

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19396

研究課題名(和文) 神経膠芽腫治療と脳組織再建の同時処理による腫瘍丸ごと組織正常化ストラテジーの確立

研究課題名(英文) Establishment of strategies that normalize whole GBM tissue by inducing GBM cells into functional neural cells and eliminating GBM-initiating cells.

研究代表者

近藤 亨 (Kondo, Toru)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30270573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：グリオブラストーマ幹細胞(GIC)を効率的に神経細胞とオリゴデンドロサイトに分化誘導する化合物を決定した。これら候補化合物の毒性試験を行い、投与方法と投与濃度を決定した。同時に、GICを傷害するDHODH阻害剤の投与方法を決定すると共に、本阻害剤の脳腫瘍に対する抗腫瘍効果を確認した。GICを脳移植した担癌マウスに分化誘導化合物とDHODH阻害剤を逐次的に投与したところ、脳腫瘍内にGICから分化した機能的な神経細胞を検出すると共にGICの排除を確認した。これらの結果は、脳腫瘍を機能的な脳組織に再利用することが可能であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GBMは、存在する組織の重要性から外科的切除に限られ、取り残した腫瘍細胞を傷害するために使用される化学放射療法に抵抗性を示すGICの存在により高確率で再発する難治癌であり有効な治療法の確立が望まれている。GBMに有効な治療法が開発されてきているが広範囲に癌で侵食された脳の機能を回復させる治療法は開発されていない。本研究の成果は、脳腫瘍そのものを機能的な神経系細胞に分化誘導すると共に未分化GICを排除することにより担癌脳を正常化するものであり、罹患患者への恩恵は多大である。更に、本研究成果は様々な他癌種に対しても適用可能であることから、癌研究分野での波及効果は非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We successfully identified the compounds that effectively induced glioblastoma (GBM)-initiating cells (GIC) into either neurons or oligodendrocytes in culture. We performed their toxicity test and determined both the optimal administration methods and the concentration. In parallel, we not only determined the optimal administration method for DHODH inhibitors but also confirmed their anti-tumor activities. Then we sequentially injected the neural differentiation inducer and DHODH inhibitor and found the functional neurons and GIC elimination in tumor. Together, these data indicated that we can normalize GBM tumor by inducing GBM cells into functional neural cells and eliminating GBM-initiating cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：GBM 正常化 治療 組織再建

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまでに正常神経幹細胞とGICの遺伝子発現プロファイルの比較検討からGICの機能に重要な働きを担う遺伝子群を同定し、それらの機能の解明と新規治療法の開発を進めてきた。更に、GBMに対する標準治療薬テモゾロミドに耐性能を有するGIC(GICR)を作製し、GICRを用いた化合物スクリーニングによりGIC/GICRを特異的に傷害する新規化合物を同定した。本化合物は、神経幹細胞を含む様々な正常細胞に対して低毒性で投与したマウス個体にも影響が観られないが、GICR移植担癌マウスに対して極めて強い抗腫瘍効果を発揮した。更に、本化合物がGIC/GICRの幹細胞性を除去する分子機構の一端を解明した。これらの結果は、本化合物がGBMに対する有望な新規抗がん剤候補薬の1つとなることを示唆している。

GBMの発生源地では物理的な圧迫や炎症反応により脳機能が失われる。このため、脳腫瘍根治後の脳組織・機能再建は患者のQOLに必要不可欠である。罹患患者の一般的な腫瘍サイズを鑑みると、神経幹細胞や間葉系幹細胞等の細胞移植による再生医療は困難である。一方で、申請者らの研究からGICが神経幹細胞や多能性幹細胞の性状を有していることから、**GBM自体を用いて正常化・組織再生することができれば、失われた脳機能の回復が可能である。**

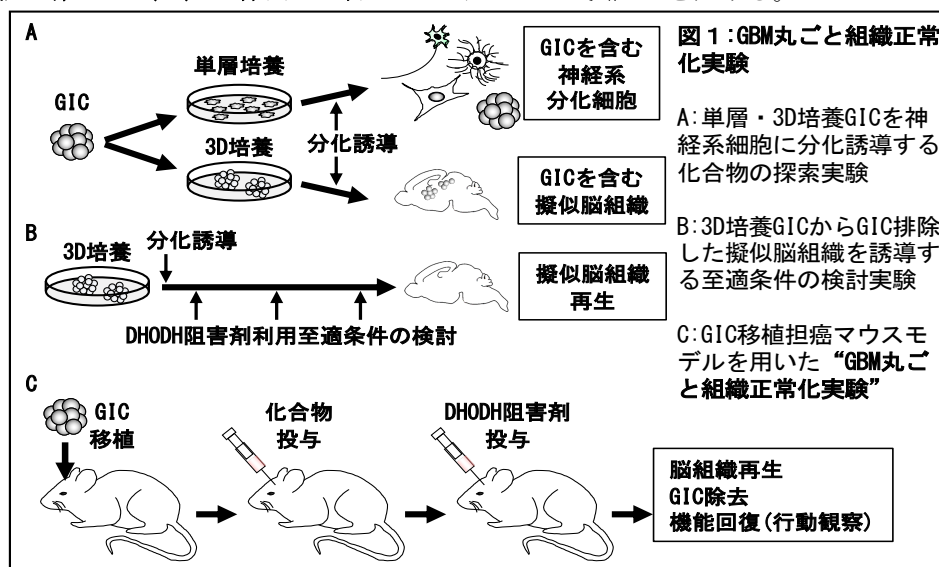
これまでの生体内神経幹細胞から神経系細胞を分化誘導できる化合物の報告、多能性幹細胞から試験管内で誘導した脳組織が移植したマウス脳で機能する報告、申請者らが同定した化合物が個体に影響なく移植した未分化GICや多能性幹細胞を特異的に傷害する結果を総合して、**GBMに対する次世代医療を開発する目的として本研究を立案した。**

### 2. 研究の目的

神経膠芽腫(Glioblastoma, GBM)を含む悪性脳腫瘍は、その発生臓器の重要性から広範囲の外科的切除は困難であり、正常組織に浸潤した取り残しGBM細胞(特にGBM幹細胞(GIC))が再発の原因となる難治性腫瘍である。また、腫瘍形成した脳では発生源地の機能が損なわれており、腫瘍を根治したとしても完全な脳機能の回復は極めて困難である。そこで本研究課題では、「**脳腫瘍細胞から機能的な神経系細胞を分化誘導する方法**」と「**腫瘍形成能を有するGICの除去**」を組み合わせた「**GBM丸ごと組織正常化**」のストラテジーの確立を目指した研究を遂行する。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究を達成するために、(1) 生体内GIC/GBM細胞から機能的な神経系細胞を分化誘導する方法の確立と(2) 生体内GIC除去のタイミングの決定を試みる。



#### (1) 生体内GIC/GBM細胞から機能的な神経系細胞を分化誘導する方法の確立

申請者らは、GICが神経幹細胞マーカー陽性であると共に多能性幹細胞の維持とiPS化に必要な因子群(Oct4、Sox2、Myc、Klf4等)を発現していることを網羅的な遺伝子発現解析により確認している。更に、GICが試験管内で部分的にiPS化することも確認している。これらの結果は、GICが神経幹細胞と多能性幹細胞の性状を保持していることを示している。そこで、現在までに報告されている多能性幹細胞と神経幹細胞から機能的な神経系細胞を誘導する化合物群(ISX-9等)を選定し、試験管内試験(単層培養および3次元(3D)培養)によりGICから効率的に神経系細胞を誘導する化合物の決定を試みる(図1A)。選定した候補化合物については、GICを脳移植した担癌マウスに投与し、神経系細胞誘導の効果を検討する。分化誘導効果は、代表的な神経系細胞マーカー(MAP2、NeuN、Neurofilament、GFAP、MBP等)と細胞増殖マーカー(Ki67陰性等)に

対する遺伝子発現解析と免疫染色により確認する。

## (2) 生体内 GIC 除去のタイミングの決定

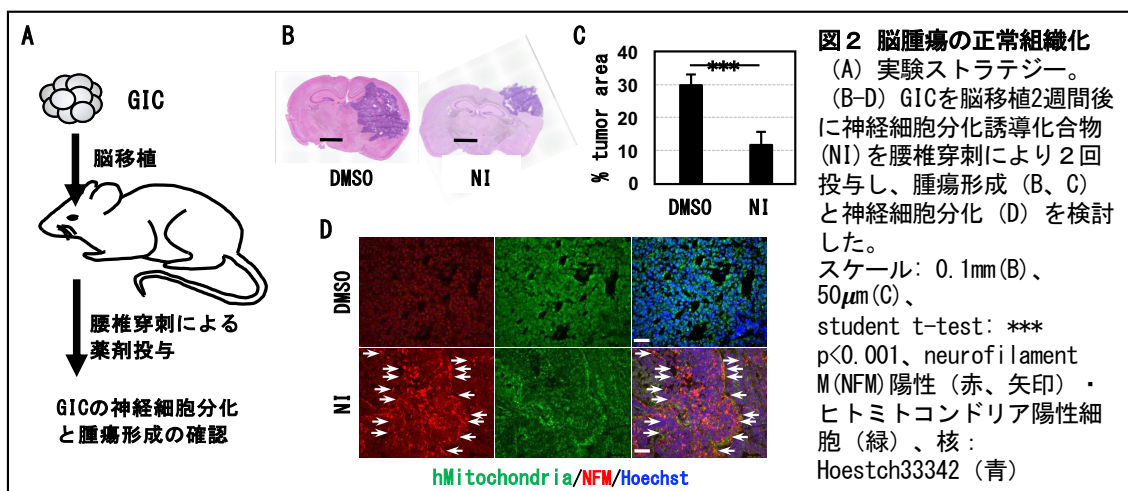
申請者らは、GIC 及び多能性幹細胞が新規ペリミジン合成経路に依存して増殖・幹細胞性を維持していることを発見し、本合成経路の特異的阻害剤 (DHODH 阻害剤) が GIC と多能性幹細胞の腫瘍形成と幹細胞性を阻害することを報告した。そこで、GIC から神経系細胞を分化誘導する 3D 培養実験系を用いて、様々な時系列で DHODH 阻害剤の濃度と投与期間を変えて、GIC 分化による脳組織構築と GIC の排除に最も適切な条件の決定を試みる (図 1 B)。

次に、試験管内至適条件を基に、GIC を 1 次運動野 (運動に関わる脳領域) 付近に移植したマウスで神経系細胞分化誘導と GIC 除去を行い、“**GBM 丸ごと組織正常化**”の程度について組織切片の免疫染色により判断する (図 1 C)。化合物は、移植部位への直接注入、髄腔内への投与、脳室カテーテルを用いて脳室内への投与を行い、至適条件を決定する。正常脳組織誘導と GIC 除去が確認された条件で、化合物投与による運動機能の回復についても検討する。運動機能の回復度は、ビデオ行動解析により判定する。

## 4. 研究成果

### (1) GIC から神経系細胞分化を誘導する化合物の決定とその生体内有効濃度・投与方法の決定

現在までに報告されている神経系分化誘導化合物を購入し、GIC から最も効率よく神経細胞とオリゴデンドロサイト分化を誘導する化合物をそれぞれ 1 種類決定した。次に、GIC 脳移植担癌マウスを使い、これら化合物の毒性試験と投与方法を検討した結果、腰椎穿刺による投与方法により GIC 脳腫瘍細胞が神経系細胞に分化すること、個体に急性毒性のない最大濃度を決定した (図 2)。次に、GIC を傷害する DHODH 阻害剤についても検討を行い、脳内に送達可能な腰椎穿刺を用いた最大有効濃度を決定した。



### (2) 分化誘導化合物の薬効メカニズム解析

決定した神経系細胞分化誘導化合物の薬効メカニズムは、報告されている論文で検討されているが、GIC に対する機能は不明である。このため、化合物により分化誘導した細胞の遺伝子発現プロファイルを作成し、分化に関わるメカニズム解析を行なった。その結果、神経細胞分化については、以前報告されていない成熟神経細胞で働いている因子 (シナプス形成因子等) の増加が確認された。またオリゴデンドロサイト分化では、脂質に関わる遺伝子群の増加を発見した。この結果は同定した化合物がミエリン形成の促進に働いていることを示唆している。

### (3) 脳腫瘍の正常化

GIC 脳腫瘍の正常組織化を目的として、神経系分化誘導薬と DHODH 阻害剤の投与方法を検討した結果、分化誘導薬→DHODH 阻害剤投与が最も多くの GIC 由来神経細胞数を保持し、未分化 GIC を除去できることを発見した。更に、これらの薬剤処理したマウス脳と薬剤未処理脳を比較検討した結果、薬剤処理脳腫瘍内のシナプス形成が増加していることを確認した。この結果は、脳腫瘍細胞が機能的な神経系細胞に分化していることを示している。また薬剤処理により GIC マーカー陽性細胞は激減していることから、GIC の除去にも成功していた。これらの結果は、分化誘導薬→DHODH 阻害剤の連続投与が、脳腫瘍を正常組織に変えることが可能であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kondo T	4. 巻 82
2. 論文標題 Glioblastoma-initiating cell heterogeneity generated by the cell-of-origin, genetic/epigenetic	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Semin Cancer Biol.	6. 最初と最後の頁 176-183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcancer.2020.12.003	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 Ai-Akashi Z, Zujur D, Kamiya D, Kato T, Kondo T, Ikeya M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Selective Vulnerability of Human-Induced Pluripotent Stem Cells to Dihydroorotate Dehydrogenase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front. Cell. Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 1089945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1089945	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toru Kondo
2. 発表標題 Novel genome-editing AAVs that selectively eradicate glioblastoma-initiating cells
3. 学会等名 6th European Congress on Neurology and Brain Disorders（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Kondo
2. 発表標題 Novel genome-editing AAVs that selectively eradicate glioblastoma-initiating cells
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022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
---------	---------