

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390343

研究課題名(和文) 膠芽腫の分子標的治療耐性関連遺伝子群の機能解析とそれに基づく新規治療法の創出

研究課題名(英文) Functional analysis of a set of genes related to the molecular targeted therapy resistance in glioblastoma and the development of novel therapeutic strategies

研究代表者

武笠 晃丈 (Mukasa, Akitake)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90463869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：治療困難な悪性神経膠腫(膠芽腫)に対しては、がん遺伝子である上皮成長因子受容体を標的とした治療が行われているが、腫瘍は治療抵抗性である。本研究では、この治療抵抗性に関連しているとして以前に同定し命名したSDeltaE遺伝子群につき、さらなる機能解析を施行した。これにより、SDeltaE遺伝子のいくつかは、脳腫瘍幹細胞に高発現していることが明らかとなった。また、この発現を抑制すると腫瘍増殖や浸潤が抑制されることが確認され、悪性脳腫瘍の新規治療標的として期待された。

研究成果の概要(英文)：Molecular targeted therapy against epidermal growth factor receptor (EGFR) had been tested for malignant gliomas (glioblastomas), however, the efficacy was limited since the tumors rapidly became resistant to the targeted therapy. In this study, we analyzed the function of a set of resistance-related genes that we identified in the previous study and called "SDeltaE" (the substitute for Delta EGFR expression). Some of candidate SDeltaE genes were revealed to be upregulated in glioma-initiating cells. Inhibition of these SDeltaE led to suppression of tumor cell growth and invasion. Hence, these genes were expected to be the novel targets in malignant gliomas.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 分子標的治療 治療耐性 EGFR 腫瘍幹細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫の中でも特に primary glioblastoma でその増幅や変異が高頻度に認められる上皮性増殖因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; EGFR) は、魅力的な分子標的治療の対象として、現在まで様々な標的療法が試みられているが、期待されるほどの結果は未だ得られておらず、なお一層の基礎研究を含めた探求が必要と考えられる (Furnari FB, ..., Mukasa A et al. Malignant Glioma: Genetics, Biology and Paths to Treatment. Genes Dev 2007) (Inda MM, Bonavia R, Mukasa A et al. Tumor Heterogeneity is an Active Process Maintained by a Mutant EGFR-induced Cytokine Circuit in Glioblastoma. Genes Dev 2010)。

研究代表者はこのため、膠芽腫の establishment 時に必要であった遺伝子異常が、形成された腫瘍の維持増殖に依然必要かどうかという分子標的治療に必須の課題の検証目的に、DeltaEGFR の発現を doxycycline にて on-off できる膠芽腫細胞株を作成した (Huang PH, Mukasa A et al. PNAS 2007)。そして、この細胞株を移植して形成したヌードマウス皮下腫瘍の増殖が、DeltaEGFR の発現をマウス飲水中の doxycycline にて抑制すると停止することから、DeltaEGFR は腫瘍形成後の増殖維持にも必要であることを示した。さらに、DeltaEGFR の発現を失った腫瘍の増殖は一旦停止するが、一定の静止期を経て DeltaEGFR 非依存性の増殖能を獲得して再増大してくることが観察され、これが正に分子標的治療に対する耐性獲得能を解析する良い動物モデルになると考えられた。このような耐性獲得のメカニズムは分子標的薬の combination therapy などの治療戦略を考える上でも、临床上非常に大切な点である。原因として、EGFR シグナルの遮断を行っても代替となるシグナル伝達経路が活性化された細胞群が台頭して治療抵抗性の獲得にいたるなど、様々な仮説が提示されつつあるが未だ解決されていない (Wykosky J, Mukasa A et al. Cell cycle 2010)。

そこで、この耐性獲得過程が明らかになれば、より効果的な治療法の開発に結びつくと考え、マイクロアレイやプロテオミクスなどのスクリーニング手法を用いて耐性に関連する遺伝子群を同定し、それらを Substitute for DeltaEGFR Expression (SDeltaEs) と呼んだ (図1)。また、これが実際に、DeltaEGFR 非依存性の増殖能に関与していることの証明を行った (Mukasa A et al. PNAS 2010)。SDeltaEs には、特に 5~10 程の興味深い分子がその中には含まれ、実際にヒト悪性神経膠腫やその腫瘍幹細胞にても高発現しているものを複数含んでいて、患者予後との関連も preliminary な解析から示唆されているが、これらの分子の働きや相互関係などは未だ明らかでない。

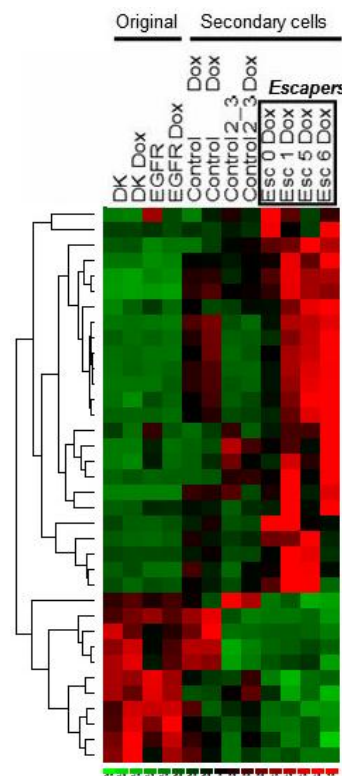


図1: Microarray revealed genes that potentially substitute for Delta EGFR expression.

(最右列のクラスター4 検体で高発現 (赤) で示す遺伝子を SDeltaE 遺伝子と呼んだ)

2. 研究の目的

研究代表者は、膠芽腫に高発現する変異型 EGF 受容体 (DeltaEGFR) に対する標的治療の耐性獲得マウスモデル確立し、その解析から DeltaEGFR の腫瘍原性を担う機能を代替しうる分子標的治療の耐性関連遺伝子群を新たに同定し、これらの遺伝子を SDeltaE (substitute for DeltaEGFR expression) と名付けた (Mukasa et al. PNAS 2010)。なかでも機能未知の遺伝子 SDeltaE-1/KLHDC8A は、ヒト悪性神経膠腫と、特にその腫瘍幹細胞に高発現しており、患者予後とも密接に関連していた。また、その機能抑制によりマウスでの腫瘍増殖が著明に抑制されることを示した。

本研究では、この SDeltaE-1 及びその他 SDeltaE 遺伝子群の腫瘍原性に寄与する機能を、脳腫瘍幹細胞などを用いた解析で明らかにするとともに、これら分子とそのシグナル伝達経路を標的とした新規治療法の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) これまでに同定した既知及び未知の、分子標的治療耐性に関連する遺伝子群 (SDeltaEs) の発現が、脳腫瘍細胞株、ヒト悪性神経膠腫臨床材料、ヒト正常組織、患者より単離・培養した脳腫瘍前駆細胞様細胞株 (脳腫瘍幹細胞) において上昇しているか (もしくは活性化を受けているか) を、遺伝

子および蛋白レベルで明らかにし、臨床材料では、実際の患者の治療経過・予後の情報などとの関連を調査する。また、これら遺伝子群の変異の有無を主に上記の臨床検体を用いて確認し、既知の遺伝子変異との関連を解析する。

(2) SDeltaE 遺伝子群のうち機能が明らかでない分子は、その働きを阻害または活性化させることで、腫瘍の増殖が抑制または促進されるかを、in vitro 及びヌードマウスにおける腫瘍形成能などを指標に解析し、新たな標的治療となるべき遺伝子の候補を絞り込む。また、腫瘍増殖能に関連していることが判明した分子に対して、EGFR との combined targeted therapy を該当する細胞株に対して、in vitro 及び in vivo で行い、臨床応用への可能性を探る。

(3) SDeltaE 遺伝子の機能解析を行い、脳腫瘍での特に in vivo における腫瘍原性のメカニズムの探求を行う。SDeltaE シグナルの果たす機能的役割を、分子の局在や相互作用、下流のシグナル経路の解析などにより特定し、その EGFR シグナル経路との相同性を調べる。また、SDeltaE 遺伝子群のなかでも特に SDeltaE-1 遺伝子に関しては、これが脳腫瘍幹細胞や神経幹細胞に高発現であることから、これらの細胞内での機能解析により、これらの(腫瘍)幹細胞の維持・増殖・分化に及ぼす影響を細胞生物学的に解析する。

4. 研究成果

(1) SDeltaE 遺伝子の悪性神経膠腫(膠芽腫)及び腫瘍幹細胞での発現上昇の確認

①神経膠腫臨床材料における SDeltaE 発現解析を行うにあたり、東京大学脳神経外科及びその研究協力施設の脳腫瘍臨床検体の基本的な遺伝子やゲノム異常の解析をまず行った。なかでも、神経膠腫に異常の頻度が高いと知られている、IDH 遺伝子、TP53 遺伝子の変異や染色体 1p19q のヘテロ接合性の消失(LOH)、MGMT プロモーターメチル化(MSP法による)などについての解析を施行して、それぞれの異常の頻度や相互関連を明らかにすることで、SDeltaE 発現解析をする臨床検体の特徴を精査した。

これらの研究途上において、特に星細胞腫においては、ATRX 遺伝子の変異が、乏突起膠腫においては CIC 遺伝子、FUBP1 遺伝子の変異、小児膠芽腫においては H3.3 をコードする H3F3A 遺伝子の変異が高頻度ということが報告されたため、一部の検体においてはこれらも確認し、これまでの報告と矛盾のないことを明らかにした。H3F3AK27M の変異解析に関しては、およそ 50 才以下の視床の悪性神経膠腫患者では、高率に H3F3A K27M の変異が認められるのに対し、50 才以上の患者では、ほとんど認めないことが明らかとなった。

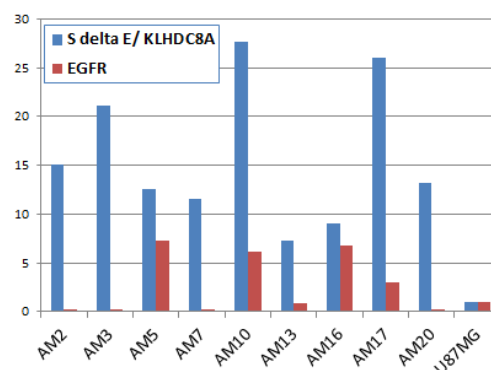
また、近年発見された TERT 遺伝子プロモーターの変異解析も施行した。これにより、IDH1 変異を持たない悪性度の高い膠芽腫に TERT 遺伝子プロモーター変異が高率に認められることが明らかとなった。

②SDeltaE 遺伝子発現解析をする対象としての、脳腫瘍幹細胞株の樹立を悪性神経膠腫手術採取検体より順次行った。

さらに、これらの細胞株の性質を調べるために、WST assay により、in vitro での増殖確認実験を施行した。その後、マウス脳内への移植を行い、その腫瘍形成能につき検討を行った。これにより、腫瘍原性の高い株と低い株を数種類ずつ樹立することができた。

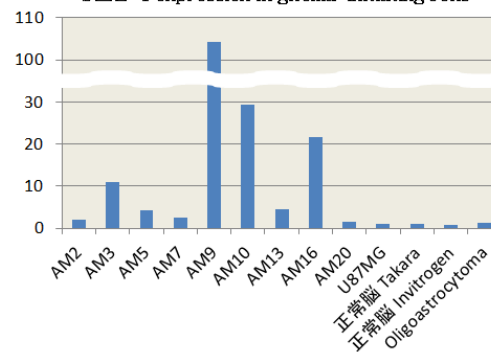
また、これらの細胞株において腫瘍原性の源になる EGFR の発現や、幹細胞性を反映する CD133 などのマーカーの発現を、定量的 PCR などにて確認した(下図)。さらに、MLPA 法により、これら腫瘍幹細胞における、がん遺伝子座の増幅の有無などを確認しパネルを作成した。

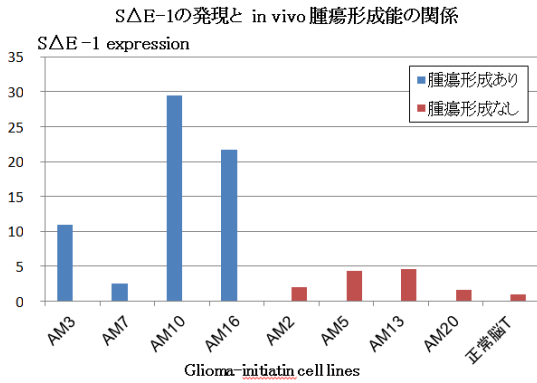
患者より樹立した脳腫瘍幹細胞株における SDeltaE-1とEGFRの比較



③以上のような、ヒト悪性神経膠腫臨床材料や患者より単離・培養した脳腫瘍幹細胞株に加え、対象となる正常組織や良性腫瘍を加えて、SDeltaEs 遺伝子について定量的 PCR などを用いてその発現を確認したところ、悪性度の高い組織において mRNA の発現量が高いことが、いくつかの SDeltaE 遺伝子において確認でき、また SDeltaE 1 遺伝子においては、腫瘍原性の高い脳腫瘍幹細胞株で、その発現が亢進していることが確認された。(下図)

SΔE-1 expression in glioma-initiating cells





(2) SΔeltaE 遺伝子群の機能解析

①SΔeltaE 遺伝子群のいくつかを用いて、その働きを阻害または活性化させることで、腫瘍の増殖が抑制または促進されるかを解析した。これにあたり、対象とするSΔeltaE 遺伝子の発現が高い細胞においては、その働きの阻害を shRNA 遺伝子導入により行い(下図)、また発現が低いものに対しては、ウィスルを用いた遺伝子導入にて活性化させることで、腫瘍の増殖が抑制または促進がされるかを、in vitro では MTT アッセイ、in vivo では、ヌードマウスにおける腫瘍形成能などを主な指標として解析した。

この結果、発現阻害により腫瘍の増殖能を減弱させるもの、浸潤能を減弱させる分子をそれぞれ同定することができた。

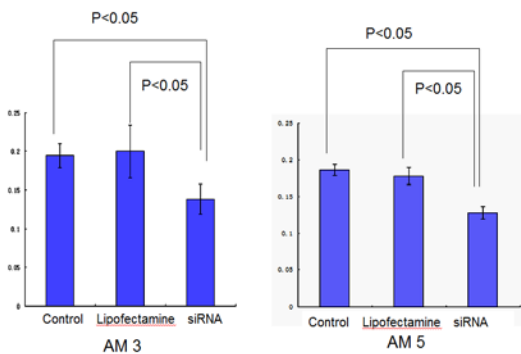
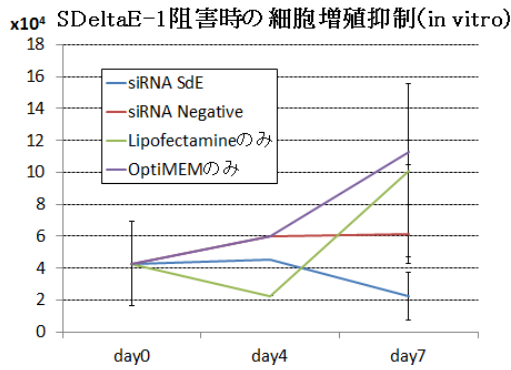


図:(上)SΔeltaE-1 遺伝子阻害時(siRNA)の増殖抑制
(下) SΔeltaE-2 遺伝子阻害時(siRNA)の浸潤抑制 (Boyden chamber assay)

②治療により耐性を得た実際の臨床検体をもちいたプロファイル変化の解析を行ったところ、治療耐性を得た腫瘍にはメチル化プロファイルの変化をきたしていることが明らかとなった。このような悪性化に伴うメチル化プロファイル変化が多数検体にて生じることを確認でき、今後 SΔeltaE 遺伝子発現との関連の検証が期待された。

(3) EGFR による悪性神経膠腫細胞増殖促進効果の in vivo 評価系の確立

膠芽腫の EGFR による増殖の促進は、in vitro の通常の培養条件下での実験では、判定困難なことが、これまでの予備実験にて予測されていた。そのため、in vivo での検証実験に供しうる新たな assay 系の確立に取り組んだ。具体的には、キトサンを初めとする基質を用いた 3 次元培養法による EGFR 遺伝子発現の有無による増殖速度の差の測定や、様々な腫瘍幹細胞培養条件下での、増殖における EGFR 発現の影響の評価などを行った。この結果、特定の条件下において、EGFR 発現の影響を in vitro においても良好に評価するという結果を得ることができた(下図)。

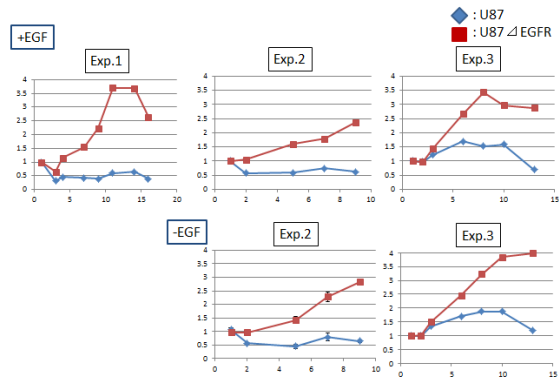


図:U87 細胞株 (U87 parental vs U87 EGFR delta 発現) の増殖率の比較 (WST assay) : 通常の血清存在下での 2 次元培養では、増殖に差がないが、特定の条件下では、EGFR を発現した細胞の増殖が有意に促進される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

① 武笠 晃丈

成人神経膠腫の分子生物学、脳 21、査読なし、17 巻、2014、49-56
DOI:なし

② Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T

PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells、Biochem Biophys Res Commun、査読有、444 巻、2014、12-18
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.138.

③ Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana, Jalbert, Nelson, Bollen, Gustafson, Charron, Weiss, Smirnov, Song, Olshen, Cha, Zhao, Moore, Mungall, Jones SJ, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger S, Chang SM, Taylor BS, Costello JF

Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma、Science、査読有、343 巻、2014、189-193

DOI: 10.1126/science.1239947

④ Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatsuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y, Shibui S, Aburatani H, Saito N

H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients、

Neuro Oncol、査読有、16 巻、2014、140-146

DOI: 10.1093/neuonc/not144

⑤ Mukasa A, Takayanagi S, Saito K, Shibahara J, Tabei Y, Furuya K, Ide T, Narita Y, Nishikawa R, Ueki K, Saito N

The significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients、Cancer Sci、査読有、103 巻、2012、587-592
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02175.x.

⑥ 武笠晃丈

悪性グリオーマにおける IDH 遺伝子変異、癌と化学療法、査読無、38 巻、2011、937-940
DOI:なし

⑦ 武笠晃丈

がんゲノムアトラスと脳腫瘍、脳神経外科速報、査読無、21 巻、2011、654-661

DOI:なし

⑧ Li M, Mukasa A, Inda MM, Zhang J, Chin L, Cavenee WK, Furnari F

Guanylate binding protein-1 is a novel effector of EGFR-driven invasion in glioblastoma、J Exp Med、査読有、208 巻、2011、2657-73

DOI: 10.1084/jem.20111102

⑨ Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y, Fukayama M, Saito N, Miyazono M, Aburatani H

Homozygously deleted gene DACH1

regulates tumor-initiating activity of glioma cells、Proc Natl Acad Sci U S A、査読有、108 巻、2011、12384-9

DOI: 10.1073/pnas.0906930108

[学会発表] (計 18 件)

① 武笠晃丈、齊藤邦昭、相原光輝、Brett E. Johnson、高柳俊作、大谷亮平、田中將太、上田 宏生、山本 尚吾、辰野 健二、永江玄太、島村徹平、成田善孝、永根基雄、西川亮、植木敬介、宮野悟、Joseph F. Costello、油谷浩幸、齊藤延人 神経膠腫の悪性化に伴うジェネティック・エピジェネティックな進歩、第 31 回日本脳腫瘍学会、2013 年 12 月 08 日~2013 年 12 月 10 日、フェニックス・シーガイア・リゾート (宮崎県・宮崎市)

② Akitake Mukasa, Akira Watanabe, Hideki Ogiwara, Nobuhito Saito, Hiroyuki Aburatani、Tumor suppressive role of DACH1 in glioblastoma stem-like cell、The 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology (WFNO)/ the 18th Annual Society for Neuro-Oncology (SNO) Meeting、2013 年 11 月 22 日~2013 年 11 月 25 日、San Francisco (USA)

③ 武笠晃丈、齊藤邦昭、相原功輝、高柳俊作、大谷亮平、田中將太、上田 宏生、山本 尚吾、辰野 健二、永江玄太、島村徹平 Teppei Shimamura、成田善孝、永根基雄、西川亮、植木敬介、宮野悟、油谷浩幸、齊藤延人、神経膠腫の悪性化に伴うジェネティック・エピジェネティックな変化、第 71 回日本脳神経外科学会総会、2013 年 10 月 16 日~2013 年 10 月 18 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

④ Akitake Mukasa、The Epigenetic Profiling of Malignant Gliomas、The XV WFNS World Congress of Neurosurgery、2013 年 09 月 08 日~2013 年 09 月 13 日、Seoul (Korea)

⑤ Akitake Mukasa、The Identification of Therapeutic Targets for Glioma through Genetic and Epigenetic Profiling、The 23rd Annual Meeting of the Korean Brain Tumor Society、2013 年 06 月 29 日、Daegu (Korea)

⑥ 武笠晃丈、Low grade glioma の分子診断と治療への応用、2012 年 11 月 25-27 日、第 30 回日本脳腫瘍学会、グランドプリンスホテル広島 (広島県・広島市)

⑦ 武笠晃丈、Low grade glioma の分子診断と治療への応用、2012 年 10 月 17-19 日、第 70 回日本脳神経外科学会総会、大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

⑧ 武笠晃丈、がんゲノムプロジェクト進行とともに急拡大する脳腫瘍の遺伝子異常の新知見とその臨床的意義、第 18 回多摩脳腫瘍研究会、2012 年 10 月 6 日、三鷹産業プラザ（東京都・三鷹市）

⑨ 武笠晃丈、組織型、悪性度、随伴する遺伝子異常により異なる悪性神経膠腫における IDH 変異の意義、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19-21 日、ロイトン札幌（北海道・札幌市）

⑩ Akitake Mukasa、Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells、19th International Brain Tumor Research and Therapy Conference、2012 年 6 月 22 日、Niagara Falls (Canada)

⑪ Akitake Mukasa、Genetic and Molecular Profiling of Malignant Gliomas、9th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology、2012 年 4 月 22 日、Taipei (Taiwan)

⑫ 武笠晃丈、オミックス解析技術が拓く悪性神経膠腫に対する個別化治療の可能性、第 7 回 脳腫瘍の基礎シンポジウム、2012 年 3 月 24 日、大手町サンケイプラザ（東京都・千代田区）

⑬ Akitake Mukasa、Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells、The 16th Korea-Japan Cancer Research Workshop、2011 年 12 月 10 日～11 日、Hokkaido University School of Medicine Alumni Hall “Frate”（北海道・札幌）

⑭ 武笠晃丈、悪性神経膠腫における変異型 EGF 受容体に対する分子標的療法とその治療耐性獲得機構、第 29 回日本脳腫瘍学会、2011 年 11 月 28 日～30 日、下呂温泉水明館（岐阜県・下呂市）

⑮ 武笠晃丈、Gene Profiling of Malignant Brain Tumors -The Present Status and Next Step-、第 24 回国際がん研究シンポジウム、2011 年 11 月 23 日～25 日、国立がん研究センター・国際研究交流会館（東京都・中央区）

⑯ 武笠晃丈、Low grade glioma の遺伝子変異解析の診断と治療への貢献、第 69 回日本脳神経外科学会総会、2011 年 10 月 12 日～14 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

⑰ 武笠晃丈、悪性グリオーマにおける IDH 遺伝子変異と染色体 1p19qLOH および p53 変異の関連とその意義、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日～5 日、名古屋国

際会議場（愛知県・名古屋市）

⑱ 武笠晃丈、治療戦略立案のために有用な神経膠腫 grade 2/3 の遺伝子診断、第 41 回ニューロ・オンコロジーの会、2011 年 8 月 7 日、東京女子医科大学・早稲田大学連携先端生命医科学研究教育施設 (TWIns)（東京都・新宿区）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/neurosurg/research/kenkyu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武笠 晃丈 (MUKASA, Akitake)
東京大学・医学部付属病院・講師
研究者番号：9 0 4 6 3 8 6 9

(2) 研究分担者

齊藤 邦昭 (SAITO, Kuniaki)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：5 0 4 4 6 5 6 4

田中 実 (Tanaka, Minoru)
東京大学・医学部付属病院・助教
研究者番号：5 0 3 3 2 5 8 1
（平成 23 年度まで）

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大谷 亮平 (Ohtani, Rhyohei)
小俣 麻友 (Omata, Mayu)