

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390338

研究課題名(和文) グリオブラストーマ根治を目指すグリオーマ幹細胞研究総合戦略

研究課題名(英文) A systematic approach to achieve glioblastoma cure via targeting glioma stem cells

研究代表者

北中 千史 (KITANAKA, Chifumi)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70260320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

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を非幹細胞に分化誘導できる薬剤の探索を行った。その結果、糖尿病治療薬であるメトホルミンがFoxO3a活性化によりグリオブラストーマ幹細胞を非幹細胞化することを見出した。また、グリオブラストーマ幹細胞維持にシグナルキナーゼJNKが必須の役割を果たしていることを見出し、JNK阻害薬がグリオブラストーマ幹細胞を非幹細胞化する作用を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we searched for drugs that are capable of differentiating glioblastoma stem cells into non-stem glioblastoma cells. Here we discovered that an anti-diabetic drug metformin induces the differentiation of glioblastoma stem cells into non-stem glioblastoma cells through the activation of FoxO3a. Furthermore, we discovered that JNK, a serine/threonine kinase implicated in cellular signaling, plays an essential role in the maintenance of glioblastoma stem cells and also demonstrated that a JNK inhibitor has a differentiation-inducing activity against glioblastoma stem cells.

研究分野：脳神経外科学、脳腫瘍学

キーワード：glioma-initiating cell

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療の重要なターゲットとしてがん幹細胞が注目を集めている。がん幹細胞は腫瘍細胞の「ごく一部に相当する小集団」であるが、治療抵抗性と腫瘍形成能を併せ持っているため治療後再発の原因となっており、「がんの治療を阻む最大要因」と考えられる。従ってヒトがんの中でも難治を極めるグリオブラストーマの「根治」を実現するうえで、この少数細胞集団であるグリオブラストーマ幹細胞の制御が必須不可欠のプロセスであることが認識されるようになってきた。

我々もそのような認識のもと、がん幹細胞制御を通じたグリオブラストーマの根治を目標に研究を進めてきた。その結果これまでに幹細胞マーカーCD133の発現がグリオブラストーマの播種リスクの予測に有用であること(*Neurosurg Rev* 33:175, 2010)、従来直列的にシグナルを伝達すると考えられてきたPI3KとmTORが予想外なことに神経幹細胞では並列かつ redundant な様式で幹細胞維持に寄与していること(*Neurosci Lett* 470:115, 2010)、グリオブラストーマ幹細胞でも同様な機序でPI3KとmTORが幹細胞維持に働いており、PI3KとmTORの同時阻害により初めて効率よく幹細胞形質/造腫瘍能が抑制されること(*Neuro-Oncol* 12:1205, 2010)、MAPK経路もPI3K/mTOR経路と redundant な様式でグリオブラストーマ幹細胞維持に関わっているが、両経路間に存在する相互抑制的なフィードバックメカニズムにより一方の阻害のみでは他方の活性化が生じるため、両経路の同時阻害にてはじめて効率的に幹細胞形質/造腫瘍能が抑制されること(*Stem Cells* 28:1930, 2010)、MAPKおよびPI3K経路が転写因子FoxO3aの活性化を抑制することでグリオブラストーマ幹細胞の維持に寄与していること(*Stem Cells* 29:1327, 2011)、MAPK経路がグリオブラストーマ幹細胞のMGMT発現制御を介してテモゾロミド抵抗性を賦与していること(*Stem Cells* 29:1942, 2011)などを相次いで見出した。本研究課題ではこういった一連の研究の流れを受けつつ、これまでの知見やその過程で確立したがん幹細胞に関する各種実験系を積極的に活用することで、グリオブラストーマ幹細胞を標的とする新たな治療薬を見出し、もってグリオブラストーマ根治につながる治療モデルを作成することを目指した。

2. 研究の目的

「背景」に述べたごとく、本研究ではこれまでの我々のグリオブラストーマ幹細胞研究の成果を活用しつつ、幹細胞性に与える影響を指標として薬剤のスクリーニングを行うこと等によりグリオブラストーマ幹細胞を標的とする新規治療薬を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

実験には患者腫瘍組織に直接由来するグリオブラストーマ幹細胞を用いた。目的とする遺伝子の機能抑制は、当該遺伝子に対するsiRNAや遺伝子産物に対する阻害薬を用いて行った。幹細胞マーカーや分化マーカー等の発現についてはウエスタンブロット法、フローサイトメトリー等の方法により検討した。自己複製能を評価するためスフィア形成アッセイを行った。がん幹細胞の腫瘍形成能はヌードマウス皮下に細胞を移植し、腫瘍の有無、形成された腫瘍の体積を経時的にモニターすることにより評価を行った。

4. 研究成果

研究開始当初の背景でも述べたように、これまでに我々は核内転写因子FoxO3aが活性化するとグリオブラストーマ幹細胞に対して分化を誘導するとともにその腫瘍形成能を抑制することを明らかにしてきた。そこでこのFoxO3aを活性化できる薬剤を探索した結果、我々は糖尿病治療薬であるメトホルミンがグリオブラストーマ幹細胞のFoxO3aを活性化する作用があることを見出した。さらにメトホルミンを用いた一連の検討の結果からはメトホルミンがグリオブラストーマ幹細胞治療薬として有望であることが示唆された。そこで実際の臨床応用を想定してメトホルミンとテモゾロミドの併用効果を脳腫瘍治療モデルを用いて検討したところ、それぞれの単独投与よりも併用投与で生存期間がさらに延長することが明らかになった。こういった前臨床試験結果に基づいてメトホルミンについては国立がん研究センター脳脊髄腫瘍科とともにグリオブラストーマを対象とした臨床試験の準備を進めており、臨床試験プロトコールがほぼ承認される段階に至っている。

また、我々はPI3K/MAPK-FoxO3a経路とは別個に、グリオブラストーマ幹細胞の幹細胞性維持に関わっている可能性のあるシグナル伝達経路の探索を行った。その過程で、グリオブラストーマ幹細胞と非幹細胞で比較したとき、JNK経路の活性が常に前者で高まっていることを見出した。そこでこのグリオブラストーマ幹細胞で活性化しているJNKの活性が幹細胞性の維持に必要なかを検討したところ、JNK活性の抑制によりグリオブラストーマ幹細胞が幹細胞性を喪失することが明らかになった。さらにヌードマウスを用いた異種移植実験においても、全身投与されたJNK阻害薬(SP600125)が有害事象を引き起こすことなく移植腫瘍中のがん幹細胞を枯渇することが確認され、JNK阻害薬がグリオブラストーマ幹細胞標的治療薬となる可能性が示唆された。しかしながら、動物実験に用いたSP600125はヒトに対する安全

情報が得られておらず、そのまま臨床展開することは困難と考えられた。そこで我々は臨床的安全性が不明な JNK 阻害薬 SP600125 に代わり既に臨床的安全性が確認されている JNK 阻害薬を対象としてグリオブラストマ幹細胞治療効果を有するものを探索した。その結果子宮内膜症治療薬として現在臨床開発が進行中の AS602801 にがん幹細胞治療効果があることを見出した。

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 17 件)

- 1) Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Sakaki H, Seino S, Seino M, Suzuki S, Kitanaka C: The novel JNK inhibitor AS602801 inhibits cancer stem cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* in press, 2016
doi:10.18632/oncotarget.8395. (査読有)
- 2) Seino M, Okada M, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Kuramoto K, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C: Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. *Oncol Rep* 2016;35(1):593-601
doi:10.3892/or.2015.4377. (査読有)
- 3) Sakaki H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Seino M, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C: GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells. *Anticancer Research* 2015;35(12):6607-6614 (査読有)
- 4) Seino M, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Takeda H, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C: Differential contribution of ROS to resveratrol-induced cell death and loss of self-renewal capacity of ovarian cancer stem cells. *Anticancer Research* 2015;35(1):85-96 (査読有)
- 5) Shibuya K, Okada M, Suzuki S, Seino M, Seino S, Takeda H, Kitanaka C: Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget* 2015;6(2):651-661 (査読有)
- 6) Suzuki S, Okada M, Shibuya K, Seino M, Sato A, Takeda H, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C: JNK suppression of chemotherapeutic agents-induced ROS confers chemoresistance on pancreatic cancer stem cells. *Oncotarget* 2015;6(1):458-470 (査読有)
- 7) Uzuka T, Asano K, Sasajima T, Sakurada K, Kumabe T, Beppu T, Ichikawa M, Kitanaka C, Aoki H, Saito K, Ogasawara K, Tominaga T, Mizoi K, Ohkuma H, Fujii Y, Kayama T; Tohoku Brain Tumor Study Group: Treatment outcomes in glioblastoma patients aged 76 years or older: a multicenter retrospective cohort study. *J Neurooncol* 2014;116:299-306 (査読有)
- 8) Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R: Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. *Cancer Res* 2014;74:3790-3801 (査読有)

- 9) Okada M, Shibuya K, Sato A, Seino S, Suzuki S, Seino M, Kitanaka C: Targeting the K-Ras - JNK axis eliminates cancer stem-like cells and prevents pancreatic tumor formation. *Oncotarget* 2014;5:5100-5112 (査読有)
- 10) Seino M, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C: Requirement of JNK signaling for self-renewal and tumor-initiating capacity of ovarian cancer stem cells. *Anticancer Res* 2014;34:4723-4731 (査読有)
- 11) Okada M, Sato A, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Suzuki S, Seino M, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: JNK contributes to temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via regulation of MGMT expression. *Int J Oncol* 2014;44:591-599 (査読有)
- 12) Sato A, Okada M, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem Cell Res* 2014;12:119-131 (査読有)
- 13) Okada M, Shibuya K, Sato A, Seino S, Watanabe E, Suzuki S, Seino M, Kitanaka C: Specific role of JNK in the maintenance of the tumor-initiating capacity of A549 human non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2013;30:1957-1964 (査読有)
- 14) Sato A, Okada M, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Resveratrol promotes proteasome-dependent degradation of Nanog via p53 activation and induces differentiation of glioma stem cells. *Stem Cell Res* 2013;11:601-610 (査読有)
- 15) Kitanaka C, Sato A, Okada M: JNK signaling in the control of the tumor-initiating capacity associated with cancer stem cells. *Genes Cancer* 2013;4:388-396 (査読有)
- 16) Matsuda K, Sato A, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Targeting JNK for therapeutic depletion of stem-like glioblastoma cells. *Sci Rep* 2012;2:516 (査読有)
- 17) Sato A, Sunayama J, Okada M, Watanabe E, Seino S, Shibuya K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:811-824 (査読有)
- [学会発表](計24件)
- 1) 北中千史: グリオーマ、固形がん幹細胞を標的とする治療法開発を目指したがん幹細胞研究. 第74回日本癌学会学術総会, 名古屋(名古屋国際会議場); 2015年10月8日
- 2) 北中千史: 臨床応用を目指したグリオーマ幹細胞研究. 第5回栃木ニューロオンコロジー研究会 特別講演, 宇都宮(宇都宮グランドホテル); 2015年7月30日
- 3) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹

- 細胞研究. 第1回北里大学悪性脳腫瘍研究会 特別講演, 相模原(北里大学); 2015年5月15日
- 4) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹細胞研究. 第50回大分脳腫瘍研究会 特別講演, 大分(アルメイダ病院研修会館); 2015年3月14日
- 5) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹細胞研究. 第15回日本分子脳神経外科学会ランチョンセミナー, 山形(大手門パルズ); 2014年9月25日
- 6) 北中千史: 糖尿病薬メトホルミンのグリオーマ幹細胞抑制作用. 第2回がん代謝研究会指定講演, 東京(東京理科大学葛飾キャンパス図書館大ホール); 2014年7月11日
- 7) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第32回日本脳腫瘍病理学会ランチョンセミナー, 徳島(徳島県郷土文化会館); 2014年5月24日
- 8) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第34回日本脳神経外科コンgres総会, 大阪(大阪国際会議場); 2014年5月17日
- 9) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹細胞研究 ~グリオーマ幹細胞を題材として~. 第23回泌尿器科分子・細胞研究会特別セミナー, 山形(霞城セントラル); 2014年3月15日
- 10) 北中千史: 臨床応用を見据えた悪性脳腫瘍がん幹細胞研究~がん根治療法開発を目指して~. 第6回秋田脳腫瘍セミナー特別講演, 秋田(イヤタカ); 2013年11月15日
- 11) 佐藤篤, 岡田雅司, 渋谷慶太, 清野静香, 成田善孝, 渋谷壮一郎, 北中千史, 嘉山孝正: レスベラトロールによる Nanog-p53 経路を介したグリオーマ幹細胞の制御. 第14回日本分子脳神経外科学会, 横浜(パシフィコ横浜); 2013年10月19日
- 12) 佐藤篤, 岡田雅司, 成田善孝, 渋谷壮一郎, 北中千史, 嘉山孝正: メトホルミンによる AMPK-FOXO3 経路を介したグリオーマ幹細胞の制御. 日本脳神経外科学会第72回学術総会, 横浜(パシフィコ横浜); 2013年10月17日
- 13) 岡田雅司, 渋谷慶太, 佐藤篤, 鈴木修平, 清野学, 北中千史: A549 非小細胞肺癌細胞の腫瘍形成能維持における JNK の特異的な役割. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜(パシフィコ横浜); 2013年10月3日
- 14) 北中千史: がん予防の今とこれから、そして未来のがん治療~がん幹細胞を標的とする新たながん治療の開発を目指して~. 日本体力医学会東北地方会第22回大会, 山形(山形県立保健医療大学); 2013年6月8日
- 15) 北中千史: 治療への応用を目指したグリオーマ幹細胞研究 --アップデート--. 第46回東北脳腫瘍研究会研究会特別講演, 仙台(江陽グランドホテル); 2013年4月6日
- 16) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第8回脳腫瘍の基礎シンポジウム特別講演, 東京(大手町サンケイプラザ); 2013年3月2日
- 17) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第2回 Multidisciplinary Meeting on Atherosclerosis 特別講演, 仙台(仙台トラストシティ); 2013年1月5日
- 18) 北中千史: グリオーマ幹細胞に着目した脳腫瘍研究 ~治療への応用を目指して~. 第1回 Neuro-Oncology West 研究会, 大阪(ヒルトン大阪); 2012年12月8日
- 19) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第7回鹿児島脳腫瘍セミナー特別講演, 鹿児島(城山観光ホテル); 2012年11

月 16 日

- 20) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第 5 回玄海脳腫瘍セミナー特別講演, 福岡 (ソラリア西鉄ホテル); 2012 年 7 月 6 日
- 21) 北中千史: グリオーマ幹細胞の維持に関わる分子機構. 第 3 回東京前立腺会議招待講演, 東京 (帝国ホテル); 2012 年 7 月 5 日
- 22) 北中千史: 脳腫瘍の cell biology ~グリオーマ幹細胞~ . 第 30 回日本脳腫瘍病理学会生涯教育セミナー, 名古屋 (名古屋国際会議場); 2012 年 5 月 25 日
- 23) 北中千史: グリオーマ幹細胞 ~診断/治療への応用を目指して~ . 第 45 回東北脳腫瘍研究会研究会特別講演, 仙台(江陽グランドホテル); 2012 年 4 月 7 日
- 24) 北中千史: グリオーマ幹細胞に着目した脳腫瘍研究 ~診断治療への応用を目指して~. 第 66 回山形脳神経外科懇話会特別講演, 山形 (パレスグラウンダー); 2012 年 1 月 28 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

北中 千史 (KITANAKA CHIFUMI)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 70260320

(2)研究分担者

根本 建二 (NEMOTO KENJI)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 10208291

(3)連携研究者

佐藤 篤 (SATO ATSUSHI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 30455901