



Title	膠芽腫の治療抵抗性に関与するがん幹細胞性の解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	鈴木, 淳
Description	配架番号 : 2387
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13008号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70419
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jun_Suzuka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 鈴 鹿 淳

学 位 論 文 題 名

膠芽腫の治療抵抗性に関与するがん幹細胞性の解析
(Analysis of therapy-resistant mechanism of glioblastoma cancer stem cells)

【背景と目的】 膠芽腫 (Glioblastoma multiforme, GBM) は WHO 分類において最も悪性度の高い Grade IV に分類されており、患者生存期間中央値が 12~15 ヶ月と極めて予後不良の腫瘍である。標準治療として外科的切除、放射線療法、化学療法が施行されているが、高頻度に再発することから、より効果的な治療法の開発が求められる。近年、膠芽腫において遺伝子増幅や変異が報告されている受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase, RTK) EGFR、c-Met、PDGFR に対するチロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) を用いた分子標的治療が新規治療法として開発が進んでいるが、側副経路の亢進やがん幹細胞性の獲得に伴う薬剤耐性が問題視され、再発が生じることから実臨床では使用されていない。再発の原因の一つとして考えられているがん幹細胞 (cancer stem cell, CSC) は、正常幹細胞と同様に自己複製能、多分化能を有し、薬剤耐性を併せ持つ細胞である。がんの根治には CSC の根絶が必要であるが、組織内の CSC はごく僅かであるため、効率的な CSC 誘導法の開発が不可欠である。

このような背景を受けて、本研究では CSC の効率的な誘導法の開発およびその性状解析を目的とした。第一章では CSC を効率的に誘導してその性状を解析し、CSC を標的とした治療法を決定するために、先行研究において軟骨自然再生誘導能力が証明されている poly(2-acrylamide-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS) ゲルと poly(N,N'-dimethylacrylamide) (PDMAAm) ゲルを重合した Double network (DN) ハイドロゲルを使用した膠芽腫幹細胞の新規誘導法を開発した。第二章では膠芽腫の新規治療戦略として注目されている分子標的治療に着目し、膠芽腫細胞株に対し長期間 TKI を投与して樹立した薬剤耐性モデル細胞を用いてがん幹細胞性獲得の分子メカニズムを解析した。

【材料と方法】 第一章: ヒト膠芽腫細胞株 KMG4 および他のヒトがん細胞株 (子宮頸癌、口腔癌、大腸癌、膀胱癌、滑膜肉腫) を DN ゲルおよび通常培養条件として polystyrene (PS) ディッシュ上で培養し、幹細胞性関連遺伝子群 (*Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2*) の発現解析を定量 RT-PCR 法にて実施した。腫瘍形成能の解析には、赤色蛍光蛋白質 tdTomato および発光酵素 Luc2 の共発現ベクターを遺伝子導入した KMG4 細胞を DN ゲル、PS ディッシュ上で 3 日間培養後、①DN ゲル上培養 KMG4 細胞、②PS ディッシュ上培養 KMG4 細胞、③DN ゲル上培養 KMG4 細胞に粉砕 DN ゲルを加えた群、④粉砕 DN ゲルのみの 4 群に分類し、500 個/匹で NOD/ShiJic-scid マウスの右大脳半球に同所性移植を実施し、一週毎に IVIS spectrum でライブイメージングを施行した。DN ゲル上での幹細胞性誘導メカニズムの解析には、免疫ブロット、DNA マイクロアレイ法を使用した。がん幹細胞性誘導関連候補分子に関しては、定量 RT-PCR 法およびクロマチン免疫沈降法によりその関連性を検証した。臨床検体での CSC の性状解析と治療反応性を検討するために、膠芽腫患者由来初代培養細胞 G144 を DN ゲル、PS ディッシュ上で 3 日間培養後、蛍光免疫染色法による解析を実施し

た。

第二章：EGFR、c-Met、PDGFR 阻害剤を 150 日間添加して培養した KMG4 細胞を用いて、定量 RT-PCR 法を用いた幹細胞関連遺伝子群の発現解析および DNA マイクロアレイを実施した。TKI 耐性細胞特異的に発現が変動した分子に関しては、薬剤耐性獲得機序の解析のため、蛍光免疫染色、定量 RT-PCR 法、イムノブロット法によりシグナル伝達経路や幹細胞性を規定する分子を検討した。

【結果】 第一章：DN ゲル上で培養したがん細胞は PS ディッシュ上とは異なり、細胞凝集およびスフィア形成が認められた。また、定量 RT-PCR 法の結果より、DN ゲル上では約 24 時間で KMG4 細胞を含め、全てのヒトがん細胞株の *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の遺伝子発現が上昇した。*In vivo* における腫瘍形成能の解析では、DN ゲル上培養 KMG4 細胞に粉碎 DN ゲルを混合接種したマウス群において、著明な腫瘍増大を認めた。イムノブロット、DNA マイクロアレイ法による解析の結果、チロシンキナーゼを介したシグナル伝達や *Osteopontin* (OPN) の遺伝子発現の亢進が認められた。OPN リコンビナント蛋白質を固相化したディッシュ上で培養した KMG4 細胞では幹細胞関連遺伝子群の発現が亢進し、一方、OPN 中和抗体の処理により発現が抑制された。また、クロマチン免疫沈降法により、OPN の遺伝子発現はソニックヘッジホッグ経路の転写因子 Glioma-associated oncogene 1 (GLI1) によって制御されることが明らかとなった。蛍光免疫染色法の結果、DN ゲル上培養 G144 細胞では PS ディッシュ上では発現がほぼ認められなかった PDGFR の発現が誘導され、PDGFR 阻害剤の処理によりアポトーシスが誘導された。

第二章：定量 RT-PCR 法より、TKI 耐性 KMG4 細胞では *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の遺伝子発現が亢進した。DNA マイクロアレイの結果より、TKI 耐性 KMG4 細胞では Wnt シグナル経路のアンタゴニストとして作用する *soluble frizzled-related protein 1* (*SFRP1*) の著明な発現低下を認めた。細胞分画法および蛍光免疫染色法、DNA マイクロアレイによる解析から、TKI 耐性 KMG4 細胞では β -catenin の核内発現や *Wnt* リガンドの遺伝子発現の上昇が認められた。DNA メチル化酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で TKI 耐性 KMG4 細胞を処理すると、*SFRP1* の遺伝子発現は回復し、*Sox2* の蛋白発現低下が認められた。

【考察】 第一章：DN ゲルを使用したがん細胞の培養により、迅速且つ簡便な CSC の誘導に成功した。*In vivo* での腫瘍形成能の解析より、粉碎 DN ゲルを膠芽腫細胞株と共に移植した群で高い腫瘍形成能力を示したことから、DN ゲルからの持続的な刺激、および DN ゲルが模倣した腫瘍微小環境が幹細胞性の誘導に不可欠であると考えられる。DN ゲルで誘導した CSC では、PS ディッシュ上ではほぼ発現が認められなかった RTK の発現が誘導されたことから、DN ゲルには CSC 特異的な RTK の誘導能を有することが示唆された。今後はより多くの臨床検体を用いて、DN ゲルによる CSC 誘導および幹細胞特異的 RTK の発現を検討し、CSC 特異的分子標的治療の有用性を検証する必要があると考えられる。

第二章：TKI への耐性を獲得した膠芽腫細胞において、*SFRP1* はエピジェネティックな制御を介して発現が低下し、Wnt/ β -catenin シグナル経路の活性化を通してがん幹細胞性を獲得することが明らかとなった。本検討においては *SFRP1* の発現の有無による薬剤耐性解除の検証は実施できなかったため、今後は *SFRP1* 過剰発現細胞株を樹立し、各種 TKI に対する薬剤耐性の解除を検討する予定である。

【結論】 DN ゲルは CSC を迅速且つ効率的に誘導することが可能であり、DN ゲル上で膠芽腫幹細胞を誘導する重要な分子として OPN を同定した。また、TKI 耐性を獲得した膠芽腫細胞では幹細胞性の亢進が認められ、エピジェネティックな制御による *Sox2* の発現調節と、Wnt/ β -catenin シグナル経路の関与が認められた。本研究により、CSC 特異的な分子標的治療の開発および幹細胞性獲得に伴う薬剤耐性の解除が可能になると期待される。