

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07566

研究課題名（和文）悪性脳腫瘍の不均一性と治療抵抗性に働く細胞系譜転換の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular mechanism of subtype shift underlying plasticity and therapy-resistance in glioblastoma

研究代表者

小林 昌彦（Kobayashi, Masahiko）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：70285633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：悪性脳腫瘍である膠芽腫では、再発時に治療抵抗性のmesenchymal型腫瘍に変化する細胞系譜転換が問題になっている。この細胞系譜転換とmesenchymal型腫瘍の治療抵抗性の機構を明らかにするために、mesenchymal型腫瘍と治療抵抗性のマーカーであるCD44を指標に解析し、低酸素状態やOLIG2が、CD44の発現と治療抵抗性を抑制することを見出した。また、RNA-seqの結果をもとに、リソソームが治療抵抗性に関与していることを見出し、リソソームの阻害によって治療抵抗性が抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫（グリオブラストーマ）の細胞系譜転換のメカニズムを明らかにし、治療抵抗性に働く経路を特定した本研究成果をさらに発展させることによって、治療抵抗性腫瘍に対しても、これまでの治療法をより効果的に作用させる方法の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma (GBM), the most aggressive type of brain tumor, is classified into some subtypes in which mesenchymal subtype GBM is therapy-resistant. Radiation and temozolomide are main therapeutics for GBM, however, recurrence occurs due to therapy-resistance through proneural-mesenchymal transition. The mechanisms of this subtype-shift and therapy-resistance in mesenchymal subtype have been unclear. To address these questions, we focused on a mesenchymal subtype and therapy-resistance marker, CD44. In this study, we found that hypoxia and OLIG2 suppressed CD44 levels and therapy-resistance. RNA-seq analysis showed lysosome-related genes were up-regulated in the CD44-high subpopulation. A lysosome inhibitor increased the sensitivity of CD44-high subpopulation to temozolomide and radiation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：グリオーマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオーマ)は、グリア細胞由来の脳腫瘍と考えられ、最も未分化であり悪性度が高いものがグレード4の膠芽腫(グリオブラストーマ)である。起源細胞も多様で、変異遺伝子の種類とも併せて極めて複雑な様相を呈し、腫瘍の中で最も多様な形質を示す。従来、グリオブラストーマは、4つのサブタイプ(Proneural、Mesenchymal、Classical、Neural)に分類されている。Proneural型は、OLIG2、SOX2、SALL2、POU3F2などの転写因子の高発現によって未分化性を制御しているなど、がん幹細胞モデルに最も適合するものとして知られている。一方、Mesenchymal型は、NF1欠損、TNFファミリー・NF-κB経路の活性化などが基盤となり、CD44高発現、治療抵抗性という特徴があり、同じグリオブラストーマといえども、予後、薬剤反応性、浸潤能など、その形質は大きく異なる。特に問題とされているのは、Proneural型が、治療過程において、治療抵抗性の高いMesenchymal型に転換する現象である(図1)。しかし、このサブタイプ(細胞系譜)転換の誘導機序や、その治療抵抗性への寄与についての詳細は不明である。申請者は、これまで、マウスグリオーマモデル、および、患者由来グリオブラストーマ細胞を用いて、1,300種類以上の既存薬、300種類の阻害剤ライブラリーを用いたハイスループット薬剤感受性試験を実施し、Proneural型グリオブラストーマの未分化性は、ミトコンドリア機能とAMPK抑制により維持されていることを見出した。一方で、特定の薬剤に対し、Proneural型とMesenchymal型では感受性が大きく異なることも知られており、サブタイプ間での治療抵抗性の違いを決定する因子を特定しなければ、根治につながる治療法の開発の大きな障壁になると考えられた。

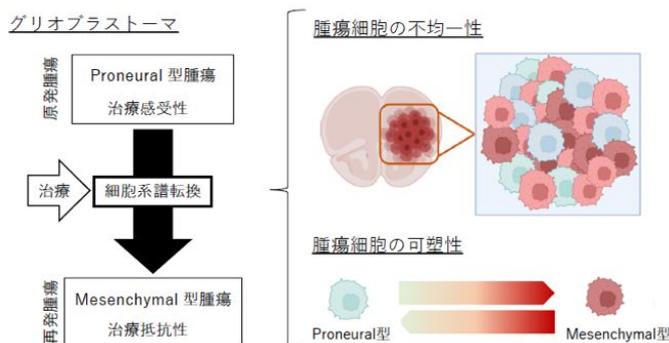


図1. 細胞系譜転換

2. 研究の目的

本研究では、Proneural型グリオブラストーマの未分化マーカーとして知られる転写因子OLIG2とMesenchymal型グリオブラストーマと治療抵抗性のマーカーとして知られるCD44に着目し、Proneural型とMesenchymal型との細胞系譜転換の制御機構と腫瘍内不均一性、および、治療抵抗性獲得の間の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

OLIG2遺伝子レポーター細胞を用いた腫瘍細胞の形質および細胞系譜の制御様式の解析

(1)OLIG2の発現をモニターできるOLIG2遺伝子レポーター細胞を用いて、OLIG2の発現と腫瘍細胞の形質および細胞系譜の関係を解析する。腫瘍細胞の形質として、グリオブラストーマの治療に使用される化学療法剤テモゾロミド(TMZ)を中心に感受性を解析する。

(2)OLIG2遺伝子レポーター細胞や細胞系譜マーカーを指標に、細胞系譜の制御に関与する因子、経路を探索する。

Mesenchymal型腫瘍細胞の治療抵抗性に寄与する因子(経路)の特定

(3)上記の方法によって得られた知見をもとに、治療抵抗性因子を探索、特定する。

4. 研究成果

(1)患者由来グリオブラストーマ細胞のOLIG2遺伝子座にGFPをノックインしたOLIG2レポーター細胞を用いた移植実験において、腫瘍内のOLIG2高発現細胞はProneural型の、OLIG2低発現細胞はMesenchymal型の特徴を示した。これと一致して、CD44の発現は、OLIG2高発現細胞では低く、OLIG2低発現細胞では高くなっていた。また、腫瘍細胞から分離したOLIG2高発現細胞は

TMZ 感受性を示し、OLIG2 低発現細胞は耐性を示した。

患者由来グリオblastoma細胞の培養から、CD44の抗体を用いて、CD44 レベルの高い細胞集団と低い細胞集団に分画して細胞の性質を解析したところ、CD44 レベルの高い細胞集団は Mesenchymal 型の発現パターンを示し、OLIG2 の発現が低く、TMZ、電離放射線を始め、複数の処

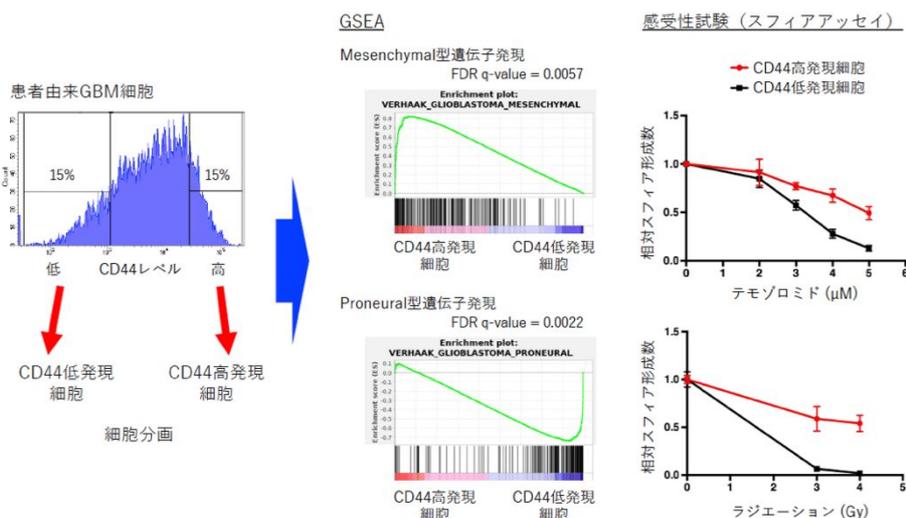


図2. 患者由来GBM細胞のCD44レベルと遺伝子発現パターン、治療抵抗性の関係

理に対して耐性を示した。逆に、CD44 レベルの低い細胞集団は Proneural 型の発現パターンを示し、OLIG2 の発現が高く、感受性を示した(図2)。

そこで、OLIG2 のノックアウト細胞を作製し、それに OLIG2 を強制発現させた場合と比較したところ、OLIG2 ノックアウト細胞は、CD44 レベルが高く、耐性であり、OLIG2 を強制発現させると、CD44 レベルが抑制され、感受性になることがわかった。

CD44 が治療抵抗性因子であるかを調べるために、ゲノム編集により CD44 ノックアウト細胞を作製し、治療抵抗性への効果を調べたところ、CD44 のノックアウトは治療抵抗性に影響をおよぼさなかった。これらのことから、グリオblastomaにおいて、CD44 は治療抵抗性の指標であるが、治療抵抗性を付与する因子ではないこと、OLIG2 はサブタイプ転換と治療感受性を制御している因子であることがわかった。

(2)さらに、OLIG2 の上流因子の探索により、低酸素状態が OLIG2 の発現を上げ、CD44 の発現を抑制することを見出した。そこで、低酸素誘導因子である HIF1 α と HIF2 α のノックアウトや安定化剤の治療抵抗性への影響を調べたところ、低酸素状態において、低酸素誘導因子は OLIG2 と共に抵抗性を抑制する因子であることがわかった。これらのことから、腫瘍内環境因子の一つである酸素濃度が、低酸素誘導因子や OLIG2 を介して、細胞系譜転換や治療抵抗性を制御しているメカニズムが示唆された。

(3)CD44 高発現細胞の治療抵抗性因子を明らかにするために、CD44 の高発現細胞集団と低発現細胞集団の RNA-seq を行った。解析したところ、CD44 の高発現細胞集団ではリソソーム経路の遺伝子の高発現がみられ、リソソーム経路が治療抵抗性に関与している可能性を見出した(図3)。さらに、リソソームの阻害剤にて処理することによって、治療感受性になることを明らかにした(図4)。

CD44高発現細胞にて上昇している経路

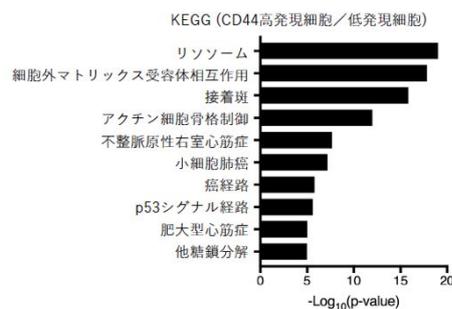


図3. CD44高発現細胞の発現プロファイル

感受性試験 (スフィアアッセイ)

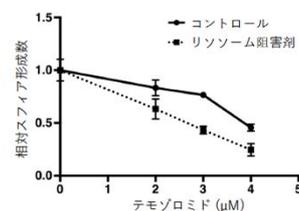


図4. リソソーム阻害と治療感受性の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Jing Yongwei, Kobayashi Masahiko, Vu Ha Thi, Kasahara Atsuko, Chen Xi, Pham Loc Thi, Kurayoshi Kenta, Tadokoro Yuko, Ueno Masaya, Todo Tomoki, Nakada Mitsutoshi, Hirao Atsushi | 4. 巻 113 |
| 2. 論文標題 Therapeutic advantage of targeting lysosomal membrane integrity supported by lysophagy in malignant glioma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 2716 ~ 2726 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15451 | 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 - |
| 1. 著者名 Pham Loc Thi, Peng Hui, Ueno Masaya, Kohno Susumu, Kasada Atuso, Hosomichi Kazuyoshi, Sato Takehiro, Kurayoshi Kenta, Kobayashi Masahiko, Tadokoro Yuko, Kasahara Atsuko, Shoulkamy Mahmoud I., Xiao Bo, Worley Paul F., Takahashi Chiaki, Tajima Atsushi, Hirao Atsushi | 4. 巻 621 |
| 2. 論文標題 RHEB is a potential therapeutic target in T cell acute lymphoblastic leukemia | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 74 ~ 79 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.06.089 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Nomura Naho, Ito Chiaki, Ooshio Takako, Tadokoro Yuko, Kohno Susumu, Ueno Masaya, Kobayashi Masahiko, Kasahara Atsuko, Takase Yusuke, Kurayoshi Kenta, Si Sha, Takahashi Chiaki, Komatsu Masaaki, Yanagawa Toru, Hirao Atsushi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1666-1679 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81076-z | 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 - |
| 1. 著者名 Masaya Ueno, Takuya Tomita, Hiroshi Arakawa, Takahiro Kakuta, Tada-aki Yamagishi, Jumpei Terakawa, Takiko Daikoku, Shin-ichi Horike, Sha Si, Kenta Kurayoshi, Chiaki Ito, Atsuko Kasahara, Yuko Tadokoro, Masahiko Kobayashi, Tsutomu Fukuwatari, Ikumi Tamai, Atsushi Hirao & Tomoki Ogoshi | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Pillar[6]arene acts as a biosensor for quantitative detection of a vitamin metabolite in crude biological samples | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Communications Chemistry | 6. 最初と最後の頁 なし |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Jiapaer Shabierjiang, Furuta Takuya, Dong Yu, Kitabayashi Tomohiro, Sabit Hemragul, Zhang Jiakang, Zhang Guangtao, Tanaka Shingo, Kobayashi Masahiko, Hirao Atsushi, Nakada Mitsutoshi | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Identification of 2-Fluoropalmitic Acid as a Potential Therapeutic Agent Against Glioblastoma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Current Pharmaceutical Design | 6. 最初と最後の頁 4675 ~ 4684 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1381612826666200429092742 | 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 Masahiko Kobayashi, Yongwei Jing, Atsushi Hirao |
| 2. 発表標題 Identification of regulatory molecules of mesenchymal phenotype in glioblastoma |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yongwei Jing, Masahiko Kobayashi, Atsushi Hirao |
| 2. 発表標題 A novel therapeutic strategy for glioma by targeting lysosome membrane integrity combined with amino acid restriction |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masahiko Kobayashi, Yongwei Jing, Atsushi Hirao |
| 2. 発表標題 Acquisition of therapy-resistance through proneural-mesenchymal transition in glioblastoma |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yongwei Jing, Masahiko Kobayashi, Atsushi Hirao |
| 2. 発表標題 A novel therapeutic strategy for glioblastoma by targeting lysosome membrane integrity controlled by autophagy activity |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masahiko Kobayashi, Atsushi Hirao |
| 2. 発表標題 Investigation of the roles of OLIG2 in stemness property of glioblastoma |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 腫瘍治療用医薬組成物 | 発明者 平尾敦、Jing Yongwei、小林昌彦、中田光俊 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2021-151703 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|