

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19943

研究課題名（和文）画期的がん治療戦略に向けたグリオーマ幹細胞による不均一性出現メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the emergence mechanism of heterogeneity by glioma stem cells for a breakthrough cancer treatment strategy

研究代表者

須藤 亮（Sudo, Ryo）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：20407141

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：グリオーマは悪性度の高い脳腫瘍の一種であり、新たな治療戦略の開発が求められている。グリオーマ幹細胞の三次元培養を行うと、培養初期には幹細胞マーカーを発現する均一な細胞集団が観察されるが、浸潤プロセスにしたがって分化マーカーを発現する細胞が混在した不均一な細胞集団が形成される。本研究では、グリオーマの新たな治療戦略を開発するために、この不均一性の出現メカニズムを検討し、特定の受容体を介したシグナルが重要であ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

グリオーマは悪性度の高い脳腫瘍の一種であり、治療を難しくしている原因の1つにグリオーマ幹細胞に起因するがんの不均一性がある。この不均一性が出現するメカニズムを明らかにすることができれば、がんの不均一性を無くすことも可能になり、新たな治療法の開発につながる。本研究では、不均一性の出現を仲介するメカニズムの一部を明らかにした点に学術的意義があり、この発見を元にさらに研究を推進し、不均一性の出現を仲介する因子が特定されると新たな治療法の開発につながる点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Glioma is a type of brain tumor with high malignant potential, and there is a need to develop new therapeutic strategies. When glioma stem cells are cultured in three-dimension, a homogeneous population of cells expressing stem cell markers is observed in the early stages of culture, but following the invasion process, a heterogeneous cell population mixed with cells expressing differentiation markers is formed. In this study, we investigated the mechanism of the emergence of this heterogeneity and identified the importance of specific receptor-mediated signals in developing new therapeutic strategies for gliomas.

研究分野：細胞バイオメカニクス、ティッシュエンジニアリング

キーワード：不均一性 グリオーマ

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マイクロ加工によって作製したマイクロ流体デバイスを用いた独自の三次元培養法を開発し (Shin *et al.*, 2012, *Nat Protoc*) 生体工学の立場からがん細胞の浸潤メカニズムを解き明かす研究に従事してきた。研究を開始した当初は、肝細胞癌の細胞株 HepG2 を用いてがん細胞の浸潤を調べてきたが (Kalchman *et al.*, 2014, *Microfluid Nanofluid*) 近年は生体内のがんを生体外で忠実に再現するがん幹細胞を用いて研究を進めている。特に、浸潤能力が高く、有効な治療法が確立されていない悪性脳腫瘍に着目し、グリオーマ幹細胞を用いて研究を進めている。これまでの研究で、グリオーマ幹細胞が血管との相互作用によって浸潤が誘導されることや (Chonan *et al.*, 2017 *Integr Biol*) 間質流によって下流方向に浸潤が誘導されることなどを明らかにしてきた (Namba *et al.*, 2021, *Tissue Eng Part A*)。また、これらの浸潤プロセスにおいてグリオーマ幹細胞が未分化細胞と分化細胞の混在した不均一な細胞集団を形成することを見出している。グリオーマ幹細胞は薬物治療や放射線治療に対する抵抗性があることが知られており (Osutka *et al.*, 2017, *J Clin Invest*) グリオーマ幹細胞に起因する不均一性が治療を困難にしている。そこで、研究代表者が培養で再現したグリオーマの不均一性について、その詳細な出現メカニズムを解明することがグリオーマの画期的な治療戦略の開発につながると考えた。実際、がん幹細胞を分化させる新しいがんの治療戦略が期待されている (Arima *et al.*, 2020, *Cancer Sci*)。これまでの研究で、研究代表者はグリオーマ幹細胞が培養中で不均一性を出現することを見出してきたが、不均一性が出現するメカニズムについては未解明のままになっていた。しかし、最近の研究で細胞密度の高い浸潤後方において分化細胞が出現することに着目し、細胞分泌因子が局所に蓄積し、不均一性の出現に関与することを突き止めた。以上の経緯から、グリオーマ幹細胞を高密度で培養した培養上清から、グリオーマ幹細胞の分化に寄与する因子を特定することで、不均一性の出現メカニズムの全貌を解明する研究構想に至った。

2. 研究の目的

研究代表者は、最も悪性度の高い脳腫瘍 (グレード IV グリオーマ: グリオブラストーマ) の新たな治療戦略の開発を目指し、生体工学の立場からがん細胞の浸潤メカニズムを調べてきた。グリオブラストーマは、多種多様な形態の細胞によって構成されており、この不均一性が悪性度に関与していると考えられている。がんの不均一性が生じるのは、正常組織だけでなく、腫瘍組織にも幹細胞が存在し、がん幹細胞が様々な子孫細胞を生み出すためであると考えられている。この概念に基づき、神経幹細胞にがん遺伝子を過剰発現させることによってグリオーマ幹細胞が樹立された (Sampetean *et al.*, 2011, *Neoplasia*)。研究代表者は、マイクロ流体デバイス (図 1A) を用いたグリオーマ幹細胞の三次元培養システムを開発し、培養初期には幹細胞マーカー (nestin) を発現する均一な細胞集団が観察されるが (図 1B)、コラーゲンゲル内部に浸潤した細胞集団では、分化マーカー (GFAP) を発現する細胞が混在した不均一な細胞集団が形成されることを見出した (Chonan *et al.*, 2017 *Integr Biol*; Namba *et al.*, 2021, *Tissue Eng Part A*) (図 1C)。グリオーマの新たな治療法を開発するためには、この不均一性の出現メカニズムを解明する必要があるが、そのメカニズムについては長い間明らかになっていなかった。しかし、最近の研究で、細胞密度の高い浸潤後方において分化細胞が出現することに着目し、細胞分泌因子が局所に蓄積し、不均一性の出現に関与することを突き止めた。そこで、本研究では、この発見を足掛かりにして、不均一性を出現させる細胞分泌因子を特定し、グリオーマ幹細胞の不均一性出現メカニズムを解明することを目的とした (図 1D)。

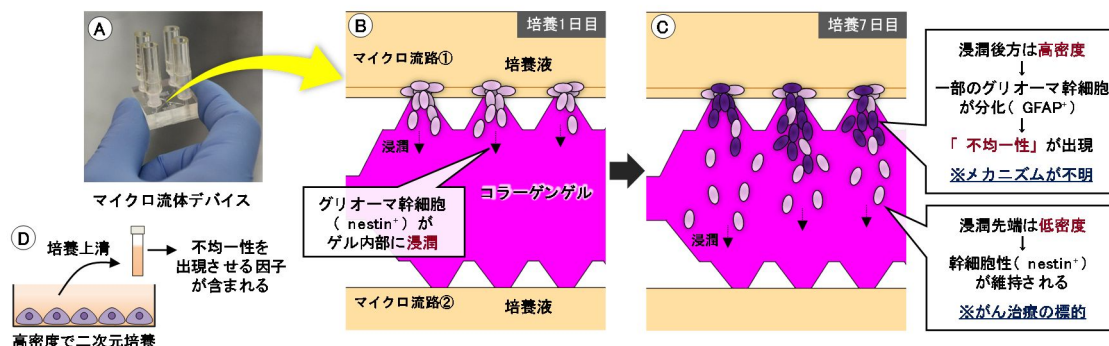


図 1 マイクロ流体デバイスで観察されるグリオーマ幹細胞の不均一性

3. 研究の方法

(1) 培養デバイスの作製と細胞培養

マイクロ流体デバイスを用いたグリオーマ幹細胞の三次元培養を行い、浸潤プロセスを解析した。マイクロ流体デバイスはフォトリソグラフィ法によってマイクロ加工した鋳型を用いて、シリコーンゴムにマイクロ流路を転写し、カバーガラスとプラズマ接着させることによって作製した。

(2) 不均一性を出現させる因子の特定

網羅的および選択的解析の両面から「グリオーマの不均一性」の出現に寄与する細胞分泌因子を探索した。

網羅的解析(マイクロアレイ解析): 研究代表者の予備的な知見より、高密度で培養したグリオーマ幹細胞の培養上清によってグリオーマ幹細胞が分化することがわかっている。そこで、培養上清に含まれる分泌因子を網羅的に解析するマイクロアレイ解析を行い、グリオーマ幹細胞の分化に関与する因子を絞り込んだ。

選択的解析(シグナル伝達経路阻害): 細胞の生存や細胞死、増殖、ストレス応答など、細胞運命に関わる基本的なシグナル伝達経路(PI3K経路、ERK経路、p38経路、JNK経路)の阻害実験を行い、各経路の阻害剤(LY294002、SB203580など)を添加した際にグリオーマ幹細胞の分化状態がどのように変化するのが免疫蛍光染色によって調べた。分化誘導に関与している経路を特定し、当該経路の上流にあるシグナル因子(増殖因子やサイトカインなど)を調べた。

4. 研究成果

本研究は3つのステップに分けて研究を遂行し、最終的にグリオーマ幹細胞が浸潤する際に不均一性が出現するメカニズムに関与する重要な細胞分泌因子を特定することを目指した。まず、ステップ1では、培養デバイスの作製と細胞培養を行い、マイクロ流体デバイスを用いたグリオーマ幹細胞の三次元培養システムを構築した。このシステムを用いてグリオーマ幹細胞の浸潤プロセスを観察すると、浸潤先端部のグリオーマ幹細胞は幹細胞性を維持している一方で、浸潤後方の細胞は分化した細胞が分布する不均一性を有することを確認した。以上より、グリオーマ幹細胞の三次元浸潤モデルを構築することができた。次にステップ2として、不均一性を出現させる因子の網羅的解析による特定に取り組んだ。具体的には、高密度および低密度で培養したグリオーマ幹細胞のマイクロアレイ解析を行い、グリオーマ幹細胞の発現変化について網羅的に調べた結果、不均一性を誘導する候補として3つの因子をリストアップした。さらに、これらの因子がグリオーマ幹細胞の分化に与える影響を調べたところ、TGF- β 1がグリオーマ幹細胞の分化を誘導することを見出した。また、TGF- β 受容体阻害剤を添加すると、浸潤根本部で分化する細胞が消失し、不均一性が失われた。すなわち、グリオーマ幹細胞による不均一性出現メカニズムにはTGF- β 受容体を介したシグナル伝達が重要であることがわかった。

ここまでの研究で、グリオーマ幹細胞による不均一性出現メカニズムにはTGF- β 受容体を介したシグナル伝達が重要であることまでは明らかになっているため、ステップ3として、TGF- β 受容体のリガンドとしてグリオーマ幹細胞が何を分泌しているのかという点について調べた。TGF- β 受容体阻害剤として用いたSB431542には、TGF- β 受容体であるALK4、ALK5、ALK7を阻害する効果がある。したがって、これら3つのうち、どの受容体がグリオーマ幹細胞の分化に重要な役割を果たしているかという点について調べた。まず、siRNAを用いてグリオーマ幹細胞におけるALK4、ALK5、ALK7の発現を個別に阻害し、グリオーマ幹細胞の分化に与える影響を調べた。その結果、ALK4を阻害した場合に、浸潤後方におけるグリオーマ幹細胞において分化マーカーの発現が減少した。一方で、ALK5およびALK7を阻害した時には分化マーカーの発現に大きな変化がなかった。さらに、siRNA以外の方法でALK5を阻害する方法として阻害剤を用いた方法を検討した。ALK5のみを阻害する試薬はなかったが、ALK4およびALK5を阻害する試薬があり、この阻害剤を添加すると、浸潤後方におけるグリオーマ幹細胞において分化マーカーの発現が顕著に減少した。ALK5はsiRNAを用いた阻害実験では、グリオーマ幹細胞の分化マーカーの発現に影響を与えなかったことから、ALK4が阻害されたことによって浸潤後方におけるグリオーマ幹細胞において分化マーカーの発現が顕著に減少した可能性が高いと考えられる。以上より、TGF- β 受容体のリガンドとしてグリオーマ幹細胞が分泌している因子は、ALK4のリガンドであることを見出した。したがって、ALK4のリガンドを用いてグリオーマ幹細胞を分化誘導することが可能になると、グリオーマ幹細胞の不均一性が消失することが予想される。この成果は、グリオーマの分化状態を人工的に調節する点に着目したまったく新しい治療戦略の開発につながる可能性がある。

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 0件）

1. 著者名 Chonan Yuta, Yamashita Tadahiro, Sampetrean Oltea, Saya Hideyuki, Sudo Ryo	4. 巻 28
2. 論文標題 Spatial Heterogeneity of Invading Glioblastoma Cells Regulated by Paracrine Factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 573 ~ 585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2021.0168	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7件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 土屋正憲、植林葵、山下忠紘、須藤亮
2. 発表標題 間質流により誘起されるグリオーマ幹細胞の浸潤における機械刺激受容型イオンチャネルの役割の検証
3. 学会等名 日本機械学会 第35回 バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Sudo, Masanori Tsuchiya, Mamoru Uebayashi, Tadahiro Yamashita
2. 発表標題 Invasion of glioma stem cells induced by interstitial flow in a microfluidic device
3. 学会等名 6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須藤亮
2. 発表標題 間質流に応答するグリオーマ幹細胞の浸潤機構
3. 学会等名 日本機械学会第34回バイオエンジニアリング講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須藤亮
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いたがん細胞集団の浸潤アッセイ
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Sudo
2. 発表標題 Invasion of heterogeneous glioma cell populations in a microfluidic device
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sho Fujimura, Yuta Chonan, Tadahiro Yamashita, and Ryo Sudo
2. 発表標題 Effect of Notch Signaling on the Differentiation of Glioma Stem Cells at the Invasion Root
3. 学会等名 IEEE EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤村 匠、増満 美玲名、長南 友太、山下 忠紘、須藤亮
2. 発表標題 マイクロ流体デバイス内の浸潤後方におけるグリオーマ幹細胞の分化にNotchシグナル経路が与える影響
3. 学会等名 日本機械学会第33回バイオフィロンティア講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科須藤研究室
<http://www.sudo.sd.keio.ac.jp>

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