

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830082

研究課題名(和文) IGF1シグナル経路の調節機構をターゲットとした脳腫瘍幹細胞の新規治療開発

研究課題名(英文) Development of new molecular target therapy for IGF1 signaling pathway in glioma stem cells

研究代表者

大須賀 覚 (Satoru, Osuka)

慶應義塾大学・医学部・特別研究員(PD)

研究者番号：70724574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫の難治性の原因として、腫瘍内に存在する脳腫瘍幹細胞(GSC)が挙げられている。申請者らは以前に、GSCはIGF1シグナルを介して放射線抵抗性を獲得することを解明している。本研究では、IGF1の下流で放射線抵抗性に関与している分子メカニズムを解明し、GSCの抵抗性機序を阻害する新規治療開発を目指した。

。以前の研究で樹立したGSCと放射線抵抗性GSCをマイクロアレイ解析で比較した。IGF1高発現GSCでは、幹細胞特性と細胞接着に関わる遺伝子発現が変化していた。また、放射線抵抗性に関わるものとしてN-cadherinを同定した。この発現量は放射線抵抗性と有意に相関していた。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma (GBM) is the most aggressive brain tumor in adult. Poor prognosis of patients with GBM is due to glioma stem cells (GSCs) that have characteristics of stem cells, with high chemo- and radio-resistance. In my prior study, we revealed a role for IGF1 signaling activation in the radioresistance of GSCs. In this study, we analyzed the detailed of IGF1 downstream signaling to implicate radioresistance in GSCs.

We found that: (i) adaptation of mouse GSCs to repeated irradiation increases cell-cell adhesion and radioresistance, (ii) recurrent human GBM display an increase in the expression of adhesion-related genes in microarray analysis, (iii) fractionated irradiation induces a gradual upregulation of N-cad in surviving GSCs.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍幹細胞 グリオーマ 放射線抵抗性 IGF1 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の一つである神経膠芽腫は難治性であり、現在の標準治療である手術・放射線治療・化学療法を行っても平均生存期間は2年に及ばない。近年では、この治療抵抗性の原因として、腫瘍内に少数存在する脳腫瘍幹細胞(Glioma stem cells: GSC)が関与することが報告されている。GSCが放射線抵抗性を示す原因としては、GSC自体が持つ幹細胞特性(増殖遅延・DNAダメージ修復能)などが関与することが報告されている。しかし、これらの研究結果は短期間の放射線照射による反応を解析したものであった。しかし、実際の臨床現場で実施される放射線照射は、正常組織の障害を軽減するために、長期間に分割して反復照射が行われている。このような反復放射線照射に対し、GSCがどのような段階的な適応反応を起こし、治療抵抗性を獲得していくのかは不明であった。この長期的な適応反応を詳細に解明できれば、実臨床においてGSCの治療抵抗性を克服する有効な治療法につながるのではないかと期待される。

反復放射線照射に対する抵抗性メカニズムが解明できない原因としては、臨床サンプルから単離できるGSCの量が限られているため、反復放射線照射後のモデル細胞を確立できないなどの技術的な問題があった。この問題に対して、我々は人工がん幹細胞の作成という技術を利用することで解決を試みた。この技術は、マウスの腫瘍発生臓器における正常幹細胞に、発がんに関与するがん抑制遺伝子をノックアウトし、さらに関係するがん遺伝子を導入することで、標的腫瘍の性質を再現したがん幹細胞を人工的に作成するもので、iPS細胞のがん幹細胞版とも言える技術である。我々はこの技術を応用して、ヒトのGSCと性質が極めて類似した人工GSCを安定した条件下で大量に用意することに成功した(Neoplasia. 2011;13:784)。そして、人工GSCを利用して、腫瘍幹細胞の段階的な抵抗性獲得を再現するモデルを作成するのに成功した(Stem Cells. 2013;31:627)。具体的には、Ink4a/Arf-/-神経幹細胞に癌遺伝子H-RasV12を導入し、これをマウス脳に移植して脳腫瘍を形成させ、この腫瘍内の未分化な腫瘍細胞群Tumor sphere(TS)をスフェア培養法によって確立した。このTSに放射線照射を合計60Gy(5Gy x 12)行い、その後生存した放射線抵抗性GSC(TSRR: TS-radioresistance)を確立した。このTSRRはin vitro、in vivoにて強い放射線抵抗性を示し、10個の細胞をマウス脳内に移植した際には90%のマウスが腫瘍死するという、GSCに特徴的な強い腫瘍形成能を有しており、GSCが放射線抵抗性を獲得する機序の解明に有効なモデルと考えられた。

上記のモデル細胞を利用して解析を行い、放射線抵抗性GSC(TSRR)では、放射線照射を受けた際にInsulin-like growth factor-1(IGF1)の分泌が亢進し、IGF1受容体(IGF1R)

の発現が亢進することが判明した。さらに、IGF1シグナル経路を詳細に解析したところ、TSRRでは慢性的なIGF1シグナル亢進によって抑制経路が強く亢進して、これによりAktなどの下流分子が抑制されていた。Akt不活性化は転写因子FoxO3aの核内貯留を引き起こし、これによりTSRRは増殖を遅く保ち、幹細胞特性が増加して、放射線障害を軽減していた。(Stem Cells. 2013;31:627)。また、この放射線抵抗性GSCはIGF1R阻害剤に高い感受性を示すこともわかった。

IGF1シグナルは様々な癌種においてがん幹細胞の維持(Cancer Res. 2009;69:1951)や、慢性的な治療刺激時の抵抗性獲得(Cell. 2010;141:69)に関わることが報告され、IGF1R阻害剤の臨床研究が開始されている。しかし、IGF1RはInsulin受容体と相同性が高いため、直接的なIGF1R阻害は高血糖などの副作用を伴うことが判明し、今後はIGF下流で抵抗性獲得に重要な分子を特異的に抑制することが求められる。

2. 研究の目的

神経膠芽腫は治療困難な脳腫瘍である。その難治性の原因として、再発の起源となる脳腫瘍幹細胞(GSC)が挙げられている。しかし、現在もGSCの治療抵抗性を克服する有効な治療法は開発されていない。申請者らは以前に、人工がん幹細胞の作成技術を利用して、GSCがIGF1-FoxO3aシグナルを介して放射線抵抗性を獲得することを解明している。本研究では、以前に確立した放射線抵抗性GSCモデル細胞を利用して、IGF1の下流で性質変化に関与している分子メカニズムの詳細を解明する。これより、再発原因となる治療抵抗性脳腫瘍幹細胞を同定するマーカーの確立と、その抵抗性機序を阻害する新規治療開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)放射線抵抗性GSCに対するマイクロアレイ解析: IGF1シグナル下流で起こっている変化をみるために、以前に確立した放射線抵抗性GSCにおいて活性化されている生物学的機序は何かを解明するためにマイクロアレイ解析を行う。

(2)IGF1発現GSCの樹立: GSCにおけるIGF1の働きを詳細に調べるために、IGF1を発現するベクターを作成し、GSCに導入する。また、脳腫瘍内でのIGF1発現分布を見るために、Flag tag付きのIGF1発現ベクターを作成する。さらに、IGF1刺激後のシグナル経路の活性化をダイナミックに解析するために、Dox誘導Flag-IGF1発現ベクターも作成する。

(3)IGF1シグナル下流の治療抵抗性に関わる分子を特定: 上記(1)(2)の結果を利用して、IGF1シグナル下流の治療抵抗性に関わる分子を特定する。

4. 研究成果

(1) 細胞接着と放射線抵抗性：以前の研究で樹立した GSC と放射線抵抗性 GSC (IGF1 高発現細胞) をマイクロアレイ解析で比較した。有意な発現変化のある遺伝子 227 個を同定した。さらに、Gene set enrichment analysis を行い、IGF1 高発現 GSC では、幹細胞特性と細胞接着に関わるものが亢進していることが判明した。同様に、Glioblastoma の患者におけるマイクロアレイデータの解析も行った。初発時の腫瘍検体 (n=70) と、治療後に再発した時の腫瘍検体 (n=10) のデータ (GSE7696) を解析した。この結果では、有意な発現変化のある遺伝子 77 個を同定した。さらに、Gene set enrichment analysis を行い、再発腫瘍では、放射線抵抗性 GSC の結果と同様に、幹細胞特性と細胞接着に関わるものが亢進していることが判明した。

Glioblastoma における GSC の働きは良く知られていたが、細胞接着の変化と治療抵抗性についてはあまり知られていなかった。今回の解析により、GSC における細胞接着の変化が重要ではないかと考えられた。

(2) Flag-tag 付きの IGF1 強制発現ベクターと、Dox 誘導 Flag-IGF1 発現ベクターを作成した。このベクターを GSC に導入した。IGF1 発現 GSC は、in vitro と in vivo とともに、コントロール細胞よりも強い放射線抵抗性を示した。また、この細胞は細胞間接着が亢進していることがわかった。

(3) 上記結果から細胞間接着因子に注目して、放射線抵抗性 GSC で発現上昇しているものをスクリーニングした。その結果、同定した細胞接着因子の中で放射線抵抗性に関わるものとして N-cadherin を同定した。この発現量は細胞増殖の遅延と、放射線抵抗性に密接に関わっていた。

本研究によって、IGF1 は GSC の細胞間接着を変化させることで、新たな治療抵抗性を引き起こしていることが判明した。また、重要分子として N-cadherin を同定した。この結果は、今まで良く知られていなかった機序であり、国内外の脳腫瘍研究分野への大きなインパクトがあると思われる。また、将来の新たな治療となる可能性があると思われた。

本研究期間中には、当該研究内容を論文として発表するまでには至らなかったが、当該研究から得られた知見・技術を利用することで、複数の共同研究を論文として発表している。

今後の研究では、本研究で樹立した Dox 誘導 IGF1 発現 GSC を利用して、IGF1 がどのように N-cadherin の発現を誘導しているのか、N-cadherin が治療抵抗性に関わる分子メカニズムを解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Thompson EM, Hielscher T, Bouffet E, Remke M, Luu B, Gururangan S, McLendon RE, Bigner DD, Lipp ES, Perreault S, Cho YJ, Grant G, Kim SK, Lee JY, Rao AA, Giannini C, Li KK, Ng HK, Yao Y, Kumabe T, Tominaga T, Grajkowska WA, Perek-Polnik M, Low DC, Seow WT, Chang KT, Mora J, Pollack IF, Hamilton RL, Leary S, Moore AS, Ingram WJ, Hallahan AR, Jouvet A, Fèvre-Montange M, Vasiljevic A, Faure-Conter C, Shofuda T, Kagawa N, Hashimoto N, Jabado N, Weil AG, Gayden T, Wataya T, Shalaby T, Grotzer M, Zitterbart K, Sterba J, Kren L, Hortobágyi T, Klekner A, László B, Pócza T, Hauser P, Schüller U, Jung S, Jang WY, French PJ, Kros JM, van Veelen MC, Massimi L, Leonard JR, Rubin JB, Vibhakar R, Chambless LB, Cooper MK, Thompson RC, Faria CC, Carvalho A, Nunes S, Pimentel J, Fan X, Muraszko KM, López-Aguilar E, Lyden D, Garzia L, Shih DJ, Kijima N, Schneider C, Adamski J, Northcott PA, Kool M, Jones DT, Chan JA, Nikolic A, Garre ML, Van Meir EG, Osuka S, Olson JJ, Jahangiri A, Castro BA, Gupta N, Weiss WA, Moxon-Emre I, Mabbott DJ, Lassaletta A, Hawkins CE, Tabori U, Drake J, Kulkarni A, Dirks P, Rutka JT, Korshunov A, Pfister SM, Packer RJ, Ramaswamy V, Taylor MD. Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol.* 査読有り 2016. pii: S1470-2045(15)00581-1. [Epub ahead of print]doi:10.1016/S1470-2045(15)00581-1.
- (2) Yamaguchi M, Osuka S, Weitzmann MN, El-Rayes BF, Shoji M, Murata T. Prolonged survival in pancreatic cancer patients with increased regucalcin gene expression: Overexpression of regucalcin suppresses the proliferation in human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells in vitro. *Int J Oncol.* 査読有り 2016 48(5):1955-64. doi: 10.3892/ijo.2016.3409.
- (3) Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Tamaki S, Koyama Y, Kamei W, Ueki A, Ishikawa T, Chiyoda T, Osuka S, Onishi N, Ikeda H, Kamei J, Matsuo K, Fukuchi Y, Nagai T, Toguchida J, Toyama Y, Muto A, Saya H. IGF2 Preserves Osteosarcoma Cell Survival by Creating an Autophagic State of Dormancy That

Protects Cells against
Chemotherapeutic Stress. 査読有り
Cancer Res. 2014 74(22):6531-41. doi:
10.1158/0008-5472.CAN-14-0914.

- (4) Saga I, Shibao S, Okubo J, Osuka S,
Kobayashi Y, Yamada S, Fujita S,
Urakami K, Kusuhara M, Yoshida K, Saya
H, Sampetean O. Integrated analysis
identifies different metabolic
signatures for tumor-initiating cells
in a murine glioblastoma model. Neuro
Oncol. 査読有り 2014 16(8):1048-56.
doi: 10.1093/neuonc/nou096.
- (5) Uemae Y, Ishikawa E, Osuka S, Matsuda
M, Sakamoto N, Takano S, Nakai K,
Yamamoto T, Matsumura A. CXCL12
secreted from glioma stem cells
regulates their proliferation. J
Neurooncol. 査読有り
2014;117(1):43-51 doi:
10.1007/s11060-014-1364-y.

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) Osuka S, Sampetean O, Onishi N, Saya
H, Van Meir EG, Does cell-cell adhesion
play a role in adaptive
radiation-resistance of glioma stem
cells? 2015 Postdoc Research
Symposium in Emory University, 2015
年5月18日 アトランタ(アメリカ)
- (2) 大須賀 覚、サンペトラ オルテア、松村
明、佐谷秀行、脳腫瘍幹細胞研究に基づ
く新規治療戦略の考案(臓器別シンポジ
ウム:中枢神経系悪性腫瘍治療戦略の Up
to Date)(招待講演)第52回日本癌治療
学会学術集会、2014年8月28日パシフ
ィコ横浜(神奈川県横浜市)
- (3) Osuka S, Sampetean O, Onishi N,
Matsumura A, Saya H, Achieving high
spatial resolution in multi-color
fluorescence imaging of brain tumor
matrix components. The 29th Japan
Neurosurgery English Forum. 2014年7
月25日 学術総合センター(東京都千代
田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.genereg.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大須賀 覚 (Satoru Osuka)

慶應義塾大学・医学部・特別研究員(PD)

研究者番号: 70724574

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし