

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09454

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞におけるQuiescence獲得機構の解明に関する研究

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying quiescence acquisition in glioma stem cells

研究代表者

深見 忠輝 (Fukami, Tadateru)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：40378451

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)：未分化な静止期(quiescence)にある少数のグリオーマ幹細胞は、標準治療抵抗性を示す予後不良の1要因と考えられている。ヒストンH2Bモノユビキチン化酵素RNF20は、マウス神経幹細胞のquiescenceを制御するエピゲノム因子として知られているが、グリオーマ幹細胞におけるRNF20の役割は不明であった。本研究では、患者由来ヒトグリオーマ細胞を用いてRNF20の発現変動とquiescenceに及ぼす影響、および腫瘍悪性度について検討した。その結果、RNF20はその発現変動によりグリオーマ幹細胞のquiescence誘導・解除を直接制御することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤や放射線照射は増殖グリオーマ細胞を死滅させるが、分裂しないために生き残ったグリオーマ幹細胞は再び分裂を開始して大量のグリオーマ細胞を供給すると考えられている。したがって、根本的治療を目指した治療法の開発には、グリオーマ幹細胞のquiescenceをいかに制御するかが重要課題である。本研究はこの問いの解明と重要因子のメカニズム解明を行なった。その結果、エピゲノム因子RNF20が未分化性や細胞周期の調節に参与し、グリオーマの増殖や浸潤などの悪性度を規定するquiescenceのゲートキーパーである可能性が示唆され、今後のエピゲノム分子を標的とする治療法発展に貢献できた。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma multiforme is a highly heterogeneous tumor. Resistance to standard therapies is frequent, suggesting that a small subpopulation of glioma stem-like cells (GSCs) within the tumor causes tumor recurrence. It can be distinguished from the tumor cells through the epigenetic regulatory program and disruption in epigenetic processes governs molecular alteration leading to malignant transformation. Here, we demonstrated that the histone H2B E3 ubiquitin ligase RNF20 is necessary for GSCs maintenance and tumor progression. RNF20 downregulation sustained the GSC quiescence pool at a low-proliferation rate, where it possesses long-term self-renewal and higher tumorigenic potential. Besides, RNF20 knockdown cells are more resistant to Temozolomide and reduce apoptosis. The transition to a proliferative state depended upon RNF20 expression patterns, thereby rendering GSCs dependent on RNF20 to maintain their growth and transcriptional processes.

研究分野：脳神経外科

キーワード：グリオーマ幹細胞 quiescence

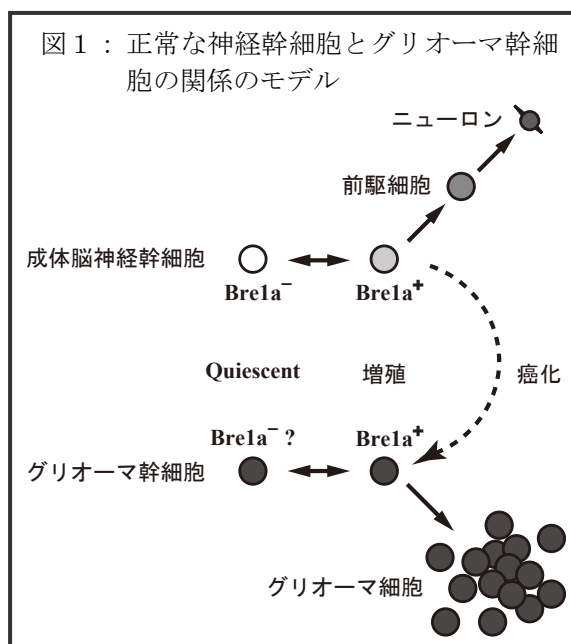
1. 研究開始当初の背景

グリオーマ (本研究では Glioblastoma を指す) の 5 年生存率は約 10% であり、今日でも悪性度の高い腫瘍の一つとして知られている。グリオーマが悪性度の高い腫瘍である理由の 1 つは、再発率が高いためであり、標準治療を行っても半数以上の患者が 1 年以内に再発するとされている。治療抵抗性の原因として、近年 "グリオーマ幹細胞" が注目されている。

他臓器のがん同様にグリオーマにおいても、腫瘍の中にほとんど細胞分裂することなく未分化な状態に保たれる、ごく少数のがん幹細胞すなわちグリオーマ幹細胞が存在すると考えられている。抗がん剤や放射線照射による治療によって、活発に増殖するグリオーマ細胞が死滅すると、分裂しないことで治療に抵抗して生き残ったグリオーマ幹細胞がそののちに分裂し、やがて大量のグリオーマ細胞を産生して腫瘍再発を引き起こす。このようなグリオーマ悪性化の断ち切るための新しい治療戦略を構築するためには、グリオーマ幹細胞の分子メカニズムを明らかにして、いかに治療抵抗性を制御できるかが鍵を握っている。

グリオーマ幹細胞の起源については未だ不明な点も多い。グリオーマ幹細胞は、形質転換して無限増殖能を獲得し、そこから派生する前駆細胞 (腫瘍細胞) が活発に増殖を繰り返すといった点で、正常な神経幹細胞と多くの類似性を持っていると考えられている (図 1)。

エピゲノム修飾因子 Rnf20 (Ring finger protein 20/Bre1a) は、ヒストン H2B のモノユビキチン化を司る酵素として知られており、さまざまな遺伝子の転写の促進に加え、正常な神経幹細胞の未分化性と細胞周期を調節することが明らかにされている。マウス胎生期の神経幹細胞においては、Rnf20 発現が抑制されることで、幹細胞は未分化な状態に保たれるとともに、細胞周期が伸長してほとんど分裂しなくなる quiescent な状態になることが報告された (Ishino et al., J Neurosci., 2014)。したがって、ヒトグリオーマ幹細胞においても RNF20 によるヒストン H2B モノユビキチン化を介したエピゲノム修飾によって、グリオーマ幹細胞の未分化性や細胞周期をコントロールしているのか?、さらには、グリオーマの増殖や浸潤など悪性化進行に寄与するのか? など、グリオーマ幹細胞における RNF20 の役割が明らかにされれば、グリオーマ幹細胞を標的としたエピゲノム制御による根本治療の開発に繋がる可能性は極めて高い。



2. 研究の目的

RNF20 と tumorigenesis との関連については、腫瘍抑制活性を有するとの報告や腫瘍形成に働くとの報告があり、がん種により様々である (Shema et al., Genes Dev 2008; Duan et al., Nat Commun 2016)。また研究の多くは Hela 細胞などの株化腫瘍細胞を用いたものであり、幹細胞に着目した悪性化機序は未だ不明な点が多く、グリオーマ幹細胞の悪性化を制御するエピゲノム機構は明らかになっていない。したがって、マウス神経幹細胞で明らかにされた Rnf20 の役割を出発点に、神経幹細胞と共通性質をもつグリオーマ幹細胞においてもマウスのホモログであるヒト RNF20 が未分化性維持や細胞周期の調節に深く関与することを証明し、グリオーマ幹細胞の quiescent を制御するエピゲノムをターゲットにした新規治療法の開発を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

患者由来グリオーマ細胞株 (RI01, RI02, RI03) はヒト幹細胞培養系で維持し、実験に供した。遺伝子発現、タンパク質発現は、定量 PCR および western blotting で検証した。2 種の RNF20 ノックダウンレンチウイルス (RNF20 shRNA ベクター) およびコントロール用 EGFP レンチウイルスを作製し、グリオーマ細胞株に感染させ、RNF20 ノックダウングリオーマ細胞とそのコントロールグリオーマ細胞を作製した。それぞれのレンチウイルス感染グリオーマ細胞について、増殖能と分化能を検証し、網羅的遺伝子発現解析 RNA-seq および Rag2 ノックアウトマウス脳への移植による in vivo 腫瘍形成実験を行った。テトラサイクリン発現誘導型 PiggyBac-RNF20 ベクターを構築し、TetOn-RNF20 グリオーマ安定株を作製した。テトラサイクリン誘導体ドキシサイクリンを添加した RNF20 過剰発現グリオーマの増殖能と分化能を検証し、RNA-seq および Rag2 ノックアウトマウス脳への移植実験を行った。

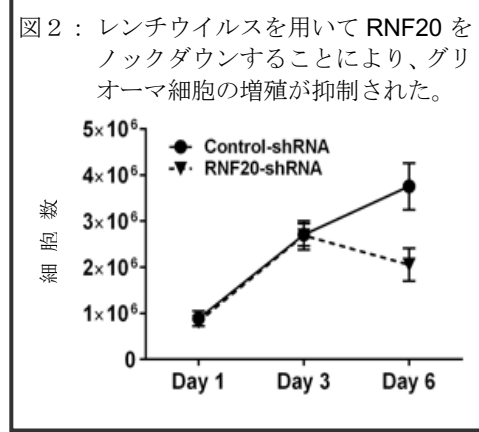
4. 研究成果

(1) グリオーマ幹細胞における ヒト RNF20 の発現と機能解析

手術摘出試料から樹立した 3 ラインのグリオーマ細胞株(RI01, RI02, RI03)を未分化維持培養系 sphere culture で培養した後、RNF20 の発現を調べた。その結果、全てのグリオーマ細胞株で RNF20 の発現が同定され、同時に幹細胞マーカーSOX2、OCT4、CD133 の発現も確認された。また TetOn-RNF20 安定株にドキシサイクリンを添加して RNF20 過剰発現させたところ、ヒストン H2B のユビキチン化(H2Bub1)が亢進し、グリオーマ細胞の増殖速度と sphere 形成能も亢進した。

(2) グリオーマ幹細胞における RNF20 ノックダウンの効果解析

RNF20shRNA を発現するレンチウイルスベクターを 2 種類構築し、グリオーマ細胞におけるノックダウン効果を検証した。その結果、H2Bub1 の減少に加え、グリオーマ細胞の増殖 (図 2) と sphere 形成能も有意に低下した。またこの細胞増殖の低下はアポトーシス増加によるものではなく、細胞自身の増殖速度の低下によることがわかった。



以上(1)と(2)のことから、ヒトグリオーマ幹細胞における RNF20 は、ヒストンのユビキチン化を介して幹細胞の quiescence に関与していることが明らかになった。

(3) RNF20 の発現制御によるグリオーマ幹細胞の悪性度解析

RNF20shRNA レンチウイルス感染グリオーマ細胞およびコントロール shRNA レンチウイルス感染グリオーマ細胞を Rag2 ノックアウトマウス脳内へ移植して、*in vivo* における腫瘍形成能を評価した。RNF20 ノックダウングリオーマ細胞移植群において、腫瘍増大が認められ、マウス生存率が低下した。また、移植後にグリオーマ治療薬の一つであるテモゾロミド (Temozolomide: TMZ) の投与を行い、化学療法の効果を検証した。RNF20 ノックダウングリオーマ細胞移植群において、TMZ の効果が有意に認められた。一方、グリオーマ TetOn-RNF20 安定株を Rag2 ノックアウトマウス脳内へ移植し、ドキシサイクリンを投与したところ、ドキシサイクリン投与群では、非投与群に比べ腫瘍形成が有意に低下した。

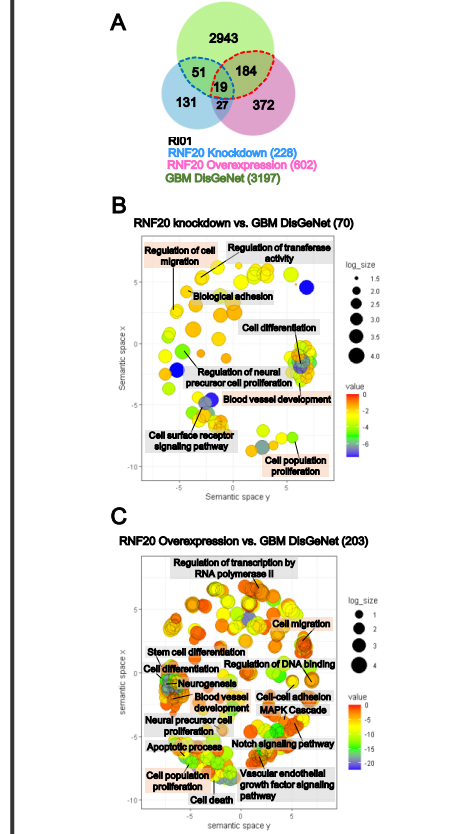
研究結果(3)により、RNF20 発現低下によって誘導された quiescence 状態のグリオーマ細胞は、高い腫瘍形成能を有していることが明らかとなった。また RNF20 発現を亢進させることで、脳内腫瘍形成は有意に抑制されることが分かった。

(4) RNF20 の発現変化で変動する遺伝子群の網羅的解析

RNF20shRNA レンチウイルスを感染させたグリオーマ細胞とコントロール shRNA レンチウイルス感染グリオーマ細胞に対して RNA-seq を行なった。また、恒常的テトラサイクリン発現誘導型 RNF20 グリオーマ細胞株の Dox 添加群と非添加群 TetOn-RNF20 グリオーマを用いて RNA-seq を行なった。総合的なバイオインフォマティクス解析を行なった結果 (図 3)、RNF20 の発現変動に伴う下流ターゲット分子の確定を遺伝子発現およびタンパク質発現で検証した。

以上(4)により、RNF20 下流の腫瘍悪性化につながる新しい分子機序の候補と悪性化回避の分子機序を見出し、この知見に基づく新しい治療ターゲットの確定に繋がった。

図 3: RNF20 発現に変動する遺伝子群の網羅的解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名	辻 篤司, 藤沢 亮, 河野浩人, 辻 敬一, 吉村弥生, 高木健治, 山田茂樹, 新田直樹, 深見忠輝, 野崎和彦
2. 発表標題	Flow diverter時代における治療困難な巨大脳動脈瘤に対するflow alteration treatment
3. 学会等名	第50回脳卒中の外科学会学術総会STROKE2021
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	辻 篤司, 河野浩人, 辻 敬一, 吉村弥生, 高木健治, 山田茂樹, 新田直樹, 深見忠輝, 野崎和彦
2. 発表標題	もやもや病に対するバイパス術中の超音波血流計によるグラフト血流量の評価の意義
3. 学会等名	第39回The Mt.Fuji Workshop on CVD
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	辻 篤司, 石田正平, 藤本優貴, 河野浩人, 横井俊浩, 辻 敬一, 吉村弥生, 高木健治, 山田茂樹, 新田直樹, 深見忠輝, 野崎和彦
2. 発表標題	医療者間コミュニケーション用アプリケーション導入による機械的血栓回収療法の変化
3. 学会等名	第80回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	辻 篤司, 河野浩人, 辻 敬一, 吉村弥生, 高木健治, 横井俊浩, 山田茂樹, 新田直樹, 深見忠輝, 野崎和彦
2. 発表標題	後下小脳動脈を含む出血発症の椎骨動脈解離に対してステント留置を併用し後下小脳動脈を温存する治療戦略
3. 学会等名	第37回日本脳神経血管内治療学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 河野浩人, 山田茂樹, 青山智俊, 石田正平, 藤本優貴, 辻敬一, 吉村弥生, 高木健治, 横井俊浩, 新田直樹, 深見忠輝, 辻篤司, 野崎和彦
2. 発表標題 4D-flow MRI シャント性疾患における血流速度(絶対値) color mapを用いたシャントポイント特定の有用性
3. 学会等名 第38回滋賀医大シンポジウム 滋賀医大
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 茂樹, 伊藤広貴, 河野浩人, 藤沢亮, 辻敬一, 吉村弥生, 高木健治, 新田直樹, 深見忠輝, 辻篤司, 野崎和彦
2. 発表標題 3Dワークステーションを用いた術前シミュレーションによる手術教育
3. 学会等名 第30回脳神経外科手術と機器学会 CNTT 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenny Daun, 守村直子, 深見忠輝, 谷垣健二, 椎野顯彦, 野崎和彦, 等誠司
2. 発表標題 グリオーマ幹細胞におけるエピゲノム因子 RNF20 の機析
3. 学会等名 第9回Neuro-Oncology West
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daun K, Morimura N, Fukami T, Hayashi Y, Koyama N, Tanigaki T, Shiino A, Nozaki K, Hitoshi S.
2. 発表標題 RNF20 as an epigenetic regulator for GBM stem-like cells maintenance and regulation.
3. 学会等名 第18回成体脳ニューロン新生懇談会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深見忠輝
2. 発表標題 3Dで学ぶ脳神経外科手術：腫瘍（3）小脳橋角部類上皮腫
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸尾知里，新田直樹，深見忠輝，藤川涼子，萱谷仁，辻敬一，吉村弥生，高木健治，辻篤司，中澤拓哉，野崎和彦
2. 発表標題 外視鏡を用いた覚醒下手術の1例
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深見忠輝
2. 発表標題 Pituitary ependymomaの一例
3. 学会等名 第26回日本神経内視鏡学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻敬一，深見忠輝，吉村弥生，新田直樹，野崎和彦
2. 発表標題 当施設における腫瘍生検術の取り組み
3. 学会等名 第26回日本神経内視鏡学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深見忠耀
2. 発表標題 Pituitary ependymomaの一例
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新田直樹, 深見忠耀, 笹尾明史, 野崎和彦
2. 発表標題 前頭骨悪性リンパ腫の1例
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深見忠耀
2. 発表標題 ヒト下垂体手術の臨床ー診断から手術まで
3. 学会等名 獣医神経脊椎外科研究会
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
研究 分担 者	野崎 和彦 (Nozaki Kazuhiko) (90252452)	滋賀医科大学・医学部・客員教授 (14202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	等 誠司 (Hitoshi Seiji) (70300895)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	RNA-seqを行なった。
研究協力者	守村 直子 (Morimura Naoko) (00349044)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	細胞培養実験を行なった。

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