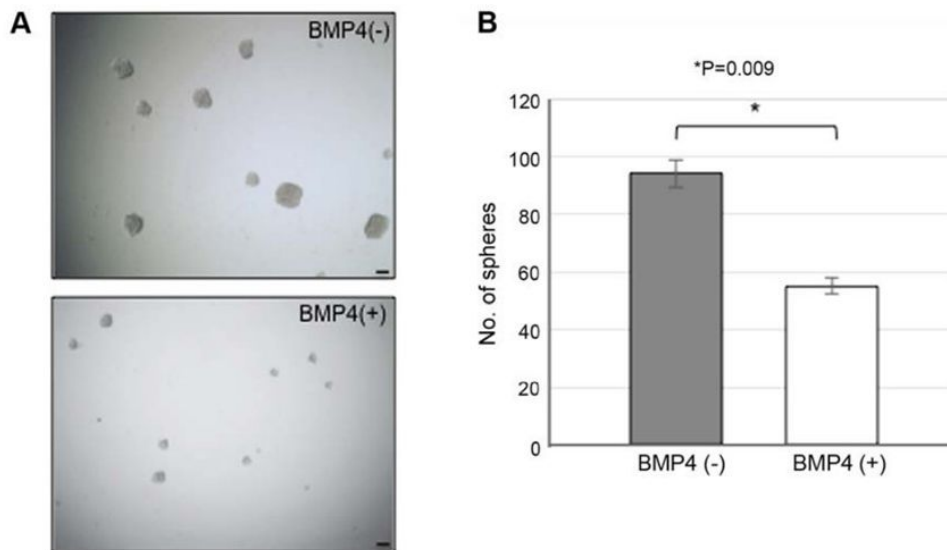
### ○ Asymmetric cell division :ACD



\* MKLP1 shows Flemming body in telophase/cytokinesis.



(3) 最後に BMP4 処理が MGG8 細胞の自己複製分裂に影響を与えるかどうかを、スフェアアッセイを用いて評価した。3 日間の BMP4 処理後、直径が 50  $\mu\text{m}$  を超えるスフェアをカウントした (A および B)。BMP4 で処理されたものは、コントロールと比較して有意に少なかった。(A および B)。これは BMP4 が MGG8 細胞の自己複製能力 (対称分裂) を抑制できることを強く示唆している。



(4) これらの結果から、BMP4 は ACD を誘発し、自己複製能力を抑制すること示した。本研究は *in vitro* 実験に限定されており、*in vivo* での BMP4 の効果は明らかにされていない。しかし本研究アプローチは、さらなる *in vivo* 研究にも役立つ可能性があり、BMP4 が GSCs の腫瘍形成能をどのように低下させるかについての新しい知見になりうると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koguchi Motofumi, Nakahara Yukiko, Ito Hiroshi, Wakamiya Tomihiro, Yoshioka Fumitaka, Ogata Atsushi, Inoue Kohei, Masuoka Jun, Izumi Hideki, Abe Tatsuya	4. 巻 19
2. 論文標題 BMP4 induces asymmetric cell division in human glioma stem-like cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1247-1254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.11231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高口素史
2. 発表標題 BMP4 signalingはGlioma stem-like cellの非対称分裂を誘導し幹細胞性を阻害する
3. 学会等名 日本分子脳神経外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高口素史
2. 発表標題 BMP4 signalingはGlioma stem-like cellの非対称分裂を誘導し幹細胞性を阻害する
3. 学会等名 日本脳腫瘍学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部竜也、高口素史
2. 発表標題 BMP4 induces to asymmetric cell division in human glioma stem-like cells.
3. 学会等名 Society for Neuro-Oncology Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------