HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	膠芽腫の治療抵抗性に関与するがん幹細胞性の解析
Author(s)	鈴鹿, 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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13008
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88842
Type	doctoral thesis
File Information	Jun_Suzuka.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

鈴 鹿　淳

学　位　論　文

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)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

鈴 鹿　淳

目　次

発表論文目録および学会発表目録 ····· 1 頁

全体の緒言 ····· 3 頁

略語表 ····· 6 頁

第一章　：高分子ハイドロゲルを用いたがん幹細胞の新規誘導法の開発および分子メカニズムの解明

1. 緒言 ····· 9 頁
2. 実験方法 ····· 11 頁
3. 実験結果 ····· 17 頁
4. 考察 ····· 27 頁
5. 総括および結論 ····· 31 頁

第二章　：チロシンキナーゼ阻害剤耐性膠芽腫細胞におけるがん幹細胞性獲得とSFRP1 の機能解析

1. 緒言 ····· 33 頁
2. 実験方法 ····· 34 頁
3. 実験結果 ····· 37 頁
4. 考察 ····· 44 頁
5. 総括および結論 ····· 46 頁

全体の総括および結論 ····· 47 頁

謝辞 ····· 48 頁

引用文献 ····· 49 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Jun Suzuka, Masumi Tsuda, Lei Wang, Shingo Semba, Sachiyo Aburatani, Takayuki Kurokawa, Yoshihiro Ohmiya, Kazunori Yasuda, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka
   Rapid reprogramming towards cancer stem cells by double-network hydrogel
   (Nature, in submission)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Jun Suzuka, Masumi Tsuda, Lei Wang, Shingo Semba, Sachiyo Aburatani, Takayuki Kurokawa, Yoshihiro Ohmiya, Kazunori Yasuda, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka
   Development of novel induction method for tumor stem cells using polymer gel
   The First International Symposium on Advanced Soft Matter: Celebrating the Kick-off of Global Station for Soft Matter, GI-CoRE, 2016 年 6 月 13-15 日, 札幌

2. 鈴鹿　淳、津田　真寿美、王　磊、木村　太一、谷野　美智枝、西原　広史、田中　伸哉
   チロシンキナーゼ阻害剤耐性膠芽腫細胞における腫瘍幹細胞性獲得と SFRP1 の関連性
   第 75 回 日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6–8 日、横浜

3. 鈴鹿　淳、津田　真寿美、王　磊、木村　太一、谷野　美智枝、西原　広史、田中　伸哉
   チロシンキナーゼ阻害剤耐性膠芽腫細胞における幹細胞性獲得と SFRP1 の機能解析
   第 39 回 日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、横浜

4. Jun Suzuka, Masumi Tsuda, Lei Wang, Shingo Semba, Sachiyo Aburatani, Takayuki Kurokawa, Yoshihiro Ohmiya, Kazunori Yasuda, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka
   Induction of cancer stem cells by double-network hydrogel
   2017 Cold Spring Harbor Laboratory meeting: Biology of Cancer: Microenvironment & Metastasis, 2017 年 10 月 10-14 日, New York, USA

5. 鈴鹿　淳、津田　真寿美、王　磊、仙葉　愼吾、油谷　幸代、黒川　孝幸、近江谷　克裕、安田　和則、龔　剣萍、田中　伸哉
   ハイドロゲルを用いた癌幹細胞新規誘導法の開発
   2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 6-9 日、神戸

全体の緒言

膠芽腫の疫学と治療法

がんは様々な治療法が開発されているにも関わらず、日本における死因の第 1 位であり、2015 年度のがんによる死亡総数は 370,346 人である [1]。脳腫瘍の発生頻度は人口 10 万人に対して 14.09 人である [2]。その中でも、原発性の脳腫瘍の発生頻度は、人口 10 万人に対して 3.76 人と報告されている [3]。一方、アメリカでの原発性の脳腫瘍の発生頻度は人口 10 万人に対し 22.64 人と本邦より高い [4]。脳腫瘍の中でも、膠芽腫（Glioblastoma multiforme、GBM）は中枢神経系腫瘍 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、GBM に罹患した患者の生存期間中央値は 12～15 ヶ月と極めて予後不良である [5]。標準治療には外科的切除、放射線療法、化学療法が用いられている。膠芽腫において外科的切除は生命予後を規定する最も重要な因子であるが、脳機能の温存の必要性および膠芽腫細胞の高い浸潤能のため、腫瘍の完全摘出は困難であることが多い [6]。また、DNA 複製を阻害する作用を有する経口アルキル化剤 Temozolomide (TMZ) を用いた治療も実施されているが、放射線療法単独での生存期間中央値は 12.1 ヶ月、放射線療法と TMZ 投与の併用療法においても 14.6 ヶ月であり [7]、より効果的な治療法の開発が求められる。

腫瘍の不均一性とがん幹細胞

1976 年に Peter Nowell が腫瘍の進展において特定の遺伝子変異を持つ細胞が自然に選択されていくモデルを提唱して以来 [8]、腫瘍組織は単一の細胞から構成される均一な集団であると考えられてきた。しかし、次世代シークエンサーの開発以降、がんゲノム変異の解析が急速に進行し、組織学的に同一腫瘍であると診断された腫瘍であっても進展に重要なドライバー遺伝子変異が全く異なることや、同一患者に生じた腫瘍であっても部位によって異なる遺伝子の増幅や変異が生じることが明らかになり [9,10]、腫瘍内における不均一性が重要視されるようになった。

GBM においては、*isocitrate dehydrogenase (IDH) 1/2* 遺伝子における点突然変異 [11] や、*O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)* のプロモーター領域のメチル化 [12] をはじめとして、様々な遺伝子変異が報告されてきた。従来膠芽腫は、初回から GBM として発生する原発性とびまん性星細胞腫等の悪性神経膠腫を経る続発性に分類されてきた [13]。続発

性 GBM は原発性と比較して *IDH1/2* 遺伝子変異を持つ場合が多く、予後が良好であると報告されていることから [14]、2016 年に改訂された中枢神経系腫瘍 WHO 分類では原発性、続発性の分類は消され、*IDH* 変異を診断に加えることとなった。初発、再発時の GBM に生じた遺伝子変異の普遍性を検討した報告では、初発時に生じた *IDH1* 遺伝子変異は再発時においても共通して認められたものの、再発腫瘍においては初発時には認められなかった遺伝子変異が多数検出された [15]。また、膠芽腫の標準治療として使用される TMZ は MGMT のプロモーター領域にメチル化が生じた膠芽腫に対し奏功するが [16]、TMZ 治療後に *PIK3CA*、*PTEN*、*MTOR* 等に遺伝子変異が生じ再発の原因となる [15]。

腫瘍内の不均一性に関与するがん幹細胞（Cancer stem cell、CSC)は自己複製能と多分化能を有し、前駆細胞から分化してがん細胞となる。CSC の存在は、1997 年に Bonnet らが急性骨髄性白血病において発見し、免疫不全マウスに CD34 陽性、CD38 陰性細胞を移植すると著しい造腫瘍能を示した [17]。CSC は正常幹細胞と同様、自己複製能と多分化能を有し、薬剤排泄に関わる ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターや薬剤代謝に関与する aldehyde dehydrogenase (ALDH) が高発現し、放射線療法施行時に細胞致死性に働く活性酸素の消去に関わる酵素の発現が亢進していることから、化学療法や放射線療法に対する抵抗性を有するため、再発や転移の原因となる [18,19]。更に、腫瘍内のゲノム変異におけるクローンの階層構成への関与も報告されている [20]。これまでに、乳癌（CD44 陽性かつ CD24 陰性）[21]、大腸癌（CD133 陽性）[22]、脳腫瘍（CD133 陽性）[23] など様々な癌腫における CSC の同定が進んできたが、CSC を標的とした効果的な治療法は未だ開発されていない。

分子標的治療の開発

分子標的治療は、腫瘍の増殖・生存に関与する特定の分子の酵素活性部位等の機能領域に結合する抗体医薬や低分子化合物を作用させることで腫瘍の縮小を狙う治療である。本邦においては、2001 年に慢性骨髄性白血病に対し、キメラ遺伝子である BCR-ABL 遺伝子産物のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害する低分子化合物 Imatinib による治療が承認された。Imatinib 投与による慢性骨髄性白血病の 5 年生存率は 89%であることが報告されている [24]。この他、受容体型チロシンキナーゼ HER2 阻害剤である Trastuzumab が乳癌に対し、EGFR 阻害剤である Gefitinib が肺癌に対してなど、様々な分子標的治療薬剤が承認されてきた。膠芽腫においては

受容体型チロシンキナーゼ EGFR、c-Met、PDGFR に対する分子標的治療が新規治療法として基礎研究が進められている。また、各種受容体型チロシンキナーゼを標的とした臨床研究については 2017 年現在、EGFR においては 53 件、c-Met においては 6 件、PDGFR においては 7 件実施されており(ClinicalTrials.gov により検索)、その中には臨床試験の完了報告も存在するものの、無増悪生存期間等の劇的な延長は認められず、未だ治療適応承認は得られていない。

バイオマテリアルとがん幹細胞

バイオマテリアルは生体内の蛋白質との相互作用を意図して作製された生体適合性を持つ材料であり、再生医療への応用等を目的として基礎研究が進められている。細胞周囲における微小環境は、細胞増殖やシグナル伝達に重要な役割を果たす。バイオマテリアルはポリマー、セラミクス、金属などの素材で、人工弁、歯、骨、血管など様々な組織代替物として用いられているが、近年、細胞培養技術としても生体内に近い微小環境を整えるためにバイオマテリアルが用いられてきている。細胞培養においては、生体内と同様の組織構築を目指し、バイオマテリアルを足場として生体に近い環境を模倣することで三次元的な培養を実施し、幹細胞からのより効率的な目的臓器細胞への分化[25]、前臨床試験における薬物スクリーニング[26]、腫瘍形成能や悪性転化能の検討[27]が実施されている。CSC においても微小環境は重要視されており、2016 年には細胞外基質や鉄を構成成分に含まれるウレタンベースの合成ポリマーを用いてラットの C6 神経膠腫細胞株を培養すると、CSC を維持できることが報告された[28]。

本研究では以上のことを踏まえ、第一章では新規培養基材である高分子ポリマーハイドロゲルを使用した膠芽腫のがん幹細胞の新規誘導法の開発を実施した。第二章では、膠芽腫における新規治療法として分子標的治療薬剤投与後に生じる幹細胞性の獲得や側副経路の亢進の克服を目指し、解析を実施した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

APC	adenomatous polyposis coli
BSA	bovine serum albumin
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CSC	cancer stem cell
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DN	double-network
DTT	dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GBM	glioblastoma multiforme
GLI	glioma-associated oncogene
GSK3β	glycogen synthase kinase-3β
H&E	hematoxylin & eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NaF	sodium fluoride
NOD	nonobese diabetic
OPN	osteopontin
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate-buffered saline
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PS	polystyrene

PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RTK	receptor tyrosine kinase
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	sodium dodecyl sulfate
SFRP	soluble frizzled-related protein
SHH	sonic hedgehog
TKI	tyrosine kinase inhibitor
TSA	trichostatin A
5-Aza-dC	5-Aza-2'-deoxycytidine

第 一 章

高分子ハイドロゲルを用いたがん幹細胞の新規誘導法の開発および分子メカニズムの解明

【緒言】

がん幹細胞（Cancer stem cell、CSC）は腫瘍組織中に存在し、正常幹細胞と同様に自己複製能、多分化能を併せ持つ細胞であり、高い薬剤排泄能と放射線治療抵抗性を有する CSC[18] を完全に死滅させることは困難であり、再発・転移の原因となる。従来のがん細胞からの CSC 誘導法には、細胞培養時に epidermal growth factor (EGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF) 等の各種成長因子を添加後、腫瘍組織・細胞から CSC 特異的表面抗原である CD44 や CD133 を発現した細胞の分取、CSC に高発現している ATP-binding casette (ABC) トランスポーターの薬剤排出機構を利用した細胞分画を分取する方法、同じく CSC に高発現する薬剤代謝酵素 Aldehyde dehydrogenase (ALDH) の細胞分画の分取が実施されている(図 1)[17,29,30] 。しかし、これらの方法は使用する試薬が高価であるためコストが高く、また操作手順の多さから作業が煩雑となり、且つ誘導可能な CSC の数もごく少数に限られることから、より簡便で効率の良い CSC 誘導法の開発が望まれる。

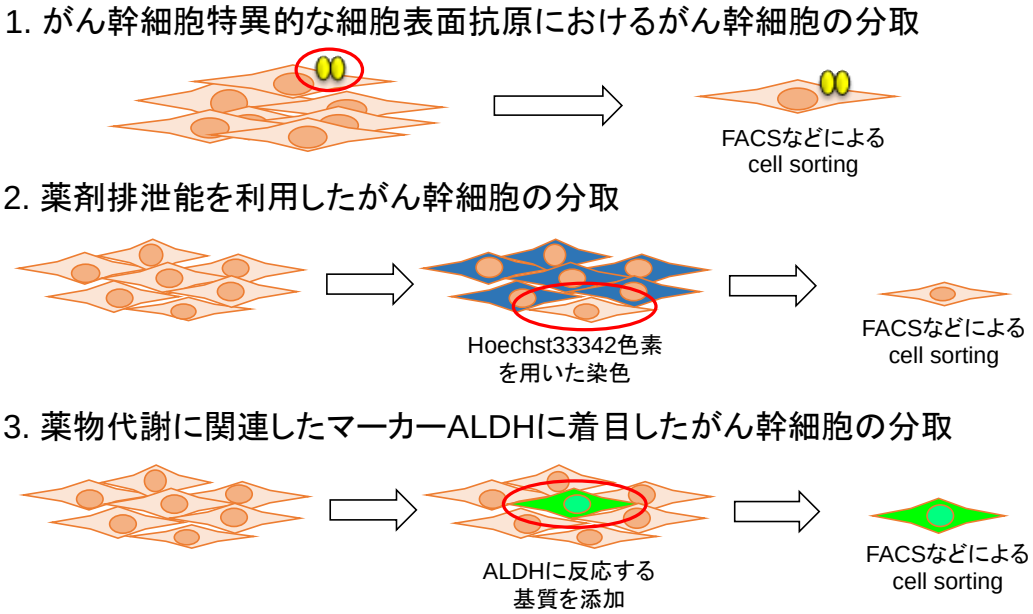

図 1　従来のがん幹細胞の誘導・濃縮法
1) がん幹細胞特異的な細胞表面抗原を標的として fluorescence activated cell sorting (FACS) によりがん幹細胞を分取する方法。2) がん幹細胞における高い薬剤排泄能を利用し、Hoechst33342 色素を用いて細胞を染色し、色素が排出された細胞をがん幹細胞として分取する方法。3) がん幹細胞に高発現する薬物代謝マーカーの aldehyde dehydrogenase (ALDH) に着目し、ALDH に対する基質を添加後、反応した細胞をがん幹細胞として分取する方法。

ハイドロゲルは高分子鎖に結合した親水性官能基により水分を豊富に含むゲルを指し、親水性にも関わらず、ゲル内の高分子のネットワーク架橋の影響により、溶解せずに存在することが可能となる[31]。過去にはマウスiPS細胞をハイドロゲル上で培養すると幹細胞性が維持されることが報告されており[32]、ハイドロゲルは幹細胞性の維持を補助することが考えられる。

本研究では、培養基材としてハイドロゲルに焦点を絞り、北海道大学で開発された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[33]を用いた（図2)。今回着目したDNゲルは弾性力に優れ、水分を90%以上含む生体適合性に優れたゲルである。先行研究において、DNゲルには間葉系幹細胞の誘導を促し、軟骨自然再生を誘導する能力があることが明らかとなり[34]、再生医療への応用が期待されている。

本章では、DNゲルを使用した膠芽腫および他の癌腫の細胞の培養を実施し、CSC誘導能の解析を実施し、誘導されたがん幹細胞に特異的な性質の探索と、治療応用への可能性を模索した。

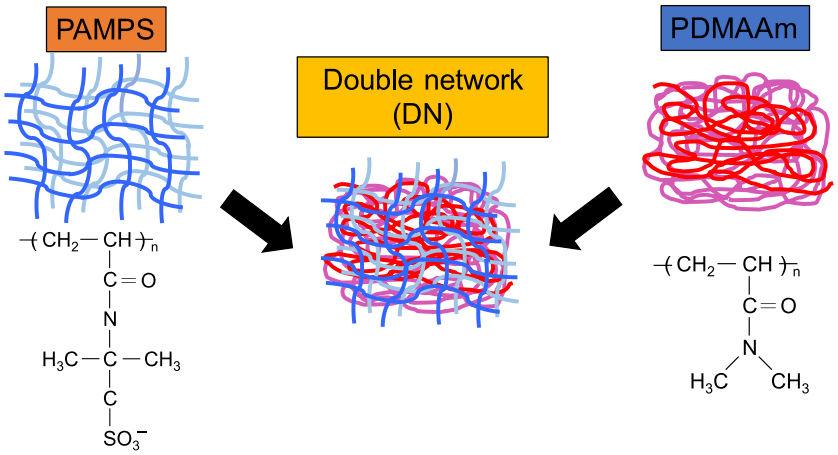

図2　DNゲルの模式図
(左) poly(2-acrylamide-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS) ゲルの模式図および化学式。(中央) poly(2-acrylamide-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS) ゲルとpoly(N,N'-dimethylacrylamide) (PDMAAm) ゲルを重合したDouble-network (DN) ゲルの模式図。(右) poly(N,N'-dimethylacrylamide) (PDMAAm) ゲルの模式図および化学式。

【実験方法】

1) DN ゲルの合成

PAMPS / PDMAAm DN ゲルは、以前に報告された two-step sequential polymerization method[35] を用いて合成された。 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS) (Toagosei Co. Ltd.、Japan)、N,N'-dimethylacrylamide (DMAAm) (KOHJIN Co. Ltd.、Tokyo、Japan)を購入した。PAMPS ゲルを合成するために、架橋剤として N,N'-methylenebisacrylamide (MBAA) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.、Tokyo、Japan)を、重合開始剤として 2-oxoglutaric acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd、Osaka、Japan)を用いたラジカル重合を行なった。モノマー濃度は PAMPS では 1 M、架橋剤は 4 mol%、重合開始剤は 0.1 mol%であった。モノマー、架橋剤及び開始剤を含む水溶液は、シリコンゴムで隔てられた一対のガラス板からなる反応セルに注入し、アルゴンガス存在下において、紫外線光（波長 365 nm）を約 8 時間照射した。DN ゲルは、two-step sequential polymerization method により合成した。PAMPS ゲル（1st network）を、0.1 mol% MBAA および 0.1 mol% 2-oxoglutaric acid を含む 2 M の DMAAm の水溶液に、平衡に達するまで 1 日間浸漬した。その後、アルゴンガス存在下で 2 枚のガラスの間で UV を 8 時間照射することにより、2nd network である PDMAAm を PAMPS ゲル存在下で重合させた。重合後、DN ゲルを HEPES (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）緩衝溶液（1.55×10^{-2} M $NaHCO_3$、0.14 M NaCl、5×10^{-3} M HEPES、pH 7.4）に浸漬し、HEPES 緩衝溶液を 7 日間以上毎日交換して平衡に達したものを細胞培養に用いた。

2) 細胞株および DN ゲル上での細胞培養法

ヒト膠芽腫細胞株 KMG4、U138、U343、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa、ヒト肺癌細胞株 A549、ヒト口腔癌細胞株 HSC-3、ヒト大腸癌細胞株 WiDr、ヒト膀胱癌細胞株 J82、ヒト滑膜肉腫細胞株 Fuji、SYO-1 を、10%ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100 U/ml ストレプトマイシン、2 mM L-glutamin を添加した DMEM を用い、5% CO_2、37℃のインキュベーター内で培養した。膠芽腫患者由来初代培養細胞である G137、G140、G144、G150 細胞は手術検体より樹立し、AGM™ SingleQuots™ (0.5 ml ascorbic acid、0.5 ml recombinant human FGF、0.5 ml GA-1000、1.25 ml insulin、0.5 ml L-glutamine）を含んだ ABM™ Astrocyte

Cell Basal Medium (Lonza、Walkersville、MD) を用いて 5% CO_2、37℃のインキュベーター内で培養した（北海道大学病院自主臨床研究番号 自 015-0035)。DN ゲルは培養ディッシュの大きさに合わせて型抜きを実施後、オートクレーブ滅菌を行なった。DN ゲルを培養ディッシュに沈め、培養細胞に合わせた培地で一晩浸漬後、ゲル上に 1.0×10^5 cells/ml の濃度となるように細胞を播種し、培養した。コントロールとして通常培養条件である polystyrene (PS) ディッシュ上で培養した細胞を用いた。

3) KMG4-tdTomato-Luc2 細胞の作製

発光酵素 Luc2、赤色蛍光蛋白質 tdTomato の共発現ベクターpCSII-CMV-tdTomato-Luc2 (北海道大学遺伝子病制御研究所血管生物学教室の樋田京子特任准教授より供与) を、FuGENE® HD transfection reagent (Promega、Madison、WI、USA) を用いて KMG4 細胞に遺伝子導入後、0.2 mg/ml ゼオシン（Invitrogen、Carlsbad、CA、USA）にて薬剤選択を実施した。tdTomato-Luc2 陽性 KMG4 細胞の樹立確認のために、蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence、Tokyo、Japan) にて赤色蛍光蛋白質の発現およびルシフェラーゼアッセイにて発光酵素活性が十分であることを確認した。

4) KMG4-tdTomato-Luc2 細胞の免疫不全マウスへの同所性移植および生体内化学発光イメージング

6 週齢、メスの NOD/ShiJic-scid Jcl マウス（CLEA Japan Inc.、Tokyo、Japan）を、1.75% イソフルラン（60 mg/kg) (ファイザー）で全身麻酔後、30 G 注射針を用いて KMG4-tdTomato-Luc2 細胞を 5.0×10^2 個/匹となるように 10 μl phosphate-buffered saline (PBS) で懸濁し、右大脳半球へ移植した。DN ゲルは粉砕後に 100 μm のフィルターで濾過し、移植時には PBS に混合した粉砕 DN ゲル溶液と細胞懸濁液が等量になるように調整した。腫瘍細胞の生着及び増大の確認には、IVIS Spectrum imaging system (Caliper Life-Sciences、Hopkinton、MA、USA) を用いた。マウスを 1.75% イソフルランにより全身麻酔後、VivoGlo Luciferin *in vivo* Grade (Promega) を腹腔内へ投与し、IVIS による化学発光の検出を 1 週間に 1 回行なった。上記の動物実験は全て「北海道大学動物実験に関する規定」および「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」に従って実施した。

5）組織学的検討

IVIS にて腫瘍形成が確認されたマウスを安楽死させた後、脳を摘出し、4%緩衝ホルマリン溶液もしくは PAXgene Tissue System (PreAnalytiX、Hombrechtikon、Switzerland）を用いて固定した。組織切片は hematoxylin & eosin (H&E）染色及び抗 Ki-67 抗体（clone MIB-1、cat. M7140、1:200) (Dako、Glostrup、Denmark）を用いた免疫組織化学により組織標本を作製した。

6) RNA 抽出および遺伝子発現解析

RNeasy Mini Kit (Qiagen、Valencia、CA、USA）を用いて細胞から total RNA を抽出後、SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen）を用いて逆転写反応により cDNA を作製した。遺伝子発現解析には Power SYBR® Green Master Mix の調整法に従い、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems、Foster、CA、USA）を使用して定量 RT-PCR 法を実施した。使用したプライマーの配列は以下の表に示す通りである。

表 1　定量 RT-PCR 法にて使用したプライマーの一覧

Target	Direction	Sequences
GAPDH	Forward	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	Reverse	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
GLI1	Forward	5'-GAGACGCCATGTTCAACTCG-3'
	Reverse	5'-AGACAGTCCTTCTGTCCCCA-3'
Nanog	Forward	5'-TGCAATGTCTTCTGCTGAGAT-3'
	Reverse	5'-GTTCAGGATGTTGGAGAGTTC-3'
Oct3/4	Forward	5'-CGACCATCTGCCGCTTTGAG-3'
	Reverse	5'-CCCCCTGTCCCCCATTCCTA-3'
OPN	Forward	5'-CTCCATTGACTCGAACGACTC-3'
	Reverse	5'-CAGGTCTGCGAAACTTCTTAGAT-3'
SHH	Forward	5'-CGGAGCGAGGAAGGGAAAG-3'
	Reverse	5'-TTGGGGATAAACTGCTTGTAGGC-3'
Sox2	Forward	5'-AGTCTCCAAGCGACGAAAAA-3'
	Reverse	5'-GGAAGTTGGGATCGAACAA-3'

7）イムノブロッティング法

細胞に radioimmunoprecipitation assay (RIPA）バッファー［10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA、150 mM NaCl、10% glycerol、1%

Triton X-100、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、50 mM NaF、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4)、 protease inhibitor mixture: Complete (EDTA-free) protease inhibitor (Roche、Basel、Switzerland)］を添加し、氷上にて 20 分間静置後、4℃にて 15,000 rpm、15 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に 5×還元サンプルバッファー（5×Laemmli sample buffer）を添加し、95℃にて 5 分間熱変性させ、イムノブロッティング法のサンプルとして用いた。10% SDS アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を実施後、分離された蛋白質を PVDF メンブレン (Millipore、Billerica、MA、USA）に転写した。転写後のメンブレンは TBS-T で希釈した 2% BSA もしくは 3%スキムミルク溶液を用いてブロッキング後、一次抗体にて 4℃、一晩インキュベートを行った。反応後のメンブレンは TBS-T で洗浄後に二次抗体にて室温、1 時間インキュベートし、再度 TBS-T で洗浄後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare、Little Chalfont、UK）または SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFischer Scientific、Waltham、MA、USA）による処理後、LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いてシグナルを検出した。一次抗体は anti-Phospho-EGFR (Y1068)、anti-Phospho-EGFR (Y1148)、anti-phospho-MET (Y1234/1235)、anti-MET (25H2)、anti-phospho-FAK (Y397)、anti-FAK、anti-phospho-c-Src (Y416)、anti-phospho-AKT (Ser473)、anti-phospho-p44/42 MAPK (T202/Y204) (D13.14.4E) XP™、anti-phospho-p38 MAPK (T180/Y182) (D3F9) XP™ (Cell Signaling Technologies、Beverly、MA、USA)、anti-Actin (clone C4) (Millipore)を使用した。

8) 培養細胞の透明化処理及び蛍光染色法

各細胞を DN ゲル及びコラーゲン固相化ガラスディッシュ上で 3 日間培養後、細胞を PBS で洗浄し、3% paraformaldehyde/PBS を用いて室温、15 分間固定した。固定後、透明化試薬 Sca*l*e A2 (4M urea、0.1% Triton X-100、10% glycerol) [36] を添加し、4℃、一晩反応させた。翌日、0.1% Triton X-100 にて室温、4 分間反応させ、1% BSA/PBS にて室温、20 分間ブロッキングを実施した。その後、一次抗体で 4℃、一晩反応後、二次抗体で室温、1 時間反応させた。再度 Sca*l*e A2 にて 4℃、一晩反応後に撮影を実施した。画像撮影には共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV3000 (Olympus、Tokyo、Japan）を用いた。一次抗体として anti-Sox2 (D6D9)

(Cell Signaling Technologies)、二次抗体として AlexaFluor488 conjugated secondary antibody、AlexaFluor594 conjugated secondary antibody (Invitrogen)を使用した。

9) DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析

Total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて KMG4 より抽出した。マイクロアレイ解析には SurePrint G3 Human GE Microarray 8×60K (Agilent、Santa Clara、CA、USA) を、階層的クラスタリングには Cluster 3.0 (http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm)、ヒートマップの可視化には Java Treeview 1.1.6 (http://jtreeview.sourceforge.net) を使用した。

10) オステオポンチンの中和による幹細胞性遺伝子の発現への影響

0.1 M 炭酸−重炭酸塩緩衝液を用いて 300 ng/ml に希釈した recombinant human osteopontin (OPN) 蛋白 (Peprotech、Offenbach、Germany) により、6 cm 径の細胞培養ディッシュの底面を 4℃、一晩固相化した。翌日 0.5% BSA/PBS を用いて室温、1 時間ブロッキングを実施した後、10 μg/ml OPN 中和抗体 (clone 35B6、福山大学薬学部分子免疫学研究室の今重之教授より供与) または control mouse IgG (Sigma aldrich、St. Louis、MO、USA) を用いて 4℃、30 分間固相化した。その後、2.0×10^5 個/ディッシュとなるように KMG4 細胞を播種し、37℃、24 時間培養後、total RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、定量 RT-PCR 法にて幹細胞性遺伝子の発現変動を検討した。

11) クロマチン免疫沈降法

全ての行程は Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Millipore) を用いて実施した。DN ゲル、PS ディッシュ上で KMG4 細胞を培養後、1% ホルムアルデヒドで 37℃、10 分固定した。洗浄後、細胞を 1 mM PMSF、1 mM Na_3VO_4、Complete (EDTA-free) protease inhibitor (Roche、Basel、Switzerland) を添加した SDS Lysis Buffer で溶解し、氷上に 10 分間静置後、超音波 (10 秒×4 回) によるクロマチンの剪断を行なった。細胞溶解液を 4℃、13,000 rpm、10 分間遠心後、上清を新しいチューブに回収し、ChIP Dilution Buffer にて 10 倍量に希釈し、そのうち 20 μl を input PCR およびイムノブロッティング用のサンプルと

した。希釈したサンプルのうち 2 ml に 50 µl Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA (50% Slurry) を添加し、4℃にて 30 分間回転混和させ、遠心後に得た上清に対し抗 GLI1 抗体（Cell Signaling Technologies）を添加し、4℃にて一晩回転混和を行なった。陰性対照には 60 µl Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA (50% Slurry) を添加した。形成された免疫複合体を Low Salt Immune Complex Wash Buffer (1 回)、High Salt Immune Complex Wash Buffer (1 回)、LiCl Immune Complex Wash Buffer (1 回)、TE Buffer (2 回) の順で洗浄を行い、イムノブロッティング用サンプルは 25 µl Laemmli buffer を添加後に 10 分間加熱した。PCR 用サンプルは 5 µl 0.5 M EDTA、10 µl 1 M Tris-HCl (pH 6.5)、1 µl 10 mg/ml Proteinase K を添加後、45℃にて 1 時間インキュベートし、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製した。PCR は、GLI1 が結合し得る Osteopontin プロモーター領域を認識する配列のプライマー（Forward: 5'- CTGACAGAAAATCCTACTCAGAAAA-3'、Reverse: 5'- AAAGTAGGAAATGGATGCTGCG-3'）を用いて実施した。

12）脳腫瘍患者の生存解析

Osteopontin の遺伝子発現と脳腫瘍患者の生存期間の関連に関する解析は、公共データベースの REMBRANDT (https://gdoc.georgetown.edu）および Prognoscan (http://www.abren.net/PrognoScan/) を用いて実施した。

13）統計学的解析

群間比較の実施には Student's *t*-test を行なった。$P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

【実験結果】

1) DN ゲル上で培養した膠芽腫細胞のスフィア形成とがん幹細胞性の誘導

ヒト膠芽腫細胞株 KMG4、U138、U343 を DN ゲル、PS ディッシュ上で 3 日間培養すると、PS ディッシュ上では細胞が接着し、足を伸ばした形態を示したが、DN ゲル上では 24 時間以内に細胞が凝集を始め、スフィア形成を示した（図 3 A)。また、膠芽腫患者由来初代培養細胞 G137、G140、G144、G150 においても細胞株と同様、DN ゲル上ではスフィア形成が認められた（図 3 B)。DN ゲル上で培養した KMG4 細胞のスフィア形成、および幹細胞性遺伝子 *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の遺伝子発現の経時的な変化を検討したところ、培養 1 日目よりスフィアを形成した（図 3 C)。*Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の遺伝子発現は PS ディッシュと比較して DN ゲル上では 1 日目から発現上昇が認められ、14 日目まで維持された（図 3 D)。DN ゲル上で 3 日間培養したスフィア内での幹細胞の局在を検討するため、蛍光染色法による Sox2 蛋白の検出を実施した。Sox2、Neurofilament (神経細胞マーカー）の共染色の結果、両者の発現は排他的であり、スフィア断面図において Sox2 の発現細胞は集塊辺縁部に存在する傾向が認められた（図 3 E)。

2) 様々なヒトがん細胞株における DN ゲル上でのがん幹細胞性誘導

DN ゲルによる CSC 誘導能が膠芽腫以外の癌腫においても認められるかどうかを検討するため、子宮頸癌細胞株 HeLa、肺癌細胞株 A549、口腔癌細胞株 HSC3、大腸癌細胞株 WiDr、膀胱癌細胞株 J82、滑膜肉腫細胞株 Fuji および SYO1 を DN ゲル、PS ディッシュ上にて 24 時間培養した。KMG4 細胞と同様に、DN ゲル上では全ての細胞において細胞凝集塊およびスフィアを形成する傾向を示し（図 4 A)、*Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の遺伝子発現上昇も認められた（図 4 B)。

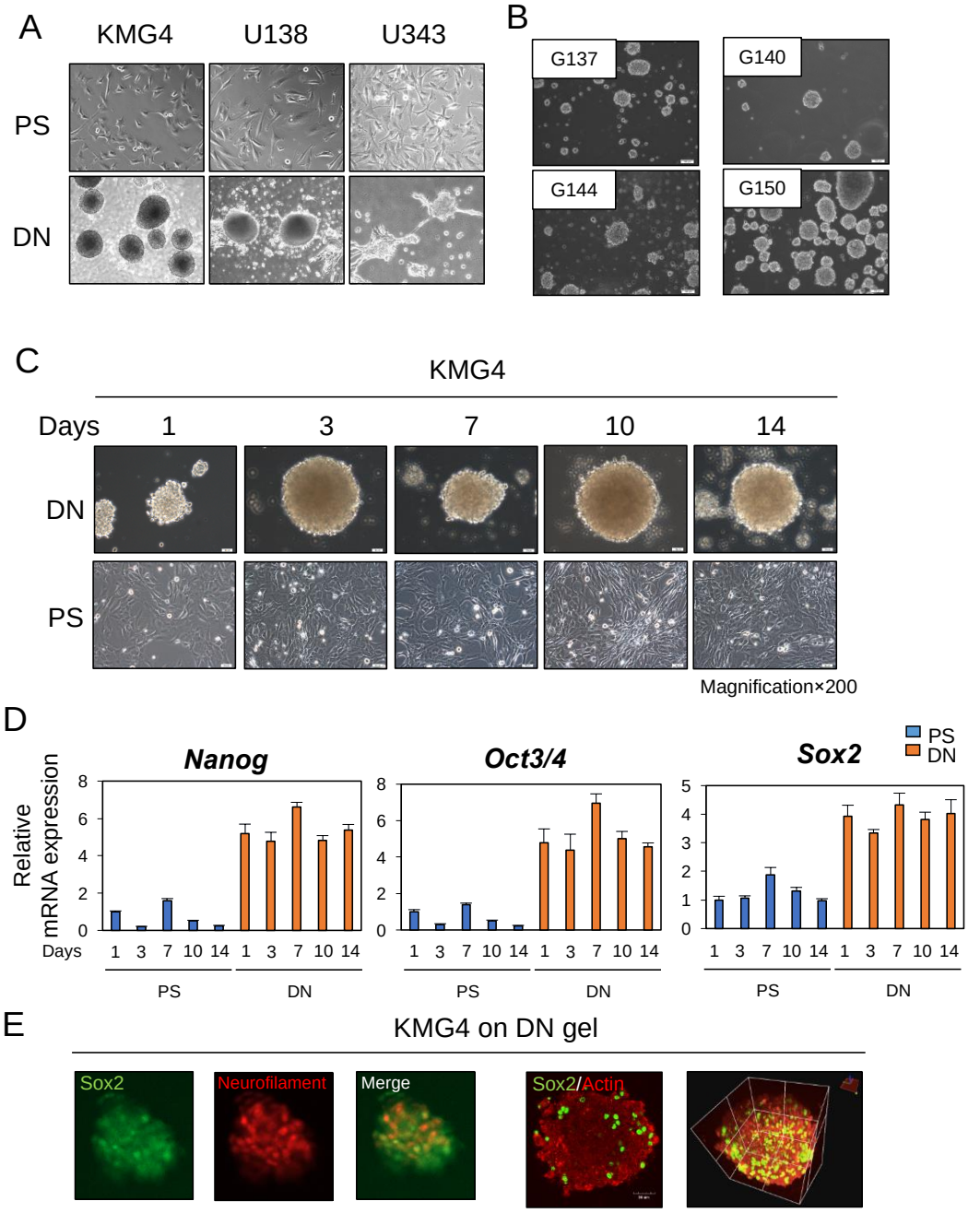

図 3　DN ゲル上における膠芽腫細胞の幹細胞性誘導
(A) ヒト膠芽腫細胞株 KMG4、U138、U343 を PS ディッシュ、DN ゲル上で 3 日間培養、(B) 膠芽腫患者由来初代培養細胞 G137、G140、G144、G150 を DN ゲル上で 3 日間培養後の形態像を示す。いずれも対物 20 倍。(C) KMG4 を 1、3、7、10、14 日間 PS ディッシュ、DN ゲル上で培養した際の形態像（対物 20 倍)。(D) (C)で培養した KMG4 における定量 RT-PCR 法による *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の遺伝子発現解析。青は PS、橙は DN を示す。(E) DN ゲル上で 3 日間培養した KMG4 における Sox2 (緑)、Neurofilament (左から 2、3 枚目:赤)、Actin (左から 4、5 枚目:赤) の蛍光染色像を示す。左より 1～3 枚目は対物 20 倍、4、5 枚目は対物 40 倍。

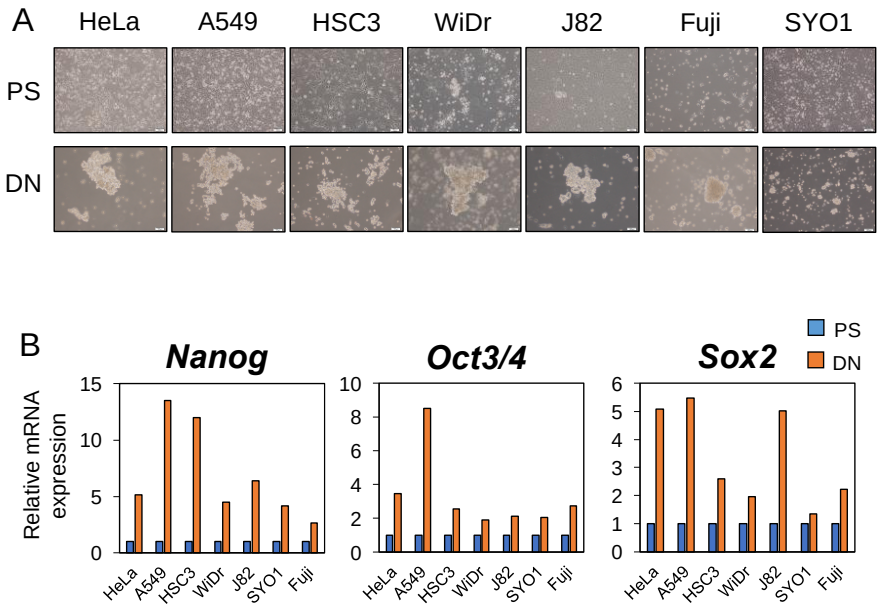

図 4　DN ゲル上における様々な癌腫細胞株の幹細胞性誘導
ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa、ヒト肺癌細胞株 A549、ヒト口腔癌細胞株 HSC3、ヒト大腸癌細胞株 WiDr、ヒト膀胱癌細胞株 J82、ヒト滑膜肉腫細胞株 Fuji、SYO1 における (A) PS ディッシュ、DN ゲル上で 3 日間培養後の形態（対物 10 倍)。(B) (A)の細胞において定量 RT-PCR 法による *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2* の遺伝子発現結果。青は PS、橙は DN を示す。

3) マウス脳内における腫瘍形成能の検討

DN ゲル上で形成された CSC 様のスフィアの *in vivo* 腫瘍形成能を評価するため、NOD/ShiJic-scid マウス脳内へ下記各種条件下で培養した KMG4 細胞を移植した。IVIS Spectrum による *in vivo* ライブイメージングを行うため、pCSII-CMV-tdTomato-Luc2 ベクターを用いて、tdTomato-Luc2 遺伝子を安定的に過剰発現して樹立した KMG4-tdTomato-Luc2 細胞を用いた。蛍光顕微鏡により赤色蛍光蛋白質 tdTomato の発現、およびルシフェラーゼアッセイによりルシフェラーゼ活性が十分であることが確認できた（図 5 A)。

移植には、A: DN ゲル上で培養した KMG4-tdTomato-Luc2 細胞および粉砕 DN ゲル、B: DN ゲル上で培養した KMG4-tdTomato-Luc2 細胞、C: PS ディッシュ上で培養した KMG4-tdTomato-Luc2 細胞、D: 粉砕 DN ゲルの 4 条件を用いた。細胞培養日数はいずれも 3 日間である。*In vivo* live イメージングの結果より、DN ゲル上で培養した KMG4 細胞および粉砕 DN ゲルを移植した群では 5 週目の時点で腫瘍を形成したマウスが最も多く（3/5) (図 5 B、C)、経時的な IVIS の発光解析では最も早く 3 週目の時

点で検出された（図 5 D)。形成された腫瘍の病理組織学的解析を実施したところ、KMG4 細胞は脳実質において大きな腫瘍を形成し、DN ゲルに接触し、足場として利用していることが示唆される像が認められた（図 5 E)。

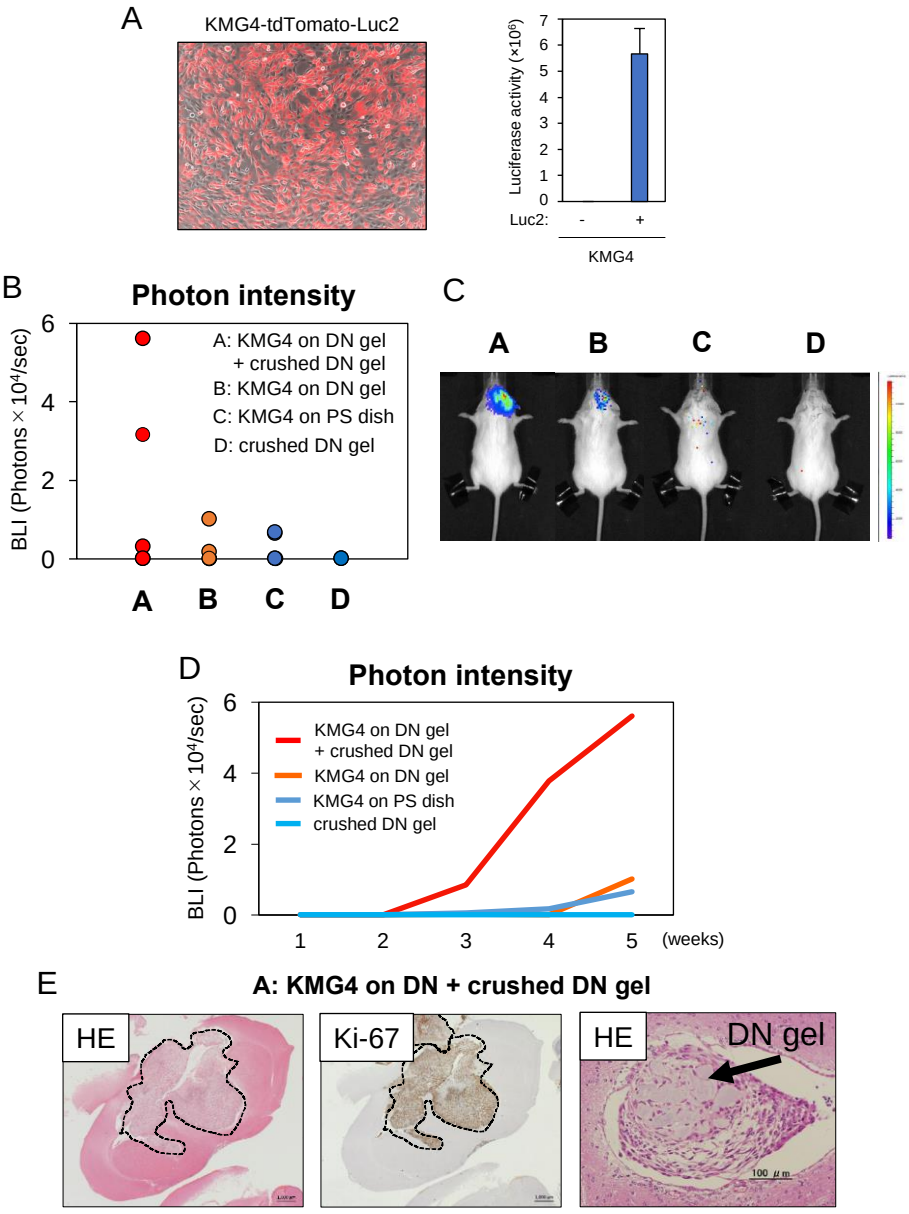

図 5　マウス脳内における腫瘍形成能の検討
(A) KMG4-tdTomato-Luc2 細胞の tdTomato (赤) 陽性細胞像（左: 対物 10 倍）および Luc2 発現強度。(B), (C) マウス脳内へ KMG4-tdTomato-Luc2 を移植後 5 週目時点での IVIS imaging system で検出した際の各条件(A: KMG4-tdTomato-Luc2 on DN gel + crushed DN gel, B: KMG4-tdTomato-Luc2 on DN gel, C: KMG4-tdTomato-Luc2 on PS dish, D: crushed DN gel) における生物学的発光強度（B: 各個体毎、C: D で示したマウスの 5 週目時点での IVIS 検出像) (D) 最も大きな腫瘍を形成したマウスにおける発光強度の経時的な変化。(E) 条件 A における脳組織の H&E 像および Ki-67 染色像。

4) DN ゲル上で培養した膠芽腫細胞におけるシグナル伝達経路の解析

がん幹細胞性を規定する重要な因子の一つに、キナーゼを介したシグナル伝達が関与することが報告されている[37]。そこで DN ゲルががん幹細胞性を誘導するメカニズムを解明するために、キナーゼに関するシグナル伝達に着目し、イムノブロッティングを実施した。DN ゲル上で細胞が凝集塊を形成し始めるのは約 6 時間後、完全にスフィアを形成するのは約 24 時間後であった（図 6 A)。PS ディッシュ上での培養と比較し、DN ゲル上ではいずれのキナーゼにおいても 6～24 時間の時点でリン酸化が亢進し、細胞がスフィアを形成し始めるタイミングとほぼ同時期にシグナル伝達の亢進が認められた（図 6 B)。

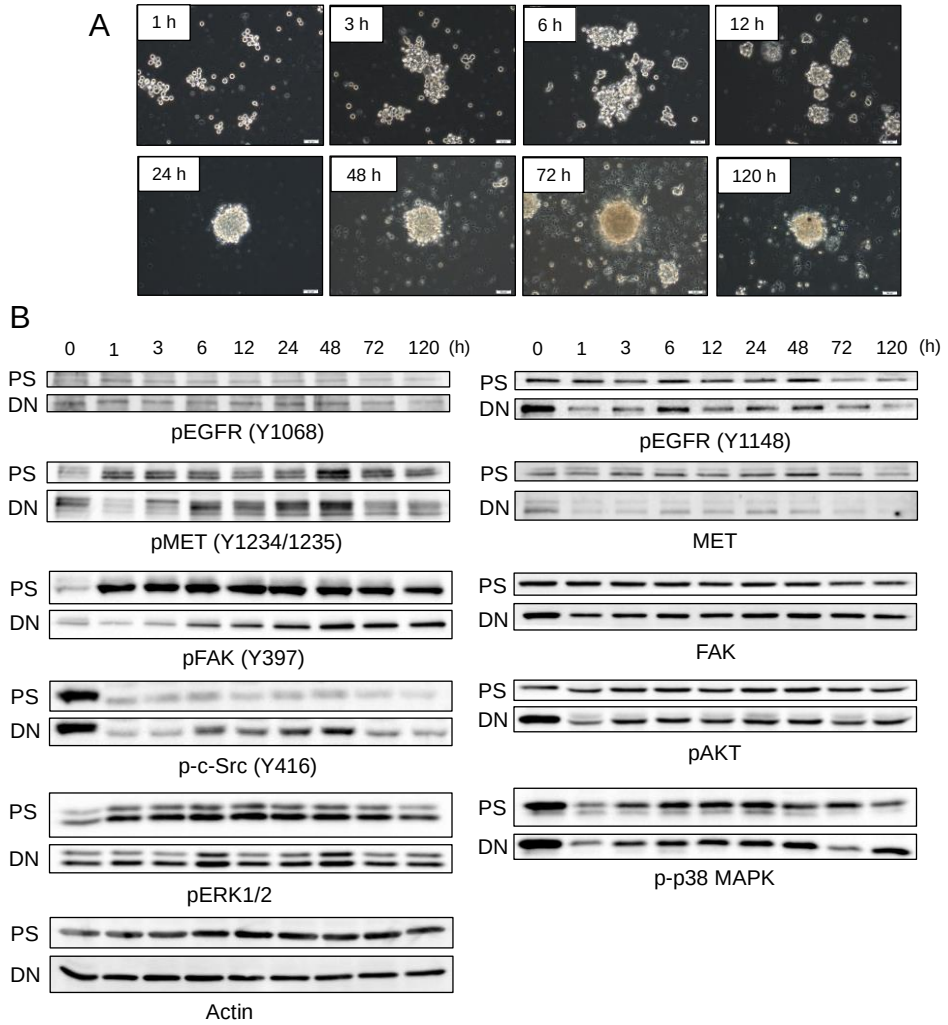

図 6　DN ゲル上で培養した KMG4 細胞の経時的な細胞形態およびシグナル伝達
(A) DN ゲル上で培養した KMG4 細胞の経時的な形態変化像。対物 10 倍。(B) PS ディッシュおよび DN ゲル上で培養した KMG4 細胞におけるイムノブロッティングによるキナーゼの発現およびリン酸化の変化。

5) DN ゲルで誘導された膠芽腫幹細胞の性質を規定する分子の同定

DN ゲルにより誘導される膠芽腫の幹細胞性およびシグナル伝達を規定する分子を同定するため、KMG4 細胞を用いた DNA マイクロアレイを実施した。幹細胞性遺伝子の発現上昇、且つシグナル伝達の亢進が認められた初期段階での遺伝子の動きに着目し、播種時のサンプルを 0 時間とし、PS ディッシュ培養 6、24、48 時間、DN ゲル培養 6、24、48 時間の細胞を使用した。Heat map、dendrogram より、DN ゲル上では 24、48 時間の時点において PS ディッシュ上とは異なった遺伝子発現パターンを示した（図 7 A、B)。DNA マイクロアレイの結果より有意に変動した遺伝子を選定するために、Pathway analysis を利用し、DN ゲルでのみ検出されたパスウェイの変動における有意差が $P < 0.001$、発現に関しては 0 時間に対して DN ゲルで亢進かつ PS ディッシュの同時間と比べて Fold change が 3 倍以上の遺伝子を選定した。図 7 C および表 2 にパスウェイの名称、発現上位 11 遺伝子を示した。その中でも Osteopontin (OPN) は早期に発現が亢進し、維持された。

6) OPN と膠芽腫幹細胞との関連性の検討

OPN は分子量が約 35 kDa の分泌蛋白質であり、インテグリンや CD44 との結合を示す [38,39]。脳腫瘍においては、血管周囲微小環境において OPN - CD44 シグナル経路を介した幹細胞性の亢進が報告されている [40]。

KMG4 細胞における OPN の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法にて検証したところ、DNA マイクロアレイの結果と同様、DN ゲル上で 6、24、48 時間のいずれのタイミングでも発現が上昇した（図 8 A)。また、OPN の遺伝子発現と脳腫瘍患者予後との関連性を検討した結果、OPN 遺伝子の高発現患者群は低発現患者群と比較し、有意に予後不良であったことから（図 8 B)、OPN は脳腫瘍の悪性化において重要な因子であることが示唆された。

また、OPN と膠芽腫の幹細胞性における関係を検討するため、OPN の中和抗体やリコンビナント蛋白を用いた中和実験により、KMG4 細胞への影響を検討した。未処理の KMG4 細胞と比較し、OPN リコンビナント蛋白（300 ng/ml）の存在下では *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の遺伝子発現はいずれも上昇したが、OPN リコンビナント蛋白存在下で OPN 中和抗体（10 μg/ml）を添加した群では未処理 KMG4 細胞のレベルまで発現が低下した (図 8 C)。このことから、KMG4 細胞においても OPN が幹細胞性遺伝子の発現制御に関与することが示された。

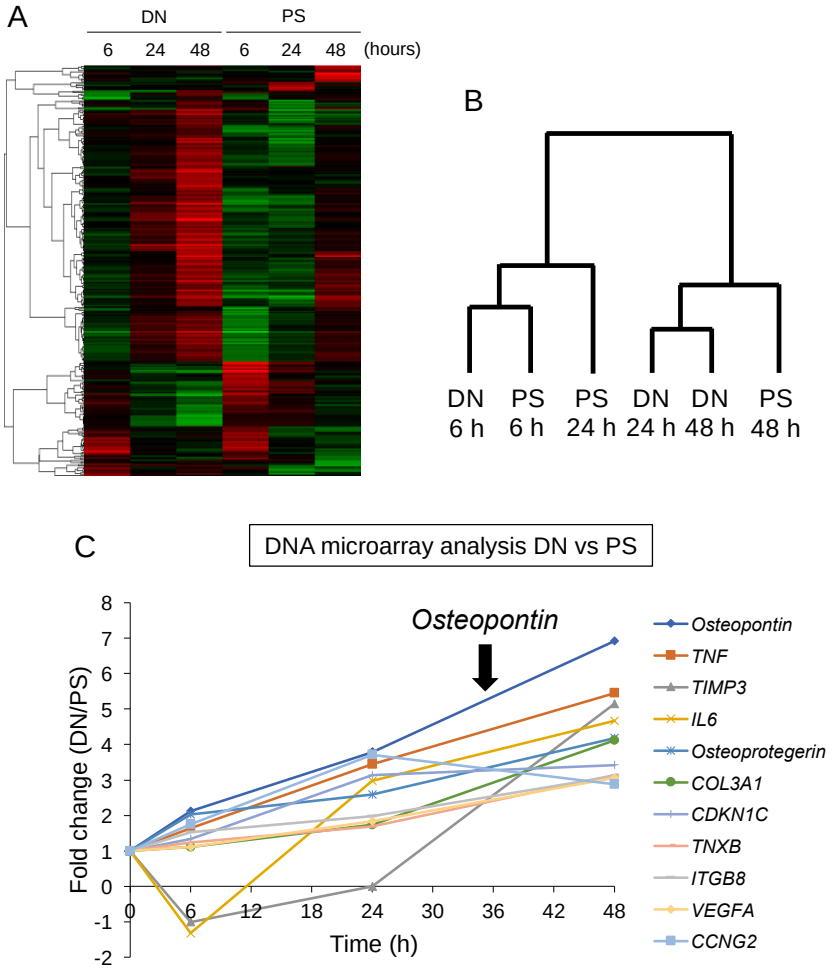

図 7　DN ゲル、PS ディッシュ上で培養した KMG4 の DNA マイクロアレイ解析
DN ゲル、PS ディッシュ上でそれぞれ 6、24、48 時間培養した KMG4 の Heat map (A) と dendrogram (B)。(C) DNA マイクロアレイ結果より、PS ディッシュと比較して DN ゲル上で発現が上昇した上位 11 遺伝子およびその発現比。

表 2　DN ゲル、PS ディッシュ上で培養した KMG4 の DNA マイクロアレイ解析結果

Pathway 1)	Symbol 2)	Fold Change (DN vs PS) 3)			
		0 h	6 h	24 h	48 h
Osteoclasts	Osteopontin	1	2.12	3.79	6.92
SIDS susceptibility	TNF	1	1.64	3.44	5.45
Endochondral Ossification	TIMP3	1	-1.01		5.15
SIDS susceptibility	IL6	1	-1.32	2.98	4.67
Osteoblat signaling	Osteoprotegerin	1	2.02	2.59	4.18
Focal adhesion	COL3A1	1	1.11	1.73	4.12
G1 to S cell cycle control	CDKN1C	1	1.34	3.13	3.42
Focal adhesion	TNXB	1	1.24	1.68	3.14
Focal adhesion	ITGB8	1	1.53	1.98	3.11
Focal adhesion	VEGFA	1	1.1	1.83	3.06
G1 to S cell cycle control	CCNG2	1	1.75	3.71	2.88

1) 所属 pathway、2) 遺伝子のシンボル名、3) 各時間帯における DN ゲル上 KMG4 細胞 vs PS ディッシュ上 KMG4 細胞の遺伝子発現比。

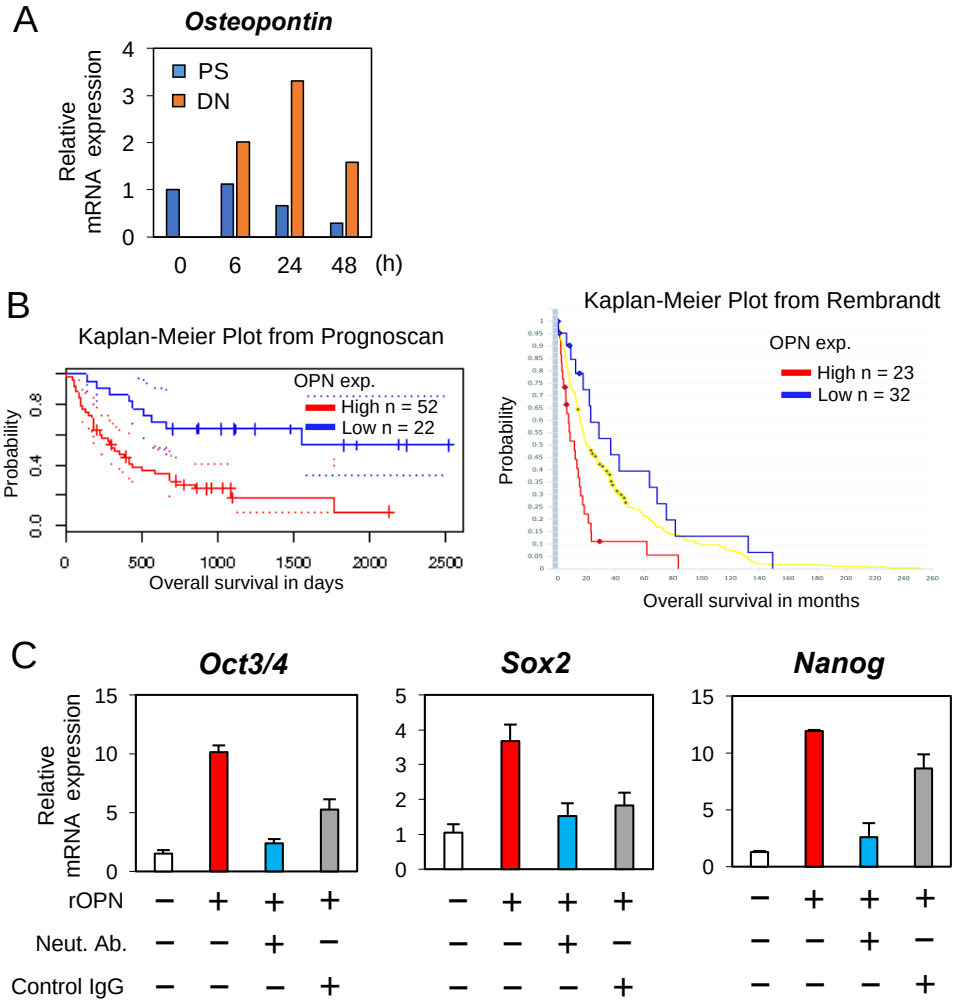

図 8　オステオポンチンと膠芽腫患者予後および幹細胞性との関連性
(A) DN ゲル、PS ディッシュ上でそれぞれ 0、6、24、48 時間培養した KMG4 細胞での *OPN* の遺伝子発現結果。(B) *OPN* の遺伝子発現の程度と脳腫瘍患者の生存期間を示した Kaplan-Meier plot (左: Prognoscan、右: Rembrandt より)。赤: *OPN* 高発現群、青: *OPN* 低発現群。(C) KMG4 細胞にリコンビナント OPN 蛋白 300 ng/ml および OPN 中和抗体 10 μg/ml (コントロール: mouse IgG 10 μg/ml) を投与時の定量 RT-PCR 法による *Oct3/4*、*Sox2*、*Nanog* の遺伝子発現結果。

7) クロマチン免疫沈降法を用いた GLI1 と OPN の関連性の検討

OPN はソニックヘッジホッグ経路に属する転写因子 Glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) による発現調節を受け、脳腫瘍幹細胞性に関与することが近年報告されている [41]。そこで、DN ゲルで誘導された膠芽腫幹細胞においても同様の現象が生じているかを検証した。定量的 RT-PCR 法の結果より、PS ディッシュ培養 KMG4 細胞と比較し、DN ゲル上においてソニックヘッジホッグ経路に属する GLI1 および分泌蛋白 Sonic hedgehog (SHH)の遺伝子発現は培養後 6 時間以降で上昇した (図 9 A)。

また、クロマチン免疫沈降法の結果より、DN ゲルは OPN のプロモーター領域への GLI1 の結合を促進することが示された（図 9 B)。

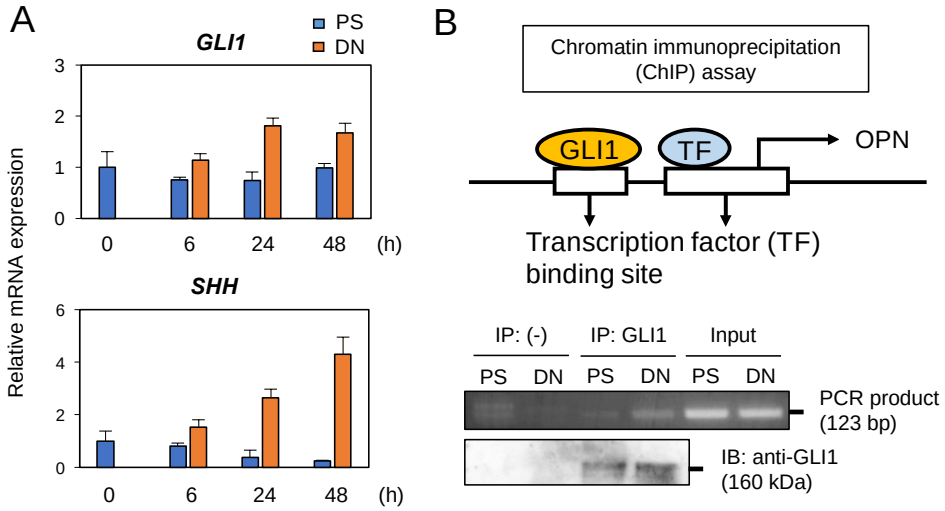

図 9　オステオポンチンとソニックヘッジホッグ経路との関連性
(A) DN ゲル、PS ディッシュ上でそれぞれ 0、6、24、48 時間培養した KMG4 細胞での定量 RT-PCR 法による *GLI1*、*SHH* の遺伝子発現結果。(B) OPN 遺伝子の promoter 領域と GLI1 の結合部位の模式図（上）および PS ディッシュ、DN ゲル上で培養した KMG4 を用いた ChIP assay 結果（IP: anti-GLI1 抗体) (下)。下図は OPN promoter 領域を PCR 法により増幅した図と、Anti-GLI1 抗体を用いたイムノブロッティング結果。

8) DN ゲル誘導膠芽腫幹細胞における受容体型チロシンキナーゼの変化

近年、がん治療において分子標的治療が盛んに実施されており、脳腫瘍においても分子標的治療の基礎的検討および臨床試験が実施されているが、側副経路の亢進や新たな薬剤耐性の獲得などが問題視されている [42]。また、膠芽腫では、治療標的として着目されている受容体型チロシンキナーゼ（Receptor tyrosine kinase: RTK）の c-Met、EGFR、PDGFR の遺伝子増幅が同一症例中の異なる部位において認められることが報告されており [10]、腫瘍細胞の不均一性は分子標的治療における治療標的の選択を困難にする。そこで DN ゲルにより誘導された膠芽腫幹細胞において、幹細胞特異的な RTK の同定および治療標的としての応用が可能かどうかを、膠芽腫患者由来初代培養細胞を用いて検討した。

初代培養細胞 G144 を PS ディッシュ、DN ゲル上で 3 日間培養すると、PS ディッシュ上ではほぼ全ての細胞で EGFR が高発現しており、一部分のみで PDGFR が発現していた（図 10 A)。一方、DN ゲル上での培養では EGFR のみならず PDGFR の発現も同程度に認められた（図 10 B)。また、EGFR 阻害剤 Gefitinib、PDGFR 阻害剤を投与し、24 時間後にアポトーシスを誘導した細胞を Caspase-3 の cleaved form により検出した

ところ、PS ディッシュと比較して DN ゲル上では Gefitinib、PDGFR 阻害剤ともにアポトーシスが誘導された（図 10 C)。

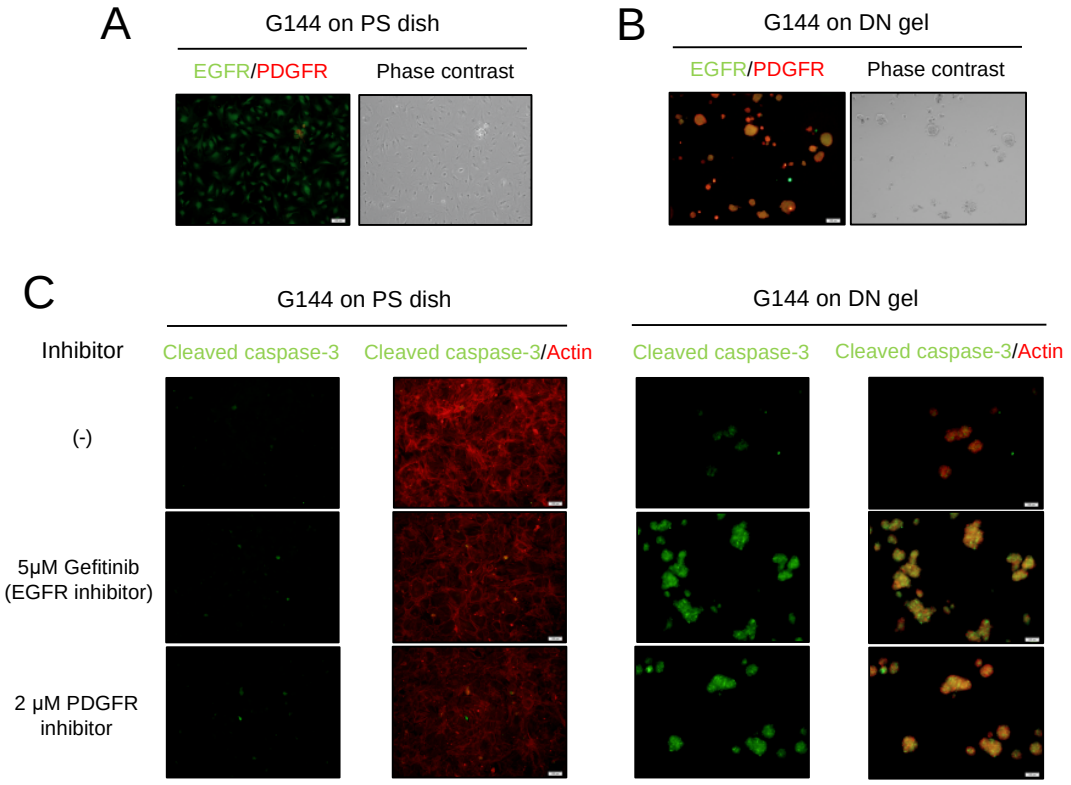

図 10　膠芽腫患者由来初代培養細胞 G144 における受容体型チロシンキナーゼの発現量変化
膠芽腫患者由来初代培養細胞 G144 を 3 日間培養したときの蛍光免疫染色像。
緑: EGFR、赤: PDGFR。(A)は PS ディッシュ上、(B)は DN ゲル上での結果。(C) 各種培養条件において EGFR 阻害剤 gefitinib 5 μM、PDGFR 阻害剤 2 μM、コントロールとして DMSO を投与 [(-)と表記] したときのアポトーシス誘導結果。緑: Cleaved caspase-3、赤: Actin。いずれの写真も対物 4 倍。

【考察】

本検討により、DN ゲル上でがん細胞を培養することで、幹細胞関連遺伝子 *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の発現が上昇することが明らかとなった。さらに膠芽腫細胞株 KMG4 においては、DN ゲルからの刺激による *in vivo* での造腫瘍能の亢進、キナーゼを介したシグナル伝達経路や、ソニックヘッジホッグシグナル経路を介した GLI1 や OPN の発現亢進により、幹細胞関連遺伝子の発現促進に繋がるといったメカニズムの解明に至った。本検討により明らかになった DN ゲル誘導膠芽腫幹細胞におけるシグナル伝達経路を図 11 に示す。第一段階として、DN ゲルはインテグリンなどの膜蛋白と相互作用する（Semba S *et al.*, in preparation)。その後、チロシンキナーゼの活性化および GLI1 の発現が亢進し [43]、OPN の発現を誘導する [41]。誘導された OPN は DN ゲルの表面に付着し、インテグリンおよび CD44 を刺激する [38-40] といった、がん幹細胞性の維持に繋がる持続的な刺激が DN ゲル上で生じることが示唆された。

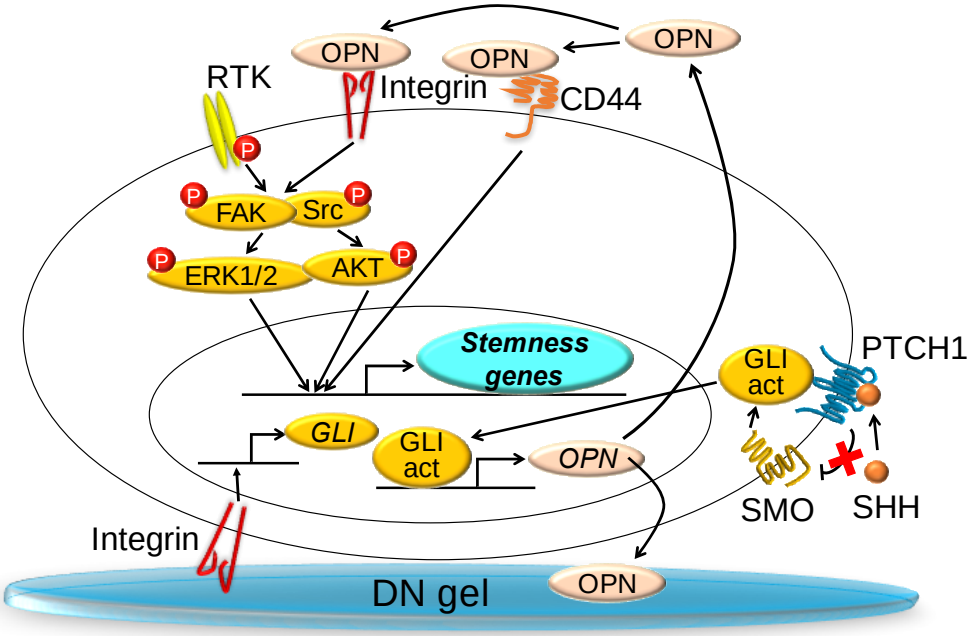

図 11　DN ゲルによる膠芽腫幹細胞の誘導メカニズムの模式図
初期段階にインテグリンなどの細胞膜蛋白質が DN ゲルからの刺激を受け、続いて RTK の活性化および GLI1 の発現亢進に伴い、OPN の発現を誘導する。OPN は細胞外に分泌され、DN ゲルへと付着し、インテグリンや CD44 を刺激後、幹細胞性遺伝子発現の誘導へと繋がるような一連の持続的な刺激を与える微小環境を構成する。

従来、培養液中へ各種成長因子を添加した後に、CD44、CD133 などのがん幹細胞特異的表面抗原、ABC トランスポーターなどの薬剤排出機構、aldehyde dehydrogenase (ALDH) などの薬剤代謝酵素を利用することで CSC を濃縮・単離してきたが、これらの方法は操作手順が多く、煩雑かつ高コストであった。DN ゲルを使用することで、各種成長因子を培養液中に添加することなく、DN ゲル上でがん細胞を 24 時間培養するだけで CSC を誘導することが可能となった。*In vivo* における腫瘍造成能の検討の結果より、DN ゲル培養膠芽腫細胞のみを移植したマウスでの腫瘍形成は PS ディッシュ培養膠芽腫細胞移植群と大きな差は認められず、粉砕した DN ゲルと共に DN ゲル培養膠芽腫細胞を移植した群において高い腫瘍形成能を示した。この結果は、がん細胞に対する DN ゲルからの持続的な刺激が幹細胞性を誘導し、その性質を維持し続けられるような腫瘍微小環境を模倣したためと考えられた。がん組織内の cancer-associated fibroblast、tumor-associated macrophage などの間質細胞を含めた腫瘍微小環境はがん細胞の悪性化に深く関与していることが明らかとなっており、細胞外基質やサイトカインがこれらの間質細胞から分泌され、CSC に作用することで、生存や細胞増殖にも寄与していることが報告されている[44]。また、当研究室で実施された検討において、細胞から分泌された蛋白質がゲルに吸着され、軟骨細胞への分化を促進することが明らかとなっている (Semba S *et al.* in preparation)。今回の検討により、DN ゲル上で培養した膠芽腫細胞を用いて実施した DNA マイクロアレイの結果より、膠芽腫の幹細胞性に重要な細胞接着分子 OPN や細胞外基質である COL3A1、血管内皮細胞増殖因子 VEGFA などの遺伝子発現の亢進が認められ、さらにイムノブロッティング法により様々なキナーゼのリン酸化の亢進が認められた。これらの結果より、DN ゲルにより誘導された CSC は、DN ゲル自身に蓄積された様々なサイトカインや細胞外基質により微小環境が整った結果、CSC としての能力の維持が可能になったと考えられる。

近年、細胞周囲環境の硬さを感知し、細胞の分化運命を決定する Hippo pathway が大腸癌や乳癌等、様々な癌腫で幹細胞性との関連性を示すことが報告されており、特に中心的な役割を果たす Yes-associated protein (YAP) が新規治療標的分子として着目されている[45,46]。DN ゲル上においても幹細胞性と YAP の関連について検討を実施したが、DN ゲル誘導 CSC では、幹細胞関連遺伝子に対する YAP の積極的な関与は認められなかった (未表示)。細胞周囲の機械的刺激とがんの幹細胞性および悪性度と

の関連性は多数報告され[47]、特に培養基材の硬度とがん幹細胞性に関しては、乳癌等の柔らかい臓器内で形成される腫瘍においては柔らかい基材、骨肉腫等の硬い臓器で形成される腫瘍では硬い基材の上で癌細胞株を培養することによって、特異的にがん幹細胞マーカーである CD44 の発現が上昇することが明らかとなっている[48]。しかし、今回検討に用いた膠芽腫の発生組織である脳の硬さは約 0.2～1 kPa、DN ゲルの硬さは約 300 kPa であり[49,50]、両者の硬度に乖離が生じている。そのため、CSC の誘導にはゲルの硬度自体によるものではなく、細胞表面に発現するメカノセンサーの関与が考えられる。近年、カルシウムイオンチャネルである Piezo1 が細胞膜に存在することが同定され、細胞膜が伸展した状態では Piezo1 の分子構造が開き、カルシウムイオンの細胞への流入が生じ、細胞内でのシグナル伝達等に関与することから、新規メカノセンサーとして注目されている[51,52]。また、カルシウムイオンはマウス ES (embryonic stem) 細胞の自己複製を司るネットワークへ関与することや[53]、膠芽腫においては Cav3.2 と呼ばれるカルシウムイオンチャネルを薬剤によりブロックした結果、Sox2 や神経幹細胞マーカーである Nestin の蛋白発現が低下することから[54]、カルシウムイオンは幹細胞性を維持するための重要な因子であると考えられる。従って、DN ゲル誘導 CSC において、Piezo1 およびカルシウムイオンの関与は今後検討すべき課題であると思われる。

最後に、DN ゲルを治療や診断、特に分子標的治療に応用すべく、DN ゲル誘導 CSC において幹細胞特異的な RTK の発現を通常培養条件である PS ディッシュ培養細胞と比較したところ、DN ゲルは PS ディッシュ培養ではほぼ発現が認められなかった RTK が発現した。このことから、DN ゲルは幹細胞特異的な RTK を選別し得ることが示された。各種 RTK に対する分子標的治療は多くの癌腫において実施されているが、側副経路の亢進による治療抵抗性や幹細胞性の獲得が問題視されている。従来の方法はがん細胞の生存・増殖に関与するドライバー遺伝子を標的に治療を実施するものであり、がん幹細胞特異的に発現あるいは変異を持つ分子を標的とした治療ではない。しかし、今回我々が発見した、DN ゲルを用いた CSC 特異的な RTK の選別を迅速に実施することで、CSC 分画や非 CSC 分画に対しての分子標的治療をコンビネーションで行うことが可能となるため、従来の分子標的治療で問題視されていた側副経路の活性化による治療抵抗性および幹細胞性の獲得を防ぐことができるのではないかと期待される。今回は DN ゲルにより誘導された CSC 特異的に発現する RTK に対する阻害剤を投与後、CSC 分画の増減に関する検討は実施できていないため、今後

はより多くの臨床検体を用いた DN ゲルによる CSC 誘導および幹細胞特異的 RTK の発現の有無を検討し、CSC 特異的な分子標的治療の有効性について探る予定である。

【総括および結論】

本研究において得られた新知見は、以下の通りである。

1) DN ゲル上で腫瘍細胞を培養すると、約 24 時間で CSC が誘導される。
2) DN ゲルからの持続的な刺激が CSC の性質を誘導する。
3) 膠芽腫において、DN ゲル誘導 CSC は様々なキナーゼ活性が 6～48 時間以内に亢進する。
4) 膠芽腫において、DN ゲル上ではソニックヘッジホッグ経路を介した OPN の発現誘導に引き続き、OPN による幹細胞関連遺伝子 *Oct3/4*、*Sox2*、*Nanog* の発現が促進される。
5) DN ゲルにより、CSC 特異的な RTK の発現が誘導される。

以上の知見より、DN ゲルを用いたがん細胞および組織培養を実施することで、迅速かつ簡便に CSC を誘導し、CSC 特異的 RTK を同定した上で、CSC および非 CSC に対する分子標的治療を同時併用し、がん細胞の根絶、再発防止に繋がることが期待される。今後は臨床検体の数を増やし、脳腫瘍のみならず様々な癌腫において、診断・治療法への応用に関する DN ゲルの有用性について検討する予定である。

第 二 章

チロシンキナーゼ阻害剤耐性膠芽腫細胞における
がん幹細胞性獲得と SFRP1 の機能解析

【緒言】

現在、膠芽腫の治療には外科的切除、放射線療法、化学療法が実施されているが、再発が起こり、5 年生存率が約 8%であり予後不良である。そのため、より効果的な新規治療法の開発が望まれている。

近年、膠芽腫において受容体型チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase、RTK）の EGFR、c-Met、PDGFR の遺伝子変異・増幅が報告され(図 12) [55]、これらの RTK に着目した分子標的治療が新規治療法として試みられている。代表的な各種チロシンキナーゼ阻害剤（tyrosine kinase inhibitor、TKI）として、EGFR 阻害剤には Gefitinib、Erlotinib、Cetuximab、c-Met 阻害剤には Crizotinib、PDGFR 阻害剤には Sunitinib 等が主に使用される。阻害薬の投与により一時的な治療効果が認められるものの、EGFR 阻害による c-Met の発現亢進に伴ったがん幹細胞性の獲得 [42]、PDGFR 阻害による側副経路の持続的な活性化 [56] などの問題が生じ、薬剤耐性を獲得することが報告されている。これらのことから、分子標的治療を膠芽腫における新規治療法として適用するためには依然として多くの課題が残されている。また、臨床では受容体型チロシンキナーゼを標的とした分子標的治療を実施した症例は国内外を問わずほとんど存在していないことから、臨床検体を用いた検討は困難であり、研究を遂行する上で適切なモデル細胞を作製することが必要となる。

そこで、本研究ではヒト膠芽腫細胞株に対して低濃度の EGFR、c-Met、PDGFR 阻害剤を長期間投与することで分子標的治療薬耐性細胞を作製した。それらの細胞を用いて、幹細胞性および薬剤耐性獲得に関与する分子メカニズムの解析を実施した。

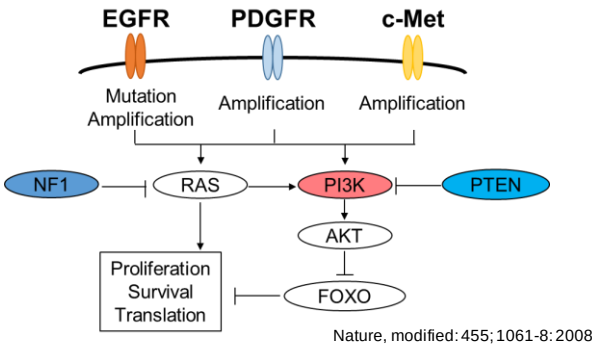

図 12　膠芽腫における受容体型チロシンキナーゼの遺伝子増幅・変異およびシグナル伝達図 (Nature: 455; 1061-8: 2008 より改変)
各種 RTK (EGFR、PDGFR、c-Met) に生じた遺伝子変異や増幅により、PI3K/AKT や RAS などのシグナル伝達が異常亢進し、膠芽腫細胞の増殖、生存に寄与する。

【実験方法】

1）細胞培養

ヒト膠芽腫細胞株 KMG4 を、10%ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100 U/ml ストレプトマイシン、2 mM L-glutamin を添加した DMEM 培地を用い、5% CO_2、37℃のインキュベーター内で培養した。受容体型チロシンキナーゼ阻害剤耐性 KMG4 の樹立には、5 μM Gefitinib (EGFR 阻害剤、Cayman、Michigan、USA) (G5)、1 μM SU11274 (c-Met 阻害剤、Sigma) (M1)、1 μM PDGFR inhibitor V (Merck、Darmstadt、Germany) (P1) を 150 日間継続して投与した。コントロールとして DMSO (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) [(-)] を同期間投与した KMG4 を用いた。

2) DNA メチル化およびヒストンアセチル化に関する検討

KMG4 (-)、G5、M1、P1 細胞に対し、DNA メチル化に関する検討には、DNA メチル化酵素阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC、Sigma) を 4 μM で 72 時間処理を、ヒストンアセチル化に関する検討には、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である Trichostatin A (TSA、Sigma) を 1 μM で 24 時間処理を実施した後に各種検討を実施した。

3) RNA 抽出および遺伝子発現解析

Total RNA 抽出、逆転写反応による cDNA 合成および定量 RT-PCR 法は第 1 章で用いた方法に従って実施した。定量 RT-PCR 法による遺伝子発現解析に使用したプライマーは表 3 に示す。

表 3　定量 RT-PCR 法に用いたプライマーの一覧

Target	Direction	Sequences
GAPDH	Forward	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	Reverse	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
Nanog	Forward	5'-TGCAATGTCTTCTGCTGAGAT-3'
	Reverse	5'-GTTCAGGATGTTGGAGAGTTC-3'
Oct3/4	Forward	5'-CGACCATCTGCCGCTTTGAG-3'
	Reverse	5'-CCCCCTGTCCCCCATTCCTA-3'
SFRP1	Forward	5'-GTGTGTCCTCCCTGTGACAA-3'
	Reverse	5'-ATCCTCAGTGCAAACTCGCT-3'
Sox2	Forward	5'-AGTCTCCAAGCGACGAAAAA-3'
	Reverse	5'-GGAAGTTGGGATCGAACAA-3'

4) DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析は、SurePrint G3 Human GE Microarray 8×60K (Agilent) を使用し、第一章で用いた方法に従って実施した。

5) 細胞分画法

細胞を細胞質分画用に調整した lysis buffer [20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.4)、1.5 mM $MgCl_2$、1 mM dithiothreitol (DTT)、0.1% Triton X-100、20% glycerol、10 mM NaCl、0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4)、protease inhibitor mixture: Complete (EDTA-free) protease inhibitor (Roche)] で溶解後、氷上にて 10 分間静置し、4℃、3,000 rpm、15 分間遠心した上清を細胞質分画として回収した。沈殿物を核分画用に調整した lysis buffer [20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.4)、1.5 mM $MgCl_2$、1 mM dithiothreitol (DTT)、0.1% Triton X-100、20% glycerol、500 mM NaCl、0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4)、protease inhibitor mixture] で溶解後、4℃にて 60 分間回転混和後、4℃、15,000 rpm、15 分間遠心した上清を核分画として回収した。

6) イムノブロッティング法

イムノブロッティング法は第一章で用いた方法に従って実施した。使用した 1 次抗体は以下。anti-Actin (C4) (Millipore); anti-Dvl2 (30D2); anti-phospho-GSK3β (Ser9) (5B3); anti-β-catenin (6B3); anti-phospho-β-catenin (Ser33/37/Thr41); anti-phospho-β-catenin (Thr41/Ser45); anti-phospho-β-catenin (Ser552) (D8E11); anti-phospho-β-catenin (Ser675) (D2F1); anti-Sox2 (D6D9) (Cell Signaling Technologies); anti-GSK3β (BD Transduction Laboratories、Lexington、KY、USA); anti-Lamin A/C (636) (Santa Cruz、Dallas、Texas、USA); anti-HSP90 alpha (ThermoFisher Scientific) 。

7) 蛍光染色法

各細胞をコラーゲン固相化ガラスディッシュ上で 1 日間培養後、細胞を PBS で洗浄し、3% paraformaldehyde/PBS を用いて室温、15 分間固定した。固定後、0.1% Triton X-100 にて室温、4 分反応させ、1% BSA/PBS にて室温、20 分ブロッキングを実施した。その後、一次抗体を 4℃で一晩反応後、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。画像撮影には共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV3000 (Olympus) を用いた。一次抗体は anti-β-catenin (D10A8)、anti-Sox2 (L1D6A2) (Cell Signaling Technologies)、二次抗体は AlexaFluor488 conjugated secondary antibody、AlexaFluor594 conjugated secondary antibody (Invitrogen) を使用した。

8) 脳腫瘍患者の生存解析

SFRP1 の遺伝子発現と脳腫瘍患者の生存期間の関連に関する解析は、公共データベースの REMBRANDT (https://gdoc.georgetown.edu) を用いて実施した。

9) 統計学的解析

群間比較の実施には Student's *t*-test を行なった。$P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

【実験結果】

1) チロシンキナーゼ阻害剤耐性膠芽腫細胞における幹細胞性の獲得

KMG4 細胞に受容体型チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase、RTK）阻害剤（tyrosine kinase inhibitor、TKI）Gefitinib (5 μM、G5)、SU11274 (1 μM、M1)、PDGFR inhibitor V (1 μM、P1）を 150 日間連続投与して樹立した薬剤耐性株の性質を検討した。同期間 DMSO を投与した KMG4 (-) 細胞と比較して、G5、M1、P1 細胞は細胞質が伸展しており、メンブレンのラッフリングが生じていた（図 13 A)。また、全ての薬剤耐性 KMG4 細胞において、幹細胞関連遺伝子 *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* の遺伝子発現および Sox2 の蛋白発現の亢進が認められた（図 13 B、C)。このことより、長期間 TKI に暴露された KMG4 細胞は幹細胞性を獲得することが考えられた。

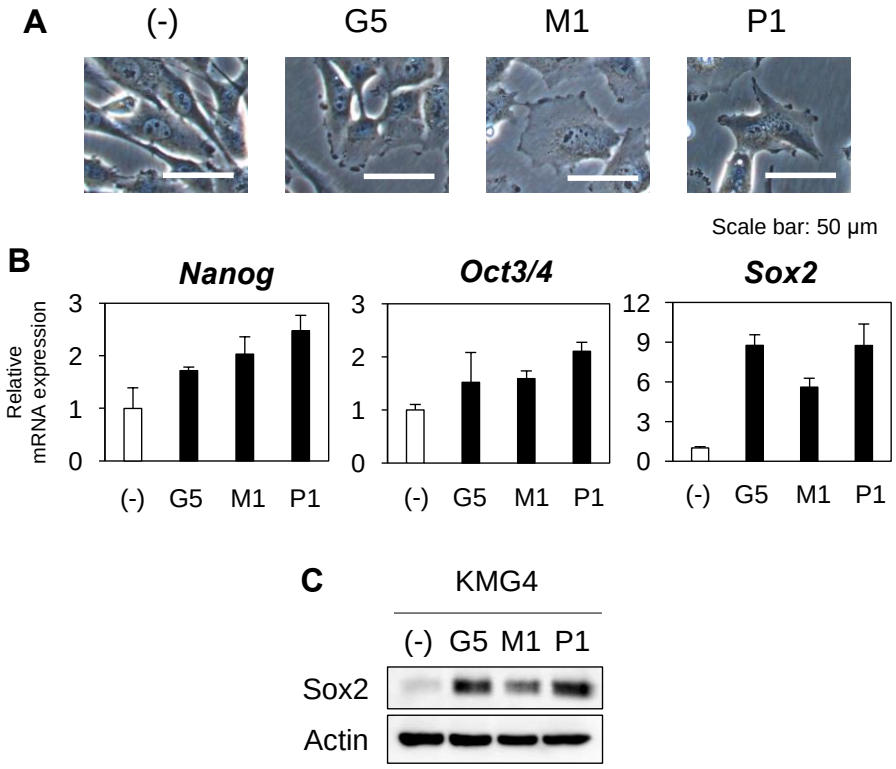

図 13　TKI 耐性 KMG4 細胞における幹細胞性の獲得
ヒト膠芽腫細胞株 KMG4 細胞に対し、5 μM gefitinib (G5)、1 μM SU11274 (M1)、1 μM PDGFR 阻害剤 (P1)、コントロール (-) として DMSO を 150 日間連続投与したときの細胞形態 (A)、定量 RT-PCR 法による幹細胞関連遺伝子 *Oct3/4*、*Sox2*、*Nanog* の遺伝子発現結果 (B)、イムノブロッティング法による Sox2 の蛋白発現結果 (C)。

2) TKI 耐性 KMG4 細胞における SFRP1 の発現低下

TKI 耐性 KMG4 細胞において、遺伝子の発現変動を解析するため、DNA マイクロアレイを実施した。耐性細胞では様々な遺伝子の変動が認められ、発現上昇した遺伝子も多数認められた（Tsuda M *et al.*、in preparation）が、本研究では発現が低下した遺伝子に着目した。ベン図に示したように、KMG4 (-) 細胞と比較して G5、M1、P1 細胞で共通して発現が低下した遺伝子数は 197 (図 14 A)、その中で下位 20 遺伝子を表 4 に示した。この中で、soluble frizzled-related protein 1 (SFRP1) は Wnt シグナル経路のアンタゴニストおよびアポトーシス調節因子として機能する[57,58]。SFRP1 の発現低下や欠失は、乳癌、胃癌、腎細胞癌など様々な腫瘍において報告されている[58,59]。本検討において、*SFRP1* の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法により検証したところ、コントロール細胞と比較して、G5、M1、P1 細胞において発現が著明に低下し、DNA マイクロアレイで得られた結果と一致した（図 14 B)。また、*SFRP1* の遺伝子発現と脳腫瘍患者予後との関連性を Rembrandt により検討した結果、SFRP1 遺伝子の低発現群は高発現群と比較し、有意に予後不良であった（図 14 C）ことから、*SFRP1* の発現低下は脳腫瘍の悪性化において大きな影響を及ぼすことが示唆された。

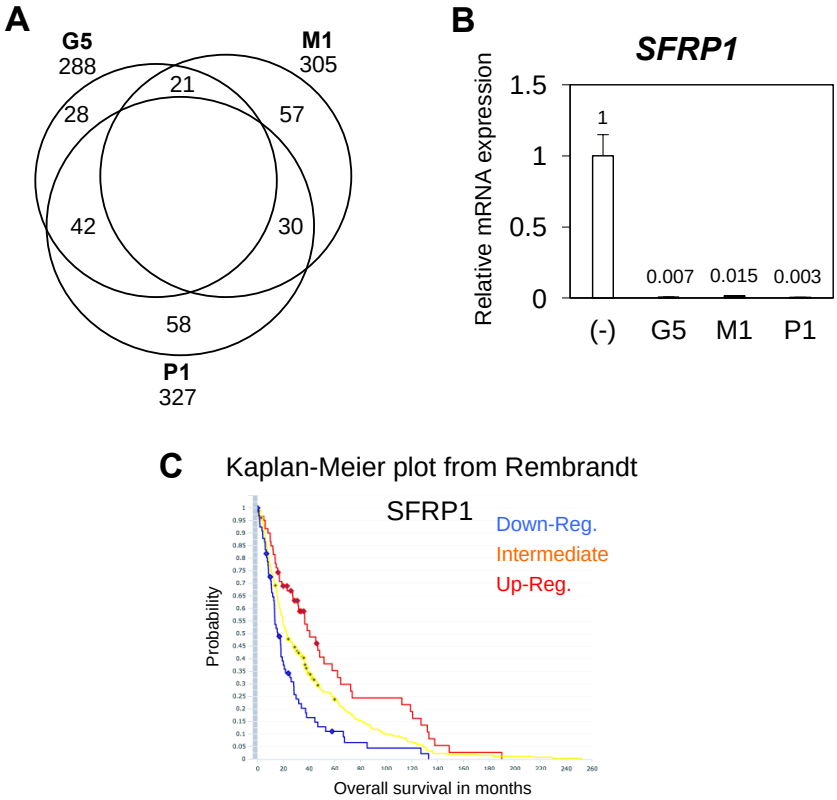

図 14　TKI 耐性 KMG4 細胞における DNA マイクロアレイ解析
KMG4 のコントロール細胞 (-) と比較し、G5、M1、P1 細胞において発現が抑制された遺伝子の中で、Log2 fold < -3 となった遺伝子のベン図 (A)、定量 RT-PCR 法による *SFRP1* の遺伝子発現結果 (B)、*SFRP1* の遺伝子発現と膠芽腫患者の生命予後に関する Kaplan-Meier plot (C)。

表 4　DNA マイクロアレイ解析結果より発現が抑制された下位 20 遺伝子

Gene symbol 1)	G5 2)	M1 3)	P1 4)
NPTX1	-10.02	-10.23	-10.16
EDAR	-7.79	-8.05	-7.94
ZBED2	-7.50	-8.16	-8.14
CHST15	-7.03	-7.90	-7.78
AUTS2	-6.61	-6.46	-6.95
CYP1B1	-6.87	-7.39	-6.51
LOC100129520	-6.57	-7.08	-6.96
RNF165	-6.49	-6.76	-6.65
PTGFRN	-6.34	-6.62	-6.50
SFRP1	-6.21	-5.73	-7.57
DAZL	-5.85	-6.12	-6.01
TSPYL5	-5.84	-5.40	-5.99
TMEM130	-5.71	-5.31	-6.40
FSTL5	-5.59	-5.46	-5.75
HSD17B2	-5.59	-5.76	-5.71
NPPC	-5.54	-6.11	-6.61
COLEC12	-5.37	-5.64	-5.52
XLOC_003319	-5.32	-4.77	-5.47
XLOC_I2_002171	-5.27	-5.11	-4.36
TMEM132B	-5.24	-5.53	-5.40

(Log2 fold change)

1) 遺伝子のシンボル名。2～4) KMG4 (-) 細胞と比較したときの各種 TKI 耐性 KMG4 細胞における遺伝子発現比（対数表示）。[2) G5 細胞、3) M1 細胞、4) P1 細胞]

3) DNA メチル化およびヒストン脱アセチル化による SFRP1 の発現制御

SFRP1 の発現は、プロモーター領域における DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化によって制御されることが報告されている[60,61]。本実験に用いた TKI 耐性 KMG4 細胞においても同様の現象が関与しているのかを検討するため、DNA メチル化酵素阻害剤 5-Aza-dC、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA を用いて *SFRP1* の遺伝子発現の変動を検討した。*SFRP1* 遺伝子の発現は 5-Aza-dC、TSA を併用することによって、未処理の KMG4 (-) 細胞と比較して 60%程度の発現回復を示した（図 15)。これより、TKI 耐性 KMG4 細胞において、*SFRP1* の遺伝子発現はエピジェネティックな変化を介して制御されていることが明らかになった。

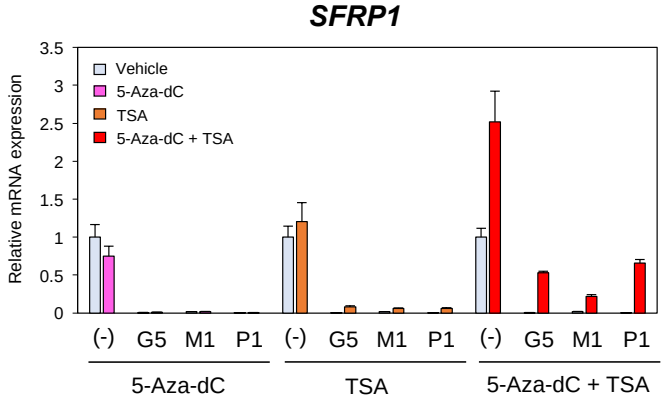

図 15　各種 TKI 耐性 KMG4 細胞における SFRP1 とエピジェネティック阻害剤の関連
DNA メチル化酵素阻害剤 5-Aza-dC を 4 μM、72 時間、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA を 1 μM、24 時間投与後の各種 KMG4 細胞における *SFRP1* の遺伝子発現結果。

4) エピジェネティックな変化を介した Wnt/β-catenin シグナル経路の変化

SFRP1 は Wnt/β-catenin シグナル経路のアンタゴニストであり、7 回膜貫通型受容体である Frizzled (FZD) に SFRP1 が結合もしくは Wnt リガンドの非存在下において、β-catenin は Axin、adenomatous polyposis coli (APC)、glycogen synthase kinase-3β (GSK3β) と複合体を形成し、リン酸化され、分解される。一方、FZD に Wnt リガンドが結合した際には、dishevelled (Dvl) が Axin/APC/GSK3β複合体に結合し、β-catenin のリン酸化および分解を妨げ、β-catenin は核内移行し、標的遺伝子の発現を促進する[62]。その中でも GSK3β はβ-catenin のリン酸化を制御する主要なメディエーターであり[63]、Dvl は Wnt リガンドが FZD に結合する際にβ-catenin のリン酸化を阻害する重要な因子の一つである[64]。そこで、TKI 耐性 KMG4 細胞におけるエピジェネティックな変化を介した Wnt/β-

catenin シグナル伝達の変動を検討した。TKI 耐性 KMG4 細胞において、Dvl2 と GSK3βの蛋白発現および GSK3βのリン酸化は亢進しており、5-Aza-dC、TSA の単独投与または併用によりいずれも低下した（図 16)。また、β-catenin の核内移行について検討を実施したところ、細胞分画法の解析より KMG4 の G5、P1 細胞においてβ-catenin の核内発現が上昇していた（図 17 A)。また、蛍光免疫染色法により、TKI 耐性 KMG4 細胞において部分的にβ-catenin の核内移行が認められた（図 17 B)。更に、DNA マイクロアレイの結果を元に KMG4 (-) と比較したときの TKI 耐性 KMG4 における Wnt リガンドの発現量を検討すると、*WNT1*、*3*、*3A*、*7A* の遺伝子発現が亢進していることが明らかとなった（図 17 C)。これらの Wnt リガンドは、Wnt/β-catenin シグナルにおいてβ-catenin に依存する canonical 経路に関与することが報告されている[65-68]。このことから、TKI 耐性 KMG4 は Wnt/β-catenin シグナル経路、特に canonical 経路を介した制御を受けていることが示唆された。

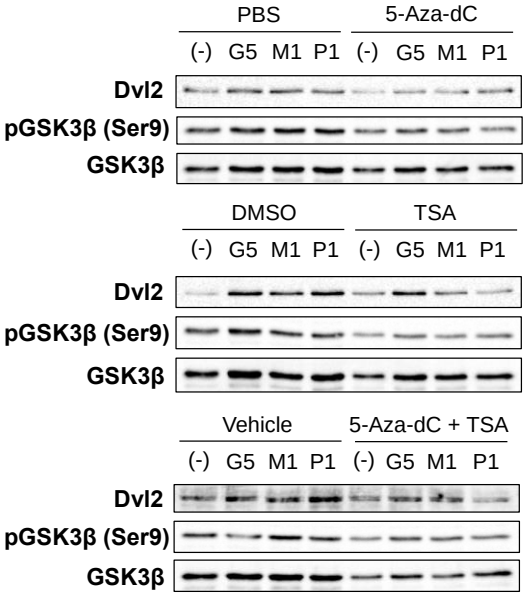

図 16　各種 TKI 耐性 KMG4 細胞におけるエピジェネティックな変化と Dvl2、GSK3βとの関連
DNA メチル化酵素阻害剤 5-Aza-dC を 4 μM、72 時間、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA を 1 μM、24 時間投与後の各種 TKI 耐性 KMG4 細胞における Dvl2、GSK3b の蛋白質およびリン酸化のイムノブロッティング結果。

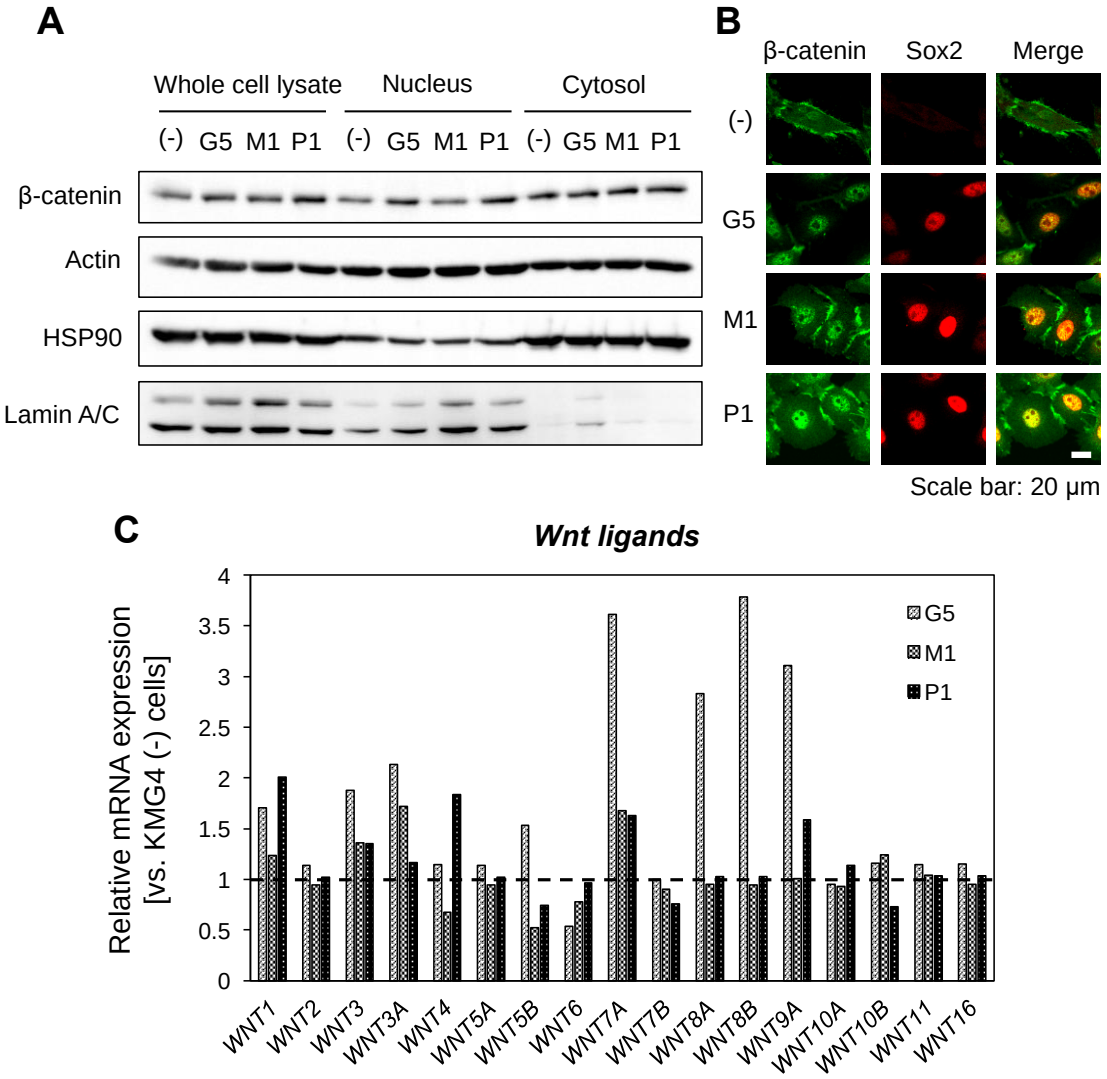

図 17　各種 TKI 耐性 KMG4 細胞におけるβ-catenin の局在および Wnt リガンドの発現量
(A) 核内分画法により、核、細胞質分画を分取後、β-catenin、Actin、HSP90、Lamin A/C をイムノブロッティング法にて検討した。(B) 蛍光免疫染色にてβ-catenin (緑)、Sox2 (赤)を染色した図。Scale bar は 20 μm。(C) KMG4 (-) 細胞を基準としたときの G5、M1、P1 細胞における *Wnt* リガンドの発現結果を DNA マイクロアレイより算出した結果。

5) エピジェネティックな変化を介した幹細胞性遺伝子 Sox2 の発現変動

Wnt/β-catenin シグナルは幹細胞性遺伝子 Sox2 の発現を制御することが報告されている [69]。Sox2 の発現におけるエピジェネティックな制御を検討するため、阻害剤を用いた解析を実施した。TKI 耐性 KMG4 細胞において 5-Aza-dC、TSA を単独投与または併用した場合のいずれにおいても Sox2 の蛋白発現は低下した（図 18)。従って、Sox2 発現は DNA メチル化およびヒストン脱アセチル化によって制御されていることが考えられた。

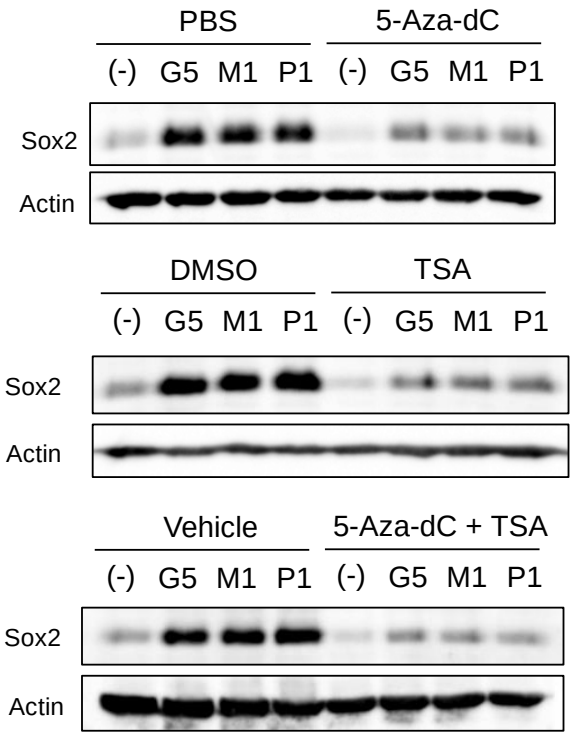

図 18　TKI 耐性 KMG4 細胞における Sox2 の発現とエピジェネティックな制御との関係
DNA メチル化酵素阻害剤 5-Aza-dC を 4 μM、72 時間、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA を 1 μM、24 時間投与後の各種 KMG4 細胞における Sox2 のイムノブロッティング結果。

【考察】

GBM では、RTK を標的とした新規治療法の有効性が期待される。しかしながら、分子標的治療薬への耐性の獲得および幹細胞性の誘導のため、再発が認められることから、分子メカニズムの解明は課題の 1 つである。本検討により、TKI 耐性は DNA メチル化およびヒストン脱アセチル化などのエピジェネティックな制御を介して SFRP1 の遺伝子発現が低下し、Wnt/β-catenin シグナル伝達経路が関与することが明らかとなった。本解析の結果により考察されるシグナル伝達経路を図 19 に示す。

TKI 耐性 KMG4 細胞において、SFRP1 の発現が減少し、Wnt リガンドに対する阻害が欠如したため、β-catenin は核内に移動し、幹細胞関連遺伝子 Sox2 の発現上昇を導いたと考えられる。β-catenin は、乳癌細胞株 MCF7 を用いた免疫沈降法による検討において Sox2 蛋白質と結合し、転写活性を制御することが報告されている [69]。したがって、TKI 耐性 KMG4 細胞においても、β-catenin は MCF7 細胞内と同様の役割を果たすことが示唆される。

5-Aza-dC および TSA を投与した TKI 耐性 KMG4 において、Dvl2 や GSK3βの蛋白発現、および GSK3βのリン酸化が低下したことから、本細胞において、GSK3βのリン酸化量および Dvl2 の発現を負に調節するような遺伝子の発現が亢進していることが考えられる。活性化プロテイン C キナーゼ 1 受容体（receptor for activated protein C kinase 1: RACK1）は、Dvl の分解およびβ-catenin 分解複合体である Axin/APC/GSK3 の安定化によってβ-catenin の分解を誘導することが報告されている [70,71]。従って、RACK1 が TKI 耐性 KMG4 細胞におけるシグナル伝達に影響を及ぼす可能性が考えられる。

5-Aza-dC および TSA を投与した TKI 耐性 KMG4 細胞では、Sox2 の発現が低下した。Sox2 発現調節には 2 つの分子メカニズムが存在すると考えられる。第一に、5-Aza-dC および TSA 投与後に SFRP1 発現が上昇し、細胞外に分泌されることで、Wnt アンタゴニストとして作用し、β-catenin が分解されることで Sox2 の発現が低下することである。第 2 のメカニズムとして、サイクリン依存性キナーゼである $p27^{Kip1}$ の関与が考えられる。胚性幹細胞において、$p27^{Kip1}$ は p130-E2F4-SIN3A と複合体を形成すると *Sox2* 遺伝子のエンハンサー領域に対して抑制的に作用し、細胞分化を誘導することが報告されている [72]。従って、TKI 耐性 KMG4 において Sox2 の発現は $p27^{Kip1}$ によって調節されている可能性も考えられる。

本検討により、がん幹細胞性および TKI に対する抵抗性の獲得は、DNA メチル化およびヒストン脱アセチル化といったエピジェネティックな変化を介して SFRP1 および Wnt/β-catenin シグナル伝達経路によって調節され得ることが示された。これらの結果から、SFRP1 の発現を回復させることにより分子標的治療により獲得した薬剤耐性を無効にし、がん幹細胞を減少させ得る可能性が示唆された。

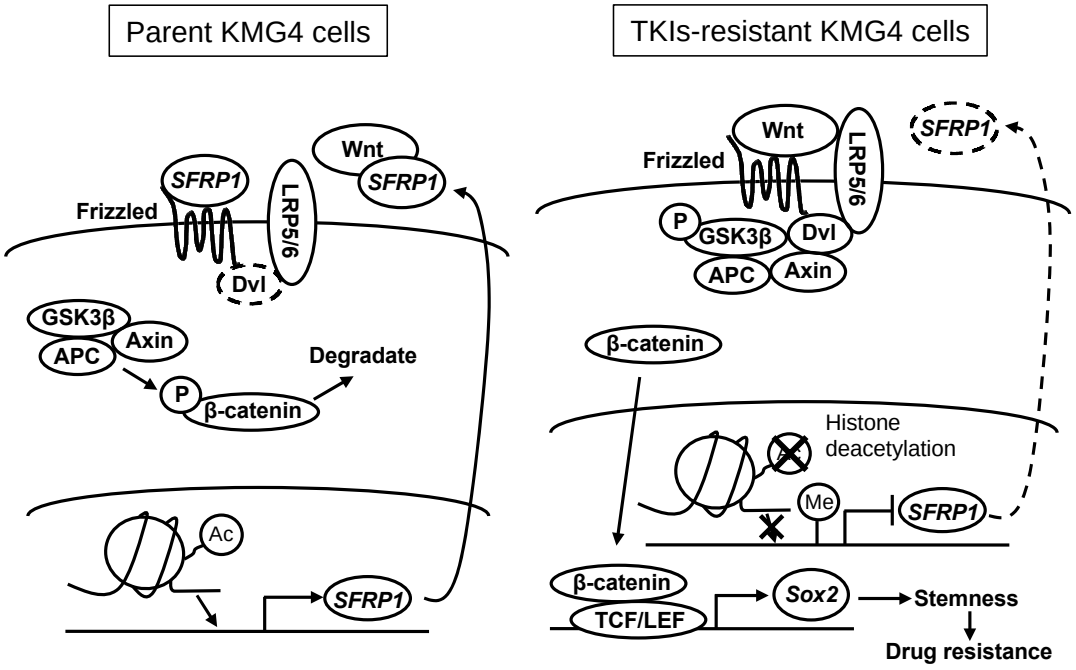

図 19　TKI 耐性 KMG4 細胞における幹細胞性および耐性獲得メカニズム模式図
親株の KMG4 細胞（左図)、TKI 耐性 KMG4 細胞（右図)
(左) 親株の KMG4 細胞では SFRP1 が Wnt リガンドおよび Frizzled 関連蛋白質と結合することにより、Axin/APC/GSK3β複合体を形成し、β-catenin の分解が進行するため、Wnt/β-catenin シグナル伝達経路はオフの状態となる。(右) TKI 耐性 KMG4 細胞では、SFRP1 のプロモーター領域の DNA メチル化やヒストン脱アセチル化により SFRP1 の発現が抑制される。Wnt リガンドが Frizzled 関連蛋白質に結合し、LRP5/6 が Axin/APC/GSK3β複合体をリクルートするため、β-catenin が安定化し、核内へと移行する。核内移行したβ-catenin は Sox2 のプロモーター領域に結合して Sox2 の発現を促し、幹細胞性の獲得に伴った薬剤耐性へと繋がる。

【総括および結論】

本研究において得られた新知見は、以下の通りである。

1) 150 日間 TKI を連続投与した膠芽腫細胞では、幹細胞関連遺伝子の発現が亢進する。
2) TKI 耐性膠芽腫細胞では *SFRP1* の発現量が低下する。
3) TKI 耐性膠芽腫細胞では、Wnt/β-catenin シグナル伝達経路を介した幹細胞性の亢進が認められる。
4) エピジェネティックな変化により、SFRP1、幹細胞性遺伝子の発現および Wnt/β-catenin シグナル伝達経路が制御される。

以上の知見より、各種 RTK を標的とした分子標的治療において、SFRP1 の発現量を確認することは、薬剤に対する抵抗性の獲得を予測する上で重要であると示唆される。一方、今回の検討では SFRP1 の発現の有無による薬剤耐性の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、薬剤耐性が解除されるかを検討する予定である。

【全体の総括および結論】

第一章では DN ゲルを用いた膠芽腫幹細胞の誘導及びメカニズムの解析、第二章では TKI 耐性膠芽腫細胞を用いた幹細胞性獲得機序の検討を行い、以下の新知見が得られた。

1) DN ゲルは CSC を 24 時間以内に誘導することが可能であり、CSC を誘導する重要な分子としてオステオポンチンを同定した。

2) TKI 耐性膠芽腫細胞では幹細胞性の亢進が認められ、その獲得には Sox2 の発現を制御するエピジェネティックな変化と Wnt/β-catenin シグナル伝達経路が関与する。

今後の研究課題として、第一章においては DN ゲルを用いた患者検体からの CSC の誘導および分子標的治療への応用に関する検討を実施すること、第二章においては SFRP1 の発現有無における TKI 耐性膠芽腫細胞のアポトーシス誘導能を検討し、臨床における治療標的となり得るかを評価することが重要であると考えられる。

【謝辞】

本研究の機会を与えて頂きました北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室 田中伸哉教授に深く感謝致します。また、適切な助言と直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室 津田真寿美准教授に心から感謝致します。

最後に、本研究に当たってご指導･ご協力を頂いた、腫瘍病理学教室の全ての皆様に、心よりお礼申し上げます。

【引用文献】

1 厚生労働省. 平成 28 年（2016）人口動態統計（確定数）の概況

2 Nakamura, H., Makino, K., Yano, S., Kuratsu, J.; Kumamoto Brain Tumor Research Group. Epidemiological study of primary intracranial tumors: a regional survey in Kumamoto prefecture in southern Japan--20-year study. *Int. J. Clin. Oncol.* **16**, 314-321 (2011).

3 国立がん研究センター. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」地域がん登録全国推計によるがん罹患データ（1975 年～2013 年）

4 Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro. Oncol.* **19**, v1-v88 (2017).

5 Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A. & Cavenee, W. K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* **21**, 2683-2710 (2007).

6 Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. E. & Westphal, M. Cost of Migration: Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Treatment. *J. Clin. Oncol.* **21**, 1624-1636 (2003).

7 Stupp, R., Mason, W. P., van, den, Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987-996 (2005).

8 Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28 (1976).

9 Yuzawa, S., Nishihara, H., Yamaguchi, S., Mohri, H., Wang, L., Kimura, T., Tsuda, M., Tanino, M., Kobayashi, H., Terasaka, S., Houkin, K., Sato, N. & Tanaka, S. Clinical impact of targeted amplicon sequencing for meningioma as a practical clinical-sequencing system. *Mod. Pathol.* **33**, 63-70 (2016).

10 Snuderl, M., Fazlollahi, L., Le, L. P., Nitta, M., Zhelyazkova, B. H., Davidson,

C. J., Akhavanfard, S., Cahill, D. P., Aldape, K. D., Betensky, R. A., Louis, D. N. & Iafrate, A. J. Mosaic Amplification of Multiple Receptor Tyrosine Kinase Genes in Glioblastoma. *Cancer Cell* **20**, 810-817 (2011).

11 Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B. & Bigner, D. D. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* **360**, 765-773 (2009).

12 Blanc, J. L., Wager, M., Guilhot, J., Kusy, S., Bataille, B., Chantereau, T., Lapierre, F., Larsen, C. J. & Karayan-Tapon, L. Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. *J. Neurooncol.* **68**, 275-283 (2004).

13 Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. & Ellison, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803-820 (2016).

14 Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P. & Ohgaki, H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6002-6007 (2009).

15 Johnson, B. E., Mazor, T., Hong, C., Barnes, M., Aihara, K., McLean, C. Y., Fouse, S. D., Yamamoto, S., Ueda, H., Tatsuno, K., Asthana, S., Jalbert, L. E., Nelson, S. J., Bollen, A. W., Gustafson, W. C., Charron, E., Weiss, W. A., Smirnov, I. V., Song, J. S., Olshen, A. B., Cha, S., Zhao, Y., Moore, R. A., Mungall, A. J., Jones, S. J. M., Hirst, M., Marra, M. A., Saito, N., Aburatani, H., Mukasa, A., Berger, M. S., Chang, S. M., Taylor, B. S. & Costello, J. F. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science* **343**, 189-193 (2014).

16 Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de, Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C. & Stupp, R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 997-1003 (2005).

17 Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730-737 (1997).

18 Jordan, C. T., Guzman, M. & Noble, M. Cancer stem cells. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1253-1261 (2006).

19 Diehn, M., Cho, R. W., Lobo, N. A., Kalisky, T., Dorie, M. J., Kulp, A. N., Qian, D., Lam, J. S., Ailles, L. E., Wong, M., Joshua, B., Kaplan, M. J., Wapnir, I., Dirbas, F. M., Somlo, G., Garberoglio, C., Paz, B., Shen, J., Lau, S. K., Quake, S. R., Brown, J. M., Weissman, I. L. & Clarke, M. F. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* **458**, 780-783 (2009).

20 Sottoriva, A., Verhoeff, J. J., Borovski, T., McWeeney, S. K., Naumov, L., Medema, J. P., Sloot, P. M. & Vermeulen, L. Cancer stem cell tumor model reveals invasive morphology and increased phenotypical heterogeneity. *Cancer Res.* **70**, 46-56 (2010).

21 Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 3983-3988 (2003).

22 O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106-110 (2007).

23 Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D. & Dirks, P. B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).

24 Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L. & Larson, R. A. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2408-2417 (2006).

25 Tong, Z., Solanki, A., Hamilos, A., Levy, O., Wen, K., Yin, X. & Karp, J. M. Application of biomaterials to advance induced pluripotent stem cell research and therapy. *EMBO J.* **34**, 987-1008 (2015).

26 Rijal, G. & Li, W. A versatile 3D tissue matrix scaffold system for tumor modeling and drug screening. *Sci. Adv.* **3**, e1700764 (2017).

27 Mori, S., Kodaira, M., Ito, A., Okazaki, M., Kawaguchi, N., Hamada, Y.,

Takada, Y. & Matsuura, N. Enhanced Expression of Integrin αvβ3 Induced by TGF-β Is Required for the Enhancing Effect of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) in TGF-β-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Mammary Epithelial Cells. *PLoS One* **10**, e0137486 (2015).

28 Tabu, K., Muramatsu, N., Mangani, C., Wu, M., Zhang, R., Kimura, T., Terashima, K., Bizen, N., Kimura, R., Wang, W., Murota, Y., Kokubu, Y., Nobuhisa, I., Kagawa, T., Kitabayashi, I., Bradley, M. & Taga, T. A Synthetic Polymer Scaffold Reveals the Self-Maintenance Strategies of Rat Glioma Stem Cells by Organization of the Advantageous Niche. *Stem Cells* **34**, 1151-1162 (2016).

29 Alison, M. R., Guppy, N. J., Lim, S. M. & Nicholson, L. J. Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *J. Pathol.* **222**, 335-344 (2010).

30 Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Nuchtern, J. G., Jax, T. W., Gobel, U., Goodell, M. A. & Brenner, M. K. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**, 14228-14233 (2004).

31 Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.* **6**, 105-121 (2015).

32 Yang, J. J., Liu, J. F., Kurokawa, T., Kitada, K. & Gong, J. P. Hydrogels as feeder-free scaffolds for long-term self-renewal of mouse induced pluripotent stem cells. *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* **9**, 375-388 (2015).

33 Gong, J. P. Materials science. Materials both tough and soft. *Science* **344**, 161-162 (2014).

34 Goto, K., Kimura, T., Kitamura, N., Semba, S., Ohmiya, Y., Aburatani, S., Matsukura, S., Tsuda, M., Kurokawa, T., Ping, Gong, J., Tanaka, S. & Yasuda, K. Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 Cells, which plays a significant role in the gel-induced chondrogenic differentiation. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **104**, 734-736 (2016).

35 Gong, J. P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T. & Osada, Y. Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv. Mater.* **15**, 1155-1158 (2003).

36 Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A. & Miyawaki, A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat.*

Neurosci. **14**, 1481-1488 (2011).

37 Boccaccio, C. & Comoglio, P. M. The MET oncogene in glioblastoma stem cells: implications as a diagnostic marker and a therapeutic target. *Cancer Res.* **73**, 3193-3199 (2013).

38 Uede, T. Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases. *Pathol. Int.* **61**, 265-280 (2011).

39 Rangaswami, H., Bulbule, A. & Kundu, G. C. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* **16**, 79-87 (2006).

40 Pietras, A., Katz, A. M., Ekström, E. J., Wee, B., Halliday, J. J., Pitter, K. L., Werbeck, J. L., Amankulor, N. M., Huse, J. T. & Holland, E. C. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell* **14**, 357-369 (2014).

41 Kijewska, M., Kocyk, M., Kloss, M., Stepniak, K., Korwek, Z., Polakowska, R., Dabrowski, M., Gieryng, A., Wojtas, B., Ciechomska, IA. & Kaminska, B. The embryonic type of SPP1 transcriptional regulation is re-activated in glioblastoma. *Oncotarget* **8**, 16340-16355. (2017).

42 Jun, H. J., Bronson, R. T. & Charest, A. Inhibition of EGFR induces a c-MET-driven stem cell population in glioblastoma. *Stem Cells* **32**, 338-348 (2014).

43 Song, J., Zhang, J., Wang, J., Wang, J., Guo, X. & Dong, W. β1 integrin mediates colorectal cancer cell proliferation and migration through regulation of the Hedgehog pathway. *Tumour Biol.* **36**, 2013-2021 (2015).

44 Batlle, E. & Clevers, H. Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* **23**, 1124-1134 (2017).

45 Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le, Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N. & Piccolo, S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179-183 (2011).

46 Xia, Y., Chang, T., Wang, Y., Liu, Y., Li, W., Li, M. & Fan, H. Y. YAP Promotes Ovarian Cancer Cell Tumorigenesis and Is Indicative of a Poor Prognosis for Ovarian Cancer Patients. *PLoS One* **9**, e91770 (2014).

47 Lee, H. J., Diaz, M. F., Price, K. M., Ozuna, J. A., Zhang, S., Sevick-Muraca, E. M., Hagan, J. P. & Wenzel, P. L. Fluid shear stress activates YAP1 to promote cancer cell motility. *Nat. Commun.* **8**, 1-14 (2017).

48 Jabbari, E., Sarvestani, S. K., Daneshian, L. & Moeinzadeh, S. Optimum 3D

Matrix Stiffness for Maintenance of Cancer Stem Cells Is Dependent on Tissue Origin of Cancer Cells. *PLoS One* **10**, e0132377 (2015).

49 Vining, K. H. & Mooney, D. J. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 728-742 (2017).

50 Yasuda, K., Kitamura, N., Gong, J. P., Arakaki, K., Kwon, H. J., Onodera, S., Chen, Y. M., Kurokawa, T., Kanaya, F., Ohmiya, Y. & Osada, Y. A novel double-network hydrogel induces spontaneous articular cartilage regeneration in vivo in a large osteochondral defect. *Macromol. Biosci.* **9**, 307-316 (2009).

51 Coste, B., Xiao, B., Santos, J. S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K. S., Kim, S. E., Schmidt, M., Mathur, J., Dubin, A. E., Montal, M. & Patapoutian, A. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* **483**, 176-181 (2012).

52 Piddini, E. Epithelial Homeostasis: A Piezo of the Puzzle. *Curr. Biol.* **27**, R232-R234 (2017).

53 Rodríguez-Gómez, J. A., Levitsky, K. L. & López-Barneo, J. T-type Ca^{2+} channels in mouse embryonic stem cells: modulation during cell cycle and contribution to self-renewal. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C494-504 (2012).

54 Zhang, Y., Cruickshanks, N., Yuan, F., Wang, B., Pahuski, M., Wulfkuhle, J., Gallagher, I., Koeppel, A. F., Hatef, S., Papanicolas, C., Lee, J., Bar, E. E., Schiff, D., Turner, S. D., Petricoin, E. F., Gray, L. S. & Abounader, R. Targetable T-type Calcium Channels Drive Glioblastoma. *Cancer Res.* **77**, 3479-3490 (2017).

55 Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061-1068 (2008).

56 Dong, Y., Jia, L., Wang, X., Tan, X., Xu, J., Deng, Z., Jiang, T., Rainov, N. G., Li, B. & Ren, H. Selective inhibition of PDGFR by imatinib elicits the sustained activation of ERK and downstream receptor signaling in malignant glioma cells. *Int. J. Oncol.* **38**, 555-569 (2011).

57 Melkonyan, H. S., Chang, W. C., Shapiro, J. P., Mahadevappa, M., Fitzpatrick, P. A., Kiefer, M. C., Tomei, L. D. & Umansky, S. R. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 13636-13641 (1997).

58 Saini, S., Majid, S. & Dahiya, R. The complex roles of Wnt antagonists in

RCC. *Nat. Rev. Urol.* **8**, 690-699 (2011).

59 Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J. M., Cisneros, E. & Lopez-Rios, J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.* **121**, 737-746 (2008).

60 Takeshima, H., Wakabayashi, M., Hattori, N., Yamashita, S. & Ushijima, T. Identification of coexistence of DNA methylation and H3K27me3 specifically in cancer cells as a promising target for epigenetic therapy. *Carcinogenesis* **36**, 192-201 (2015).

61 Delic, S., Lottmann, N., Stelzl, A., Liesenberg, F., Wolter, M., Götze, S., Zapatka, M., Shiio, Y., Sabel, M. C., Felsberg, J., Reifenberger, G. & Riemenschneider, M. J. MiR-328 promotes glioma cell invasion via SFRP1-dependent Wnt-signaling activation. *Neuro. Oncol.* **16**, 179-190 (2014).

62 Anastas, J. N. & Moon, R. T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 11-26 (2013).

63 Wu, D. & Pan, W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 161-168 (2010).

64 Gao, C. & Chen, Y. G. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell. Signal.* **22**, 717-727 (2010).

65 Staal, F. J., Meeldijk, J., Moerer, P., Jay, P., van de Weerdt, B. C., Vainio, S., Nolan, G. P. & Clevers, H. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur. J. Immunol.* **31**, 285-293 (2001).

66 Staal, F. J., Luis, T. C. & Tiemessen, M. M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 581-593 (2008).

67 Kim, J. G., Kim, M. J., Choi, W. J., Moon, M. Y., Kim, H. J., Lee, J. Y., Kim, J., Kim, S. C., Kang, S. G., Seo, G. Y., Kim, P. H. & Park, J. B. Wnt3A Induces GSK-3beta Phosphorylation and beta-Catenin Accumulation Through RhoA/ROCK. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1104-1113 (2017).

68 Posokhova, E., Shukla, A., Seaman, S., Volate, S., Hilton, M. B., Wu, B., Morris, H., Swing, D. A., Zhou, M., Zudaire, E., Rubin, J. S. & St Croix, B. GPR124 functions as a WNT7-specific coactivator of canonical beta-catenin signaling. *Cell Rep.* **10**, 123-130 (2015).

69 Ye, X., Wu, F., Wu, C., Wang, P., Jung, K., Gopal, K., Ma, Y., Li, L. & Lai, R. ß-Catenin, a Sox2 binding partner, regulates the DNA binding and transcriptional activity of Sox2 in breast cancer cells. *Cell. Signal.* **26**, 492-

501 (2014).

70 Deng, Y. Z., Yao, F., Li, J. J., Mao, Z. F., Hu, P. T., Long, L. Y., Li, G., Ji, X. D., Shi, S., Guan, D. X., Feng, Y. Y., Cui, L., Li, D. S., Liu, Y., Du, X., Guo, M. Z., Xu, L. Y., Li, E. M., Wang, H. Y. & Xie, D. RACK1 suppresses gastric tumorigenesis by stabilizing the β-catenin destruction complex. *Gastroenterology* **142**, 812-823.e815 (2012).

71 Cheng, M., Xue, H., Cao, W., Li, W., Chen, H., Liu, B., Ma, B., Yan, X. & Chen, Y. G. Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) Promotes Dishevelled Protein Degradation via Autophagy and Antagonizes Wnt Signaling. *J. Biol. Chem.* **291**, 12871-12879 (2016).

72 Li, H., Collado, M., Villasante, A., Matheu, A., Lynch, C. J., Cañamero, M., Rizzoti, K., Carneiro, C., Martínez, G., Vidal, A., Lovell-Badge, R. & Serrano, M. p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* **11**, 845-852 (2012).