

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月25日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790305

研究課題名（和文） グリオブラストーマ幹細胞の stemness 維持に関わるプロテインキナーゼの解析

研究課題名（英文） Analysis of protein kinases involved in the maintenance of stemness of glioblastoma stem cells

研究代表者

砂山 潤 (SUNAYAMA JUN)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80466606

研究成果の概要（和文）：

本研究ではグリオブラストーマ幹細胞の維持に関わるプロテインキナーゼの探索を行った。その結果、PI3K/mTOR ならびに MAPK の関与が明らかになった。重要なことに、これら両経路は転写因子 FOXO3 のリン酸化を介する抑制によりグリオブラストーマ幹細胞を維持していることが明らかになった。これらの結果は、これらの分子がグリオブラストーマ幹細胞を標的とする治療におけるよい分子標的となる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we searched for protein kinases involved in the maintenance of glioblastoma stem cells and demonstrated critical roles for PI3K/mTOR and MAPK in glioblastoma stem cell maintenance. Significantly, PI3K/mTOR and MAPK acted on a common molecule, i.e., the FOXO3 transcription factor, whose activity was restrained through phosphorylation by these kinases in glioblastoma stem cells. Our results suggest that FOXO3 as well as these kinases could be rational molecular targets for stem cell-targeted glioblastoma therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：glioma, stemness

1. 研究開始当初の背景

(1) グリオブラストーマと幹細胞について：グリオブラストーマはヒトの癌で最も悪性度の高い腫瘍の1つである。近年の治療法の発展には目覚ましいものがあるが、グリオブラストーマは正常組織内へと浸潤性に広がっていて、全摘出が難しい。また、放射線や抗癌剤感受性は一般的に低く、手術後の平

均生存率が約1年と予後は非常に短期間のため、従来とは異なる画期的な治療法の開発が待たれる。

これまでに、グリオブラストーマを形成する細胞集団には、癌幹細胞と癌幹細胞から分化した腫瘍細胞（非癌幹細胞）が存在することがわかってきた。癌幹細胞の性質（stemness）には①自分自身を複製する能力【自己複製

能】、②前駆細胞を経て自分自身と形質が異なり、より分化度の高い腫瘍細胞を生み出す能力【多分化能】、③強い造腫瘍能があげられる。一方、癌幹細胞から分化した腫瘍細胞（非癌幹細胞）は分裂するものの、その回数は有限であり、造腫瘍能は低下していると考えられている。この癌幹細胞の性質（stemness）を変化させ、非癌幹細胞へ分化させることができれば、治療後再発の予防や残存する腫瘍増大の抑制、すなわち治療後の長期予後改善に結びつく可能性がある。その為には癌幹細胞の stemness 維持機構の解析、これに基づいた非癌幹細胞への分化誘導機構を明らかにすることが重要である。

(2) これまでの研究成果：

①PI3K-mTor シグナルによる stemness 維持機構の解析

プロテインキナーゼが癌細胞において特異的、または高レベルで発現していることが多いが、どのようなプロテインキナーゼが幹細胞を制御しているかはほとんど明らかになっていない。我々は A172 細胞株及び臨床検体の細胞を用いて、グリオブラストーマ幹細胞の選択的培養に成功している。これらの細胞を用いて種々のキナーゼ阻害剤が stemness の指標の一つである自己複製能に与える影響を調べた。その結果、Rapamycin (Rap:mTor 阻害剤) もしくは LY294002 (LY:PI3K 阻害剤) で癌幹細胞の自己複製能が低下することを見出した。また、Rap と LY の併用で、単剤よりもさらに自己複製能を低下させることを明らかにした。mTor と PI3K の dual inhibitor である NVP-BEZ235 (BEZ) でも同様の結果を得た。これは in vitro において PI3K-mTor シグナルが stemness の維持に重要である可能性を示唆している。

②分化誘導機構の解析

自己複製能が低下した細胞は分化しやすい状態の可能性がある。幹細胞から前駆細胞を経て分化様状態にまで至った癌幹細胞は、不可逆的に造腫瘍能を失っていることが期待されるが、癌幹細胞を分化した非幹細胞まで至らしめる分化誘導機構はほとんど不明である。我々は A172 細胞株及び臨床検体の細胞で Rap と LY の併用ではじめて癌幹細胞が分化様状態になることを見出した。また mTor と PI3K の dual inhibitor である BEZ 処理でも同様の結果を得た。このことは mTor と PI3K の両方の阻害が幹細胞を単に幹細胞としての性質を軽減するのみならず、積極的に分化状態まで至らしめている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究ではグリオブラストーマの治療抵抗

性・難治性の原因として「グリオブラストーマ幹細胞(glioblastoma stem cell)」に着目し、グリオブラストーマ幹細胞が「幹細胞としての性質(stemness)」を維持させるための分子機構をプロテインキナーゼ阻害薬を用いたスクリーニングにより検討した。また、その結果に基づいて「幹細胞を非幹細胞化」できる分子標的薬剤を見出す。このような薬剤を用いることで治療後再発の鍵を握るグリオブラストーマ幹細胞の根絶を図り、グリオブラストーマの長期予後改善へつなげることを目標とした。

3. 研究の方法

PI3K-mTor シグナルがグリオブラストーマ幹細胞の stemness、特に造腫瘍能の維持に貢献する主要制御シグナルなのかを動物実験レベルで明らかにした。同時に stemness 維持における ERK シグナルの役割を検討を行った。また、培養細胞を用いて分化誘導因子の同定を行った。さらには同定した分化誘導因子の解析を行い、この因子が癌幹細胞を非癌幹細胞への分化に重要な因子かを明らかにした。

4. 研究成果

本研究ではまずグリオブラストーマ幹細胞において幹細胞形質と同様、それに密接に関連すると考えられる造腫瘍能がPI3K, mTORの制御を受けているかについて検討を行った。これまでの検討の結果、PI3K, mTORの阻害薬は単独でもある程度効果を示すものの、両者の併用でより効果的にグリオブラストーマ幹細胞を抑制することが確認されている。そこでPI3K, mTORの同時阻害がグリオブラストーマ幹細胞の造腫瘍能に与える影響を調べた。PI3K阻害剤単独、mTOR阻害剤単独、および両者の組み合わせで処理したグリオブラストーマ幹細胞をヌードマウスの皮下に移植して経過を観察したところ、両阻害剤で同時処理を行ったグリオブラストーマ幹細胞は単独処理よりも有意に腫瘍形成能が減弱していることが明らかになった。さらにPI3K, mTORの dual inhibitor であるNVP-BEZ235を用いて検討したところ、NVP-BEZ235は予想通りグリオブラストーマ幹細胞に分化を誘導したが、この分化細胞を薬剤のwash out後にヌードマウス頭蓋内に移植したところ、腫瘍増大の抑制ならびに生存期間の延長が観察されものの、その効果は限定的であった。そこでPI3K/mTOR経路以外のシグナル伝達経路の関与の可能性を調べたところ、プロテインキナーゼMAPKを介するシグナル伝達も同時にグリオブラストーマ幹細胞制御に関わっていることが明らかとなった。重要なことに、これら両経路は転写因子FOXO3のリン酸化を介してグリオブラストーマ幹細胞のstemnessと分化、造腫瘍能を調

節していることが判明した。これらの結果は、PI3K/mTOR経路、MAPK経路、転写因子FOXO3がグリオブラストーマ幹細胞を標的とする治療のよい分子標的となりうる可能性を示唆するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- 1) Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Tachibana K, Tomiyama A, Kayama T, Kitanaka C: MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis. *Stem Cells* 2011;29:1942-1951 (査読有)
- 2) Sunayama J, Sato A, Matsuda KI, Tachibana K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C: FoxO3a functions as a key integrator of cellular signals that control glioblastoma stem-like cell differentiation and tumorigenicity. *Stem Cells* 2011;29:1327-1337 (査読有)
- 3) Sunayama J, Matsuda KI, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C: Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Stem Cells* 2010;28:1930-1939 (査読有)
- 4) Sunayama J, Sato A, Matsuda KI, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C: Dual blocking of mTor and PI3K elicits a pro-differentiation effect on glioblastoma stem like-cells. *Neuro-Oncol* 2010;12:1205-1219 (査読有)

[学会発表] (計4件)

- 1) 佐藤篤, 砂山潤, 松田憲一朗, 立花研, 渡部江梨子, 清野静香, 鈴木香, 成田善孝, 渋井壮一郎, 富山新太, 北中千史,

嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における FoxO3a を介した分化と造腫瘍能の制御. 第29回日本脳腫瘍学会学術総会, 下呂(水明館); 2011年11月27日

- 2) Sato A, Matsuda KI, Sunayama J, Sakurada K, Tachibana K, Tomiyama A, Kitanaka C, Kayama T: MEK inhibition enhances temozolomide sensitivity of glioma stem-like cells via MGMT down-regulation. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋(名古屋国際会議場); 2011年10月3日
- 3) 佐藤篤, 松田憲一朗, 砂山潤, 清野静香, 鈴木香, 櫻田香, 立花研, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における MGMT 発現とテモゾロミド感受性に関する検討. 第28回日本脳腫瘍学会, 軽井沢(軽井沢プリンスホテル); 2010年11月28日
- 4) Sunayama J, Matsuda KI, Sato A, Tachibana K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C: Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the regulation of stemness of glioblastoma stem cells. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪(大阪国際会議場); 2010年9月24日

6. 研究組織

(1)研究代表者

砂山 潤 (SUNAYAMA JUN)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 80466606