

Title	リボソーム合成阻害(核小体ストレス)を介した神経膠腫の新たな治療標的分子の開発
Sub Title	Development of a new molecular target for glioma mediated ribosome synthesis inhibition (nucleolar stress)
Author	三輪, 点(Miwa, Tomoru)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>各種神経膠腫細胞株・神経膠腫患者組織・脳腫瘍幹細胞株・他の癌腫細胞株におけるEFTUD1の発現解析を行った結果gliomaにおいてEFTUD1の発現がみられる一方で、正常脳組織では発現は見られなかった。機能解析ではEFTUD1を特異的にknock downすることでglioma celllineの増殖が有意差をもって抑制され、G1 arrestをおこしていることが明らかになった。最終的にEFTUD1は脳においてグリオーマ特異的に発現し、そのknock downにより腫瘍増殖抑制効果がみられ、治療標的分子の候補になりうる事が推測された。EFTUD1 expression in glioma cell lines and tissue was higher than in normal brain tissue. Downregulating EFTUD1 induced G1 cell-cycle arrest and apoptosis, leading to reduced glioma cell proliferation. The mechanism underlying this antitumor effect was impaired ribosome biogenesis via EFTUD1 inhibition. Additionally, protective autophagy was induced by glioma cells as an adaptive response to EFTUD1 inhibition. The antitumor effect induced by the combined treatment was significantly higher than that of either EFTUD1 inhibition or CQ alone. These results suggest that EFTUD1 represents a novel therapeutic target and that the combination of EFTUD1 inhibition with autophagy blockade may be effective in the treatment of gliomas.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究(B) 研究期間：2014～2015 課題番号：26861164 研究分野：脳神経外科</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26861164seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 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：26861164

研究課題名(和文) リボソーム合成阻害(核小体ストレス)を介した神経膠腫の新たな治療標的分子の開発

研究課題名(英文) Development of a new molecular target for glioma mediated ribosome synthesis inhibition (nucleolar stress)

研究代表者

三輪 点 (MIWA, TOMORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20365282

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)：各種神経膠腫細胞株・神経膠腫患者組織・脳腫瘍幹細胞株・他の癌腫細胞株におけるEFTUD1の発現解析を行った結果gliomaにおいてEFTUD1の発現がみられる一方で、正常脳組織では発現は見られなかった。機能解析ではEFTUD1を特異的にknock downすることでglioma cell lineの増殖が有意差をもって抑制され、G1 arrestをおこなっていることが明らかになった。最終的にEFTUD1は脳においてグリオーマ特異的に発現し、そのknock downにより腫瘍増殖抑制効果がみられ、治療標的分子の候補になりうるということが推測された。

研究成果の概要(英文)：EFTUD1 expression in glioma cell lines and tissue was higher than in normal brain tissue. Downregulating EFTUD1 induced G1 cell-cycle arrest and apoptosis, leading to reduced glioma cell proliferation. The mechanism underlying this antitumor effect was impaired ribosome biogenesis via EFTUD1 inhibition. Additionally, protective autophagy was induced by glioma cells as an adaptive response to EFTUD1 inhibition. The antitumor effect induced by the combined treatment was significantly higher than that of either EFTUD1 inhibition or CQ alone. These results suggest that EFTUD1 represents a novel therapeutic target and that the combination of EFTUD1 inhibition with autophagy blockade may be effective in the treatment of gliomas.

研究分野：脳神経外科

キーワード：EFTUD1 glioma ribosome

1. 研究開始当初の背景

原発脳腫瘍で最多を占める神経膠腫は手術、化学療法、放射線治療といった集学的治療が行われてもその生命予後は約 18 ヶ月程度と最悪である。悪性神経膠腫は非常に浸潤性なため全摘出はほとんど不可能であり非外科的治療に頼らざるを得ない状況である。この新たな治療法の開発に対して、我々は SEREX 法という免疫学的手法により神経膠腫特異的抗原 EFTUD1 の同定に成功した。SEREX 法はメラノーマ・リンパ腫・食道癌などの癌抗原の同定にも用いられているという実績がある¹⁾。単離された抗原分子 EFTUD1 に関して神経膠腫患者血清、他の癌患者血清、健常人血清との免疫反応を解析し、神経膠腫・腎細胞癌・メラノーマ患者に反応する一方で、健常人血清には全く反応がみられなかった。さらに興味深いことに EFTUD1 は他施設の研究でも、乳癌やメラノーマ患者血清で強い免疫応答を起しているという報告が出ており免疫治療の標的分子として強く期待される²⁾³⁾。また EFTUD1 はリボソーム合成に必須の分子であることがわかっている。あらゆる癌腫でリボソーム合成が活発に行われていることがわかっており増殖・浸潤・薬剤耐性といった腫瘍の Biology に強く関わっている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。リボソーム合成阻害を標的にする薬剤の開発も実際に行われており核小体ストレスを介した機序が推測されている⁷⁾⁸⁾。しかし、リボソーム合成因子の中で EFTUD1 を治療標的にした報告はいまだない。EFTUD1 は腫瘍の Biology に強く関わる分子であり、新たな薬物治療の標的分子としても強く期待される。

我々のこれまでの実験では EFTUD1 は複数の正常脳組織では非常にわずかな発現しかない一方で、6 種の神経膠腫細胞株と 10 人の神経膠腫組織において高発現していることを確認しており、Bioinformatics を応用した複数のデータベース解析 (OncoPrint, REMBRANDT, PrognoScan) でもその裏づけはなされている。また EFTUD1 の knockdown assay を確立し、EFTUD1 阻害下でリボソーム合成阻害が起きていることは確認されている。実際に EFTUD1 阻害下で 5 種の神経膠腫細胞株において p53 非依存性の増殖抑制効果を認めた。p53 変異の多い神経膠腫において、その有効性は非常に期待されるものである。

一方、近年の幹細胞研究の進展にともなって悪性神経膠腫を含めた様々な悪性腫瘍に癌幹細胞が存在することが明らかとなっている⁹⁾。癌幹細胞は腫瘍形成・増殖・再発の要因になっていると考えられるようになり、悪性神経膠腫治療の新たな治療ターゲットとしても重視されている。我々は神経膠腫患者の検体から脳腫瘍幹細胞株を樹立し、脳腫瘍幹細胞抗原の同定とそれを標的とした治

療の研究も行なってきた¹⁰⁾。EFTUD1 が脳腫瘍幹細胞に対しても共通した治療標的であるかどうかを検討する。

2. 研究の目的

(1) 新規抗原分子 EFTUD1 の発現解析
すでにこれまでの実験で複数の神経膠腫細胞株と患者検体において正常脳組織に比べて高い発現を示すデータが得られている。本分子の発現解析をさらに多くの患者に対して行い再現性を確認するとともに WHO 分類に応じた悪性度との相関性を評価する。また他臓器の正常組織、他の癌腫、我々が樹立した脳腫瘍幹細胞株での発現解析を行い、治療標的分子としての適性や治療適応となる癌種に関して評価する。

(2) 新規抗原分子 EFTUD1 の機能解析
我々のこれまでの研究では、EFTUD1 阻害下で各種の神経膠腫細胞株において p53 非依存性の増殖抑制効果をもたらすという結果を得ている。今後は抗腫瘍効果をもたらすメカニズムの解明として細胞周期に与える影響や細胞死誘導の有無を解析する。また EFTUD1 はリボソーム合成に関わる分子であり、EFTUD1 阻害下ではリボソーム合成が障害されることをこれまでの実験ですでに確認している。一般的に細胞内においてリボソーム合成が障害されると核小体ストレスが起りアポトーシスが誘導されることが報告されている¹¹⁾。EFTUD1 阻害による抗腫瘍効果の 1 つとして核小体ストレスの関与を解析する。

PTEN 変異の多い神経膠腫において PI3K/Akt/mTOR のシグナル経路が異常に活性化されており、ラパマイシン (mTOR 阻害剤) に一定の制癌作用があることが証明されている¹²⁾。EFTUD1 は mTOR シグナルの下流に位置するため、EFTUD1 阻害が PI3K/Akt/mTOR のシグナル伝達に与える影響を解析し、ラパマイシン抵抗性を示す神経膠腫にも本分子標的治療が有効である可能性を模索する。また近年、mTOR 阻害に対する適応反応 (Adaptive response) として癌細胞が Autophagy を誘導している (Cytoprotective Autophagy) という報告が多く、Autophagy を modulate することで抗腫瘍効果を増幅させる治療戦略に注目が集まっている¹³⁾。EFTUD1 阻害下においても Autophagy の誘導が理論上強く予想される。本研究においても EFTUD1 阻害下での Autophagy 誘導の有無およびその役割を解析することは EFTUD1 分子標的治療の効果を最大限発揮させる上で非常に有効な治療戦略につながる。また Autophagy は脳腫瘍幹細胞の増殖・浸潤にも関与しているという報告もある¹⁴⁾。EFTUD1 阻害が脳腫瘍幹細胞細胞株に与える影響を評価する。

最終的に *in vivo* において、EFTUD1 を knock down した神経膠腫細胞株を免疫不全マウス脳内に移植し腫瘍形成能の変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) 新規腫瘍抗原 EFTUD1 の発現解析
我々はこれまでの研究の中で EFTUD1 の抗体

を自ら作成済みである。この抗体を使用し、各種神経膠腫細胞株・神経膠腫患者組織・脳腫瘍幹細胞株・他の癌腫細胞株における EFTUD1 の発現解析を Western blot によって行う。また SYBR green を用いた quantitative PCR でも発現解析を行うことで定量的な評価も可能になり、Western Blot の結果の再現性を検討できる。

一方、細胞レベル・腫瘍切片レベルでの発現パターンを解析することも重要である。作成抗体を用いて神経膠腫細胞株の細胞染色を行うことで細胞内局在性を確認し、神経膠腫患者組織切片を作成抗体による免疫組織学的な解析を行う。EFTUD1 が腫瘍組織・正常脳組織で各々どのように発現しているかを明らかにし、また EFTUD1 発現強度と WHO grade との相関性を評価する。

(2) EFTUD1 の機能解析

siRNA による EFTUD1 阻害下における細胞周期を FACS で解析する。同じく EFTUD1 阻害下において細胞周期関連蛋白である p53-p21 や、mTOR 系シグナルに関しては AKT/p-AKT/mTOR の発現を Western blot で評価する^{13),15)}。アポトーシス誘導能に関しては Caspase 3/7 activity を測定することで評価する。EFTUD1 阻害下での Autophagy 誘導の有無の証明には Autophagy marker (LC3/p62) の発現を Western blot で調べることで評価する¹⁶⁾。

(3) EFTUD1 の機能解析

EFTUD1 阻害下での神経膠腫細胞株に対してさらに Autophagy 阻害剤投与し細胞株の増殖能を評価する。EFTUD1 阻害による増殖抑制効果が Autophagy 阻害剤により増幅された場合は神経膠腫が誘導する Autophagy は cytoprotective であることを示唆し、EFTUD1 阻害 + Autophagy 阻害が有効な治療戦略として挙げられる^{17),18),19),20)}。またこの両阻害下での細胞周期解析やアポトーシス誘導能を調べ、抗腫瘍効果の増幅変化を評価する。

(4) 担癌(神経膠腫)マウスモデルにおける EFTUD1 阻害がもたらす抗腫瘍効果の評価

我々は将来的に EFTUD1 をターゲットとした脳腫瘍に対する新たな分子標的治療の開発を目指しており、*in vivo* での抗腫瘍効果を検討することが不可欠である。

in vitro 実験によって EFTUD1 が癌細胞の増殖に関与していることは明らかであり、続いて担癌(神経膠腫)マウスモデルにおいて RNAi を用いた EFTUD1 阻害による治療を試みる。

RNAi を用いて EFTUD1 が knock down された神経膠腫細胞株を調整し、この細胞株を Stereotactic に免疫不全マウス脳に移植する。一定期間後に担癌マウスから脳を摘出し凍結切片を作成する。この検体を用いた免疫組織学的解析により EFTUD1 の発現、脳腫瘍増殖能・浸潤能への影響、正常脳組織への障害性について検討する。

また *in vitro* で評価した EFTUD1 阻害 +

Autophagy 阻害に関しても *in vivo* において再現されるかを評価する²⁰⁾。

<引用文献>

Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT: Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* 2002;188:22-32

Hamrita B, Nasr HB, Hammann P, Kuhn L, Guillier CL, Chaieb A, Khairi H, Chahed K: An elongation factor-like protein (EF-Tu) elicits a humoral response in infiltrating ductal breast carcinomas: an immunoproteomics investigation. *Clin Biochem.* 2011;44(13):1097-104

M. Forger, U. Trefzer, W. Sterry and P. Walden, Proteome serological determination of tumor-associated antigens in melanoma. *PLoS One.* 2009;4(4):5199-5205.

Belin S, Beghin A, Solano-Gonzalez E, et al. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS one.* 2009;4(9):e7147.

Lai MD, Xu J. Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Current genomics.* 2007;8(1):43-49.

Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nature reviews. Cancer.* 2003;3(3):179-192.

Drygin D, Lin A, Bliesath J, et al. Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer research.* 2011;71(4):1418-1430.

Li J, Yu L, Zhang H, et al. Down-regulation of p53 inhibits proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cancer science.* 2009;100(12):2255-2260.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-8.

Fukaya R, Ohta S, Yamaguchi M, Fujii H, Kawakami Y, Kawase T, Toda M : Isolation of cancer stem-like cells from a side population of a human glioblastoma cell line, SK-MG-1. *Cancer Lett.* 2010;291(2):150-7.

Morgado-Palacin L, Llanos S, Serrano M : Ribosomal stress induces L11- and

p53-dependent apoptosis in mouse pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 2012;11:503-510

Cloughesy TF, Yoshimoto K, Nghiemphu P, et al. Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS medicine*. 2008;5(1):e8.

Loeber CR, Strissel PL, Ditttrich R, et al. Akt and p53 are potential mediators of reduced mammary tumor growth by cloroquine and the mTOR inhibitor RAD001. *Biochem Pharmacol*. 2012;83:480-488.

Galavotti S, Bartesaghi S, Faccenda D, et al. The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene*. 2012;32(6):699-712.

Lin JF, Tsai TF, Liao PC, et al. : Benzyl isothiocyanate induces protective autophagy in human prostate cancer cells via inhibition of mTOR signaling. *Carcinogenesis* 2013;34(2):406-14

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al.: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012;8(4):445-544

Corcelle EA, Puustinen P, Jaattela M: Apoptosis and autophagy: Targeting autophagy signaling in cancer cells- 'trick or treats'? *FEBS J*. 2009;276(21):6084-96

Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S: The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005 ;5(9):726-34

Boya P, González-Polo RA, Casares N, et al.: Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(3):1025-40

Hu YL, DeLay M, Jahangiri A, et al.: Hypoxia-Induced Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Adaptation to Antiangiogenic Treatment in Glioblastoma *Cancer Res*. 2012;72:1773-1783

4. 研究成果

(1) 新規腫瘍抗原 EFTUD1 の発現解析

これまでの研究の中で自ら作成済みである EFTUD1 の抗体を使用し、各種神経膠腫細胞株・神経膠腫患者組織・脳腫瘍幹細胞株・他の癌腫細胞株における EFTUD1 の発現解析を Western blot によって行った。2 つの glioma cell line から cDNA library を作製し、10

人のグリオーマ患者血清中の IgG と反応させた。反応した抗原のうちグリオーマ患者にだけ特異的に発現している抗原遺伝子として EFTUD1 が得られた。また SYBR green を用いた quantitative PCR でも発現解析を行うことで定量的な評価を行った。その結果定量 PCR・Western blot では glioma cell line 及び human glioma tissue において EFTUD1 の発現がみられる一方で、normal brain tissue では発現は見られなかった。

(2) 新規腫瘍抗原 EFTUD1 の機能解析

siRNA による EFTUD1 阻害下における細胞周期を FACS で解析し、同じく EFTUD1 阻害下において細胞周期関連蛋白である p53-p21 や、mTOR 系シグナルに関しては AKT/p-AKT/mTOR の発現を Western blot で評価した。アポトーシス誘導能に関しては Caspase 3/7 activity を測定することで評価した。EFTUD1 阻害下での Autophagy 誘導の有無の証明には Autophagy marker (LC3/p62) の発現を Western blot で調べることで評価を行った。EFTUD1 阻害下での神経膠腫細胞株に対してさらに Autophagy 阻害剤投与し細胞株の増殖能を評価した。その結果 Cell titer glo assay では EFTUD1 を特異的に knock down することで glioma cell line の増殖が有意差をもって抑制され、細胞周期解析では G1 arrest をおこなっていることが明らかになった。最終的に EFTUD1 は脳においてグリオーマ特異的に発現し、その knock down により腫瘍増殖抑制効果がみられ、治療標的分子の候補としてなりうる事が推測された。

新規抗原分子 EFTUD1 と神経膠腫との関係を論じた報告はこれまでになく、神経膠腫の分子標的治療のターゲットとして独創的である。本分子は癌の増殖を中心に腫瘍の Biology に強く関与しており、我々の研究結果は神経膠腫のみならず、他の癌腫治療への波及効果も大きいと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tamura R, Miwa T, Shimizu K, Mizutani K, Tomita H, Yamane N, Tominaga T, Sasaki S. Giant Cell Tumor of the Skull: Review of the Literature. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*. 2016;77:239-46. doi:10.1055/s-0035-1554808. 査読あり

Hayashi S, Sasaki H, Kimura T, Abe T, Nakamura T, Kitamura Y, Miwa T, Kameyama K, Hirose Y, Yoshida K. Molecular-genetic and clinical characteristics of gliomas with astrocytic appearance and total 1p19q loss in a single institutional consecutive cohort. *Oncotarget*. 2015 30;6:15871-81.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25991674> 査読あり

Miwa T, Hayashi N, Endo S, Ohira T. Neuroendoscopic biopsy and the treatment of tumor-associated hydrocephalus of the ventricular and paraventricular region in pediatric patients: a nationwide study in Japan. Neurosurg Rev. 2015 Oct;38:693-704. doi: 10.1007/s10143-015-0629-z. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

三輪点 坂本好昭 大平貴之 貴志和生 吉田一成. 線維性骨異形成症手術例の検討. 日本脳神経外科学会第74会学術総会. 2015.10.16 ロイトン札幌(北海道札幌市)

Miwa T, Ohira T, Toda M, Yoshida K. Treatment strategy of the intracranial secondly cystic lesions. 15th Interim Meeting of the World Federation of Neurosurgical Societies. 2015.9.11 Rome(Italy)

三輪点 坂本好昭 田村亮太 河野まや 貴志和生 吉田一成. 小児 fibrous dysplasia 手術例の検討. 第43回日本小児神経外科学会. 2015.6.12 海峡メッセ(山口県下関市)

Miwa T, Sasaki H, Yoshida K. Characteristics of fetal brain tumors with genetic analysis. 日韓4大学 Joint conference. 2014.7.5 Jeju Island (Korea)

Miwa T, Nonaka Y, Oi S, Sasaki H, Yoshida K. Surgical indication and the natural course of intracranial infantile myofibromatosis. 16th International Symposium of Pediatric Neuro Oncology. 2014.6.28 Singapore (Singapore)

〔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:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三輪点 (MIWA, Tomoru)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 20365282