

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462267

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍におけるゲノムグローバルなヒストン修飾制御因子の探索

研究課題名(英文) A search for regulators of global histone modification in malignant brain tumor

研究代表者

八幡 俊男 (YAWATA, TOSHIO)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：40380323

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)：膠芽腫幹細胞において高発現する遺伝子としてCD146を同定した。CD146は膠芽腫幹細胞の増殖に関与し、G2/M期で高発現し、発現低下するとG0/G1期の細胞を増加させることを明らかにした。膠芽腫幹細胞の代謝では、酸化的リン酸化が優位であり、分化細胞では解糖系が優位であることが分かった。膠芽腫細胞におけるCD146の発現低下は代謝を解糖系から酸化的リン酸化にシフトさせた。さらに、膠芽腫幹細胞においてヒストン脱アセチル化酵素の活性にCD146の発現は影響を与えた。CD146は幹細胞の増殖や糖の代謝経路に関与し、幹細胞性の維持や細胞分化に寄与するHDAC活性にも影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：CD146 was identified as a surface marker highly expressing in glioma stem cells. CD146 regulates cell growth of glioma stem cells and is highly expressed in G2/M phase and its knockdown increases the proportion of cells in G0/G1 phase. It has been revealed that mitochondrial oxidative phosphorylation is dominant in glioma stem cells in contrast to in differentiated glioma cells using mainly aerobic glycolysis. Knockdown of CD146 in glioma cells switched from aerobic glycolysis to mitochondrial oxidative phosphorylation. In addition, expression of CD146 affected histone deacetylase activity in glioma stem cells. These results suggest that CD146 expressed in glioma stem cells is related to the cell growth and glucose metabolism and may affect on HDAC activity involved in stemness and differentiation.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：悪性脳腫瘍 幹細胞 代謝

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、精力的な新規治療法の開発にも拘わらず、長い間、顕著な治療成績の向上が得られていない原発性脳腫瘍であり、平均余命は僅か1年数ヶ月である。この腫瘍の治療抵抗性は、放射線治療や化学療法への感受性の低さ、浸潤能の高さに起因している。悪性脳腫瘍には造腫瘍性に富む幹細胞が含まれ、悪性度の指標となる性質の多くを保持していることから治療標的として注目されている。これまでに報告されている癌関連遺伝子にはかなりの割合で幹細胞性遺伝子が含まれ、胚性幹細胞が膠芽腫と類似した発現プロファイルを示すことも報告されている。胚性幹細胞および神経幹細胞では全遺伝子の40~60%が発現し、分化細胞では10~20%しか発現していない事実に基づけば、膠芽腫は幹細胞のように多くの遺伝子を発現し、転写活性が高い細胞と考えられる。一方、正常の神経系細胞では、神経幹細胞とニューロンではヒストン H3 と H4 は高アセチル化状態で、オリゴデンドロサイトでは中間的、アストロサイトでは低アセチル化状態であることが報告されている。我々は、膠芽腫幹細胞でもゲノムグローバルにヒストン H3 と H4 のアセチル化が分化細胞と比較して亢進していることを報告してきた。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性を持つバルプロ酸で神経幹細胞を処理すると分化方向は、高アセチル化状態のヒストンを持つニューロンへと限局されることや種々の HDAC 阻害剤が抗腫瘍効果を持つことが示唆されていることからグローバルなヒストンアセチル化が脳腫瘍細胞の増殖や分化と関連していることは疑いない。さらにヒストンの修飾は、従来の転写活性の制御に加え、DNA 修復経路にも影響を与えていることが示唆されたことから、膠芽腫が放射線治療や化学療法に抵抗性を示す要因の一つと考えられる。最近、がんの解糖系酵素の一つがヒストン修飾に関わっていることが報告された。しかしながら、Warburg 効果の癌幹細胞における制御は不明であり、その他の癌特異的代謝経路がヒストンにどのような影響を与えているか検討がなされていない。がん遺伝子の一部にはヒストンを修飾する機能があり、がん抑制遺伝子は代謝経路に関与し、脳腫瘍で変異も検出される。これらのことから、ヒストン修飾は各シグナル伝達の集積地点であり、これを制御することで多面的に癌形質を抑制し得る。これらのことから、幹細胞を含む未分化細胞で発現し、がん特異的代謝やヒストン修飾に関わる因子を同定し、そのがん形質や幹細胞性における機能の解析を明らかにすること、治療標的としての評価をすることが難治性腫瘍を克服する治療法開発のために重要と考えられる。

## 2. 研究の目的

膠芽腫において、腫瘍幹細胞の増殖や浸潤、幹細胞性の維持に寄与する遺伝子を同定し、その腫瘍特異的な代謝経路やヒストン修飾における機能を検討する。

## 3. 研究の方法

膠芽腫細胞株と患者組織から神経幹細胞の培養法である Neurosphere 法により膠芽腫幹細胞を分離培養し、幹細胞と従来の血清を含む培養液で培養した分化細胞の間で発現量に差のあるがん関連遺伝子を PCR アレイと定量的 RT-PCR を用いてスクリーニングした。

同定した CD146 遺伝子の発現量と頻度は定量的 RT-PCR、ウェスタンブロット法、免疫細胞化学染色、免疫組織化学染色により正常脳組織、神経膠腫組織や細胞株において検討した。CD146 の発現と神経膠腫の悪性度との相関性を検討するためには、さらに神経膠腫や膠芽腫を主に含む組織アレイも用いて免疫組織化学染色により検討を加えた。膠芽腫細胞の幹細胞と分化細胞における CD146 の発現を検索するために幹細胞マーカー CD133 とグリア前駆細胞マーカーである A2B5 を CD146 と同時に染色しフローサイトメーターで解析を行った。解析からの死細胞の除去は EMA または Zonvie Violet™ で行った。各細胞周期における CD146 の発現量や CD146 が細胞周期に与える影響を検索するために抗 CD146 抗体、抗 CD133 抗体に FxCycle™ Violet を解析に加えて細胞周期の解析を行った。同定した CD146 遺伝子の相補 DNA を発現ベクターに挿入し、細胞に遺伝子導入し、薬剤により選択培養することでこの遺伝子を強制発現する細胞を分離培養した。また、CD146 遺伝子の発現量を低下 (ノックダウン) させた細胞株を得るために、shRNA を発現するレトロウイルスベクターや siRNA を膠芽腫細胞へ遺伝子導入し、ウェスタンブロット法を用いてこの遺伝子の発現の低下を確認した。CD146 を安定に強制発現させたまたはノックダウンさせた細胞は 6 well プレート上で細胞培養し、細胞数を計測することで CD146 の増減による増殖における影響を検討した。細胞の浸潤性は誘引物質に血清を用いて膜のポアサイズが 12 μm のケモタキセル内のコラーゲンを溶解し膜の下面に通過してくる細胞を計測する 3D コラーゲンゲル試験を用いて実施した。

膠芽腫を Neurosphere 法で培養したスフェロイド細胞と分化細胞において陰性対照の siRNA と CD146 をノックダウンする siRNA を細胞へ導入し、2 日後に細胞を任意の細胞濃度に播種し直し、翌日に比色定量や蛍光量を測定することで細胞の増殖、グルコースの取り込み量、乳酸の生成量、培養液の酸性化、HDAC 活性について検討した。

#### 4. 研究成果

マウスC3H/HeNの脳細胞に由来するマウス神経膠腫細胞株RSV-M細胞を無血清培地においてNeurosphere法で培養し、幹細胞様細胞を多く含む細胞集団を得た。この細胞（未分化型）は神経幹細胞マーカーSOX2の発現が従来の方法で培養した細胞（分化型）よりも上昇していた。未分化型細胞を同系マウスC3H/HeNの皮下や脳内に移植すると分化型細胞と比較して、高い造腫瘍能と浸潤性を示すことが観察された。PCRアレイを用いてがんの転移能や浸潤性に関与する遺伝子のうち未分化型細胞で高発現するものを検索するとCD146を含む幾つかの遺伝子が同定された。

CD146はイムノグロブリンスーパーファミリーで悪性黒色腫や乳癌などの悪性度や転移に関わる遺伝子として報告されている。

CD146はヒト膠芽腫細胞の分化型と比較して未分化型細胞で高発現することが定量的PCRで確認された。神経膠腫における発現をRT-PCRとウェスタンブロット法により検索すると調べた細胞全てで発現が検出された。膠芽腫細胞株T98Gをヌードマウス脳内に移植後に形成された腫瘍では不均一な発現が認められ、膠芽腫患者組織においても同様の結果が得られた。一方、正常脳組織においては発現が血管内皮細胞にのみ観察された。神経膠腫または膠芽腫を多く含む組織アレイを用いたCD146の発現解析では、WHOグレードとで高頻度に発現する傾向が得られた。

初代培養細胞を含む6つの膠芽腫細胞株に由来する未分化型細胞と分化型細胞においてRT-PCRに幹細胞マーカーCD133と神経幹細胞マーカーSOX2とCD146の発現を定量すると分化型細胞と比較して未分化型の細胞ではこの3つの遺伝子の発現が高いことが認められた。同様にこれらの細胞においてウェスタンブロット法によりタンパクレベルでもCD146が未分化型で高発現している結果が得られた。膠芽腫細胞株と初代培養細胞の未分化型細胞と細胞分化を誘導した分化型細胞においてフローサイトメトリーを用いてCD146の発現を観察するとCD146陽性細胞は分化誘導により減少することが明らかとなった。これらの結果によりCD146は幹細胞マーカーの発現と相関する可能性が考えられたので、CD133とグリア前駆細胞マーカーであるA2B5とCD146で膠芽腫初代培養の未分化型細胞を三重染色後、フローサイトメトリーによりCD146陽性細胞と各マーカー陽性細胞の関連性を検討した。CD146陽性細胞ではCD133単独陽性細胞は78.1%、CD133とA2B5二重陽性細胞は2.9%、A2B5単独陽性細胞は0.1%、CD133とA2B5陰性細胞は18.9%であり、逆にCD146陰性細胞ではCD133単独陽性細胞は9.1%、CD133とA2B5二重陽性細胞は0.5%、A2B5単独陽性細胞は0.2%、CD133とA2B5陰性細胞は90.2%とCD146陽性細胞はCD133の発現とよく一致することが示された。つまり、CD146

はCD133と同様に膠芽腫幹細胞を同定するために有用なマーカーであると考えられる。

CD146は血管内皮細胞のマーカーでもあることや膠芽腫幹細胞から血管内皮細胞が分化誘導されることが報告されているので一般的な血管内皮細胞マーカーCD31との二重染色により、膠芽腫細胞に内皮様細胞が存在しCD146を発現している可能性を検討した。CD31陽性細胞は本研究で用いた膠芽腫細胞においては検出されなかった。また、膠芽腫組織の免疫組織化学染色時におけるCD146陽性細胞の形態は腫瘍細胞であるために細胞中で核の占める面積も大きく、血管内皮細胞と大きく異なることから本研究で検出しているCD146陽性細胞が血管内皮細胞では無いことが示唆された。

次に、膠芽腫細胞におけるCD146の機能を検討するためにCD146を安定に高発現する細胞と発現低下（ノックダウン）した細胞を樹立した。CD146の強制発現は膠芽腫細胞の増殖に殆ど影響を与えなかった。一方、CD146のノックダウンは未分化型の細胞の増殖を著しく抑制した。さらにCD146の強制発現はスフェア形成能を大きく向上させたことから、CD146は膠芽腫幹細胞の自己複製に関与していることが考えられた。

CD146が膠芽腫細胞の増殖の制御に関与しているのでフローサイトメトリーを用いてCD146の発現と細胞周期の相関性の解析を行った。未分化型細胞においてCD133陽性細胞はCD133陰性細胞と比べて、過去のお他組織由来のがんにおける報告と一致してG2/M期の細胞が多かった。さらにCD133とCD146二重陽性の膠芽腫幹細胞ではG2/M期の細胞が増加した。しかしながら、分化型細胞においてはCD146の強制発現は、細胞周期のG0/G1期の細胞を増加させ、ノックダウンは逆にG2/M期の細胞を増加させることが分かった。一方、未分化型細胞におけるCD146のノックダウンはG2/M期の細胞を減少させた。これらの結果からCD146はCD133を発現する膠芽腫幹細胞の分裂期に高発現する遺伝子であること、未分化型細胞においては細胞分裂を亢進させるが分化型細胞においては細胞分裂を抑制する細胞の分化レベルによって相反する機能をもっていることが考えられた。

CD146が属するイムノグロブリンスーパーファミリーの中にはCD44のように癌細胞の特徴の一つである好氣的解糖に関与する遺伝子が含まれている。本研究では、CD146が膠芽腫幹細胞の糖代謝に関わっている可能性を検索した。まず、分化型細胞である膠芽腫細胞株T98Gとこの細胞からスフェロイド培養により分離された幹細胞を多く含む未分化型細胞においてグルコースの取り込みを測定した。未分化型細胞は分化型細胞と比較して約4倍のグルコースを取り込んでいることが観察された。培養液への乳酸の産生量を測定すると分化型細胞は未分化細胞と比較して約10倍多く乳酸を産生していること

が分かった。つまり、膠芽腫の分化型細胞では解糖系の活性が高く、未分化型細胞ではミトコンドリアでの酸化的リン酸化の活性が高くなっている可能性が考えられた。次に、これらの細胞でCD146をノックダウンすると未分化型細胞においてグルコースの取り込みが約1.5倍亢進し、分化型細胞において乳酸の産生量が約29%抑制された。また、pHインジケーターであるMito-IDを用いて経時的な培養液のpHの変化を観察するとCD146のノックダウンは分化型、未分化型細胞は共に培養液の酸性化を抑制することが分かった。これらの結果からグルコースの取り込みにおける役割に関してはさらなる検討が必要であるが、CD146は乳酸の産生や培養液の酸性化に影響し、好氣的解糖を促進する因子である可能性が示唆された。

近年、解糖系の鍵となるピルビン酸キナーゼは代謝とヒストン修飾の両方に関与する多機能的な分子であることが報告されている。膠芽腫細胞においてCD146が解糖系に影響を与える可能性が示唆されたので、ヒストン修飾に関わる代表的な分子としてHDACの活性におけるCD146の機能を検討した。膠芽腫において未分化型細胞のHDAC活性は分化型細胞と比較して約1.4倍高かった。HDAC活性はCD146のノックダウンにより抑制される傾向が見られた。この実験で測定されたHDAC活性はHDAC阻害剤であるTrichostatin Aの添加により90%以上が消失した。この結果からCD146がHDAC活性の制御に関与する可能性が考えられた。

本課題において、膠芽腫幹細胞で高発現する分子としてCD146を同定した。CD146は分裂期の細胞で主に発現していることから腫瘍組織中で幹細胞が増幅する際の指標となる可能性がある。また、星細胞系腫瘍においてWHO分類グレード以上で高頻度に発現が検出され、腫瘍悪性度との相関性が得られた。

また、この分子は膠芽腫細胞の浸潤性や自己複製能を増強し、腫瘍の播種に関連することも考えられた。近年、神経幹細胞を増殖させるGalectin-1がCD146のリガンドとして報告され、同様に神経系細胞である膠芽腫幹細胞の増殖にCD146が寄与する可能性も考えられた。CD146のノックダウンにより膠芽腫幹細胞の増殖が抑制されたことはこの分子が幹細胞を標的とした治療法開発に有用である可能性が考えられる。さらに、CD146の下流分子として細胞の分化制御に関わるID1が同定されたことからCD146は膠芽腫の分化制御にも関与するであろう。本研究においてゲノムグローバルなヒストン修飾に影響を与えるHDAC活性が膠芽腫幹細胞で高く、CD146のノックダウンで抑制される傾向にあった結果は、幹細胞性の維持や制御にCD146が関与する可能性を示唆するものである。HDAC阻害剤が各種がんに対する制がん剤として開発されていることを考えるとCD146は脳腫瘍に限局せず、様々な悪性腫瘍の治療に

において重要な分子であろう。CD146のノックダウンが乳酸の産生、培養液の酸性化を抑制することはCD44のノックダウンによる報告と同様に腫瘍細胞の代謝が解糖系からミトコンドリアでの酸化的リン酸化へのシフトにCD146が関与していることを示唆している。

CD44ではこの代謝のシフトを誘導し治療への感受性が向上しているため、CD146の抑制と化学療法や放射線治療との複合的療法は効率よく膠芽腫幹細胞を排除出来るかもしれない。いずれにしてもCD146がどのようなメカニズムで腫瘍または幹細胞特異的な代謝やヒストンの制御に関与しているかを把握するためにさらなる研究が必要である。

## 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7件)

Yawata T, Higashi Y, Shimizu T, Shimizu S, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Saito M: Brain opioid and nociceptin receptors are involved in regulation of bombesin-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in the rat. *Mol Cell Biochem* 411: 201-211, 2016. 査読有  
DOI:10.1007/s11010-015-2582-0

Shimizu T, Tanaka K, Shimizu S, Higashi Y, Yawata T, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Yuri K, Saito M: Possible inhibitory role of endogenous 2-arachidonoylglycerol as an endocannabinoid in ( $\pm$ )-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in the rat. *Neuropharmacol* 95: 278-289, 2015. 査読有  
DOI:10.1016/j.neuropharm.2015.03.034

Hashida Y, Taniguchi A, Yawata T, Hosokawa S, Murakami M, Hiroi M, Ueba T, Daibata M: Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. *Infect Agent Cancer* 10: 3, 2015. 査読有  
DOI:10.1186/1750-9378-10-3

Nonaka M, Yawata T, Takemura M, Higashi Y, Nakai E, Shimizu K, Ueba T: Elevated cell invasion in a tumor sphere culture of RSV-M mouse glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 55:

60-70, 2015. 査読有  
DOI:10.2176/nmc.oa.2014-0067

Nakamura K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Taniuchi K, Shimizu S, Dimitriadis F, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Saito M: Angiotensin II acting on brain AT1 receptors induces adrenaline secretion and pressor responses in the rat. Sci Rep 4: 7248, 2014. 査読有  
DOI:10.1038/srep07248

Higashi Y, Hoshijima M, Yawata T, Nobumoto A, Tsuda M, Shimizu T, Saito M, Ueba T: Suppression of oxidative stress and 5-lipoxygenase activation by edaravone improves depressive-like behavior after concussion. J Neurotrauma 31: 1689-1699, 2014. 査読有  
DOI:10.1089/neu.2014.3331

Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K, Taniuchi K, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Dimitriadis F, Shimizu S, Yokotani K, Saito M: Possible involvement of brain prostaglandin E2 and prostanoid EP3 receptors in prostaglandin E2 glycerol ester-induced activation of central sympathetic outflow in the rat. Neuropharmacology 82: 19-27, 2014. 査読有  
DOI:10.1016/j.neuropharm.2014.03.005

〔学会発表〕(計6件)

八幡 俊男, 東 洋一郎, 川西 裕, 中居 永一, 野中 大伸, 上羽 哲也: 膠芽腫幹細胞で高発現するCD146による細胞周期の制御, 日本脳腫瘍学会第33回学術集会, 2015/12/6-12/8, グランドプリンスホテル京都, 京都市

Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Toshio Yawata, Sena Hosokawa, Moe Tanaka, Masanao Murakami, Mikio Kamioka, Makoto Hiroi, Tetsuya Ueba, and Masanori Daibata: Virus infection in glioblastoma multiforme (GBM): Possible association of human papillomavirus with pathogenesis of GBM. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015年11月22日~24日, 福岡国際会議場, 福岡市

八幡 俊男, 東 洋一郎, 野中 大伸, 竹村 光広, 川西 裕, 中居 永一, 上羽 哲也: CD146による膠芽腫細胞の自己複製能と浸潤能の制御. 日本脳腫瘍学会第32回

学術集会, 2014/11/30-12/2, 千葉県, シェラトン・グランデ・トーキョーベイホテル

八幡 俊男, 東 洋一郎, 田村 雅一, 星島 陸宏, 野中 大伸, 川西 裕, 竹村 光広, 中居 永一, 政平 訓貴, 上羽 哲也: 悪性グリオーマにおける転移・浸潤関連遺伝子MCAM/CD146の発現とその役割. 第31回日本脳腫瘍学会, 2013/12/8-10, 宮崎県, フェニックス・シーガイア・リゾート.

八幡 俊男, 東 洋一郎, 田村 雅一, 川西 裕, 政平 訓貴, 清水 恵司, 上羽 哲也: 悪性グリオーマ幹細胞におけるMCAM/CD146の高発現とその浸潤における役割. 第51回癌治療学会, 2013/10/24-26, 京都市, 国立京都国際会議場.

八幡 俊男, 東 洋一郎, 星島 陸宏, 野中 大伸, 川西 裕, 竹村 光広, 中居 永一, 政平 訓貴, 上羽 哲也: 悪性グリオーマにおける転移・浸潤関連遺伝子MCAM/CD146の発現とその意義. 第14回日本分子脳神経外科学会, 2013/10/18-19, 横浜市, パシフィコ横浜.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

八幡 俊男 (YAWATA, TOSHIO)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・助教  
研究者番号：40380323

### (2)研究分担者

上羽 哲也 (UEBA, TETSUYA)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・教授  
研究者番号：00314203

東 洋一郎 (HIGASHI, YOUICHIRO)  
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部  
門・助教  
研究者番号：80380062