

Title	脳腫瘍における不均一性獲得機序の解明と特異的治療法の開発
Sub Title	Mechanism analysis of acquisition of heterogeneity in brain tumors and development of specific therapies
Author	前田, 祐介(Maeda, Yūsuke)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>脳腫瘍マウスモデルであるMADMマウスを用いた解析で、脳腫瘍及び腫瘍幹細胞において EGFR の発現上昇を認めるサブタイプは膠芽腫の classical type、PDGFRα の発現上昇を認めるサブタイプは膠芽腫の proneural type に近似されることが分かった。また、EGFR の発現が上昇しているサブタイプにはEGFR阻害薬による各種増殖因子阻害が有用であり、PDGFRα の発現が上昇しているサブタイプには caltriol によるプリン体合成阻害による細胞増殖抑制が有用であることが分かった。</p> <p>Using MADM mice, a mouse model of brain tumor, we found that the subtype with elevated EGFR expression in brain tumors and tumor stem cells approximates the classical type of glioblastoma, while the subtype with elevated PDGFRα expression approximates the proneural type of glioblastoma.</p> <p>Inhibition of various growth factors by EGFR inhibitors is useful for the subtype with elevated EGFR expression, and inhibition of cell proliferation by inhibiting purine synthesis with caltriol is useful for the subtype with elevated PDGFRα expression.</p>
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2019～2020 課題番号：19K18404 研究分野：腫瘍生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K18404seika

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.

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18404

研究課題名（和文）脳腫瘍における不均一性獲得機序の解明と特異的治療法の開発

研究課題名（英文）Mechanism analysis of acquisition of heterogeneity in brain tumors and development of specific therapies.

研究代表者

前田 祐介（MAEDA, Yusuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：20793871

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳腫瘍マウスモデルであるMADMマウスを用いた解析で、脳腫瘍及び腫瘍幹細胞においてEGFRの発現上昇を認めるサブタイプは膠芽腫のclassical type、PDGFRの発現上昇を認めるサブタイプは膠芽腫のproneural typeに近似されることが分かった。また、EGFRの発現が上昇しているサブタイプにはEGFR阻害薬による各種増殖因子阻害が有用であり、PDGFRの発現が上昇しているサブタイプにはcalciolによるプリン体合成阻害による細胞増殖抑制が有用であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は非常に高い不均一性と可塑性を有しており、それらが膠芽腫の治療抵抗性の一因と考えられている。近年、膠芽腫のサブタイプ解析が進められ、サブタイプ毎の異なる分子生物学的な特性を標的とした新たな治療法の開発に注目が集まっている。本研究結果より、EGFR発現主体のclassical typeの膠芽腫にはEGFR阻害薬を用い、PDGFR発現主体のproneural typeにはcalciol（もしくはプリン体合成阻害薬）を用いるといった臨床応用への可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using MADM mice, a mouse model of brain tumor, we found that the subtype with elevated EGFR expression in brain tumors and tumor stem cells approximates the classical type of glioblastoma, while the subtype with elevated PDGFR expression approximates the proneural type of glioblastoma. Inhibition of various growth factors by EGFR inhibitors is useful for the subtype with elevated EGFR expression, and inhibition of cell proliferation by inhibiting purine synthesis with calciol is useful for the subtype with elevated PDGFR expression.

研究分野：腫瘍生物学

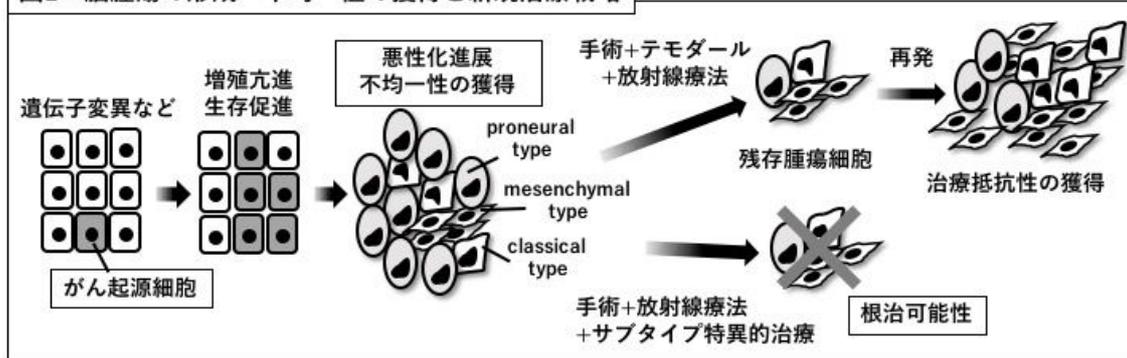
キーワード：脳腫瘍 膠芽腫 不均一性 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫(グリオブラストーマ:GBM)はヒトの悪性腫瘍の中でも最も予後不良なガンの1つである。現在、外科手術、放射線治療とテモダール(抗がん剤)を組み合わせた集学的治療を標準治療として治療が行われているが、それら標準治療の治療成績は悪く、平均生存期間は約15ヶ月程度である。また、既存の標準治療を上回る新規の治療法が開発できていないため、過去30年以上に渡って治療成績の劇的な向上は認められていない。そのため、膠芽腫に対する新たな治療法の開発へ向けた研究の進展が喫緊の課題である。

成熟したがん組織は遺伝学的に均一な集団ではなく、様々な遺伝子変異を持った多種多様ながん細胞から構成されている不均一な細胞集団である。GBMも非常に高い不均一性を有しており、このような不均一性がGBMの治療抵抗性の一因と考えられている。近年、遺伝子発現プロファイル解析の結果により、GBMは4つのサブタイプ(proneural, mesenchymal, classical, neural)に分類されることが明らかになり[Verhaak et al., Cancer cell, 2010]、GBMの不均一性獲得の解明や個別化・細分化された治療法の開発に進展する可能性が示唆された(図1)。つまり、GBMの悪性化進展の過程でそれぞれのサブタイプが生じるメカニズムを解明し、それらサブタイプ毎に適切な治療法を開発することで、GBMに対する新たな治療戦略になり得るのではないかと考えられる(図1)。

図1: 脳腫瘍の形成・不均一性の獲得と新規治療戦略



2. 研究の目的

GBM自然発生マウスモデル(MADMマウス)では、Cre/loxPによる染色体組み換えを用いて、脳発生初期の神経幹細胞において散発的に *p53* 及び *NF1* 遺伝子の欠失を誘導し、また、蛍光タンパク質との組み合わせによって *p53/NF1* double knockout 細胞のみが GFP 陽性となるように設計されている。そのため、GFP 陽性をマーカーとして、脳腫瘍内で *p53/NF1* double knockout の脳腫瘍細胞のみを可視化し選択することが可能である[Liu et al., Cell, 2011]

MADMマウスの脳腫瘍を解析したところ、同じ個体内においても病理組織像の異なる脳腫瘍が形成されているのが認められた。脳基底核部に生じた腫瘍(図2: Lesion1)は、腫瘍内の細胞密度が高く、境界が比較的明瞭な nodular type の腫瘍を形成するのに対し、脳皮質下に生じた腫瘍(図2: Lesion2)は、腫瘍内の細胞密度が粗であり、境界も比較的不明瞭な diffuse type の腫瘍を形成するのが確認された。また、MADMマウスの脳腫瘍から GFP 陽性の脳腫瘍細胞を分離し、神経幹細胞培地を用いて初代細胞をニューロスフェア法で培養することで MADM腫瘍幹細胞を樹立した。樹立した腫瘍幹細胞をそれぞれ基底膜マトリックス中で培養すると、上皮系細胞のように敷石状の形態で増殖する solid type の腫瘍幹細胞と、マトリックスを溶かしながらびまん性に増殖する disseminated type の腫瘍幹細胞が存在することが確認された(図3)。それぞれ、nodular type の脳腫瘍は solid type の腫瘍幹細胞、diffuse type の脳腫瘍は disseminated type の腫瘍幹細胞と示唆された。以上、in vivo 解析と in vitro 解析により、*p53/NF1* double knockout という同一の遺伝子変異のバックグラウンドを持ちながらも、MADMマウスでは少なくとも2種類以上の脳腫瘍サブタイプが存在することが明らかになった。

本研究は、同一の遺伝子変異のバックグラウンドを持つマウスにおいてもサブタイプの異なる脳腫瘍及び脳腫瘍幹細胞が得られたこれまでの研究結果を基

図2: MADMマウス脳腫瘍

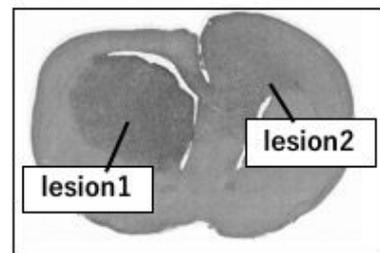
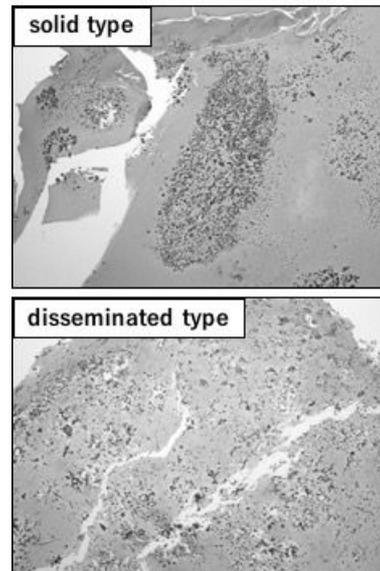


図3: MADMマウス細胞株



盤とし、GBM が悪性化進展の過程でサブタイプの違いを生じて不均一性を獲得する機序を解明し、また、それぞれのサブタイプをターゲットとした新たなアプローチによる治療戦略の開発を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現解析によるサブタイプを規定する因子の同定

MADM マウスの脳腫瘍及び腫瘍幹細胞の solid type, disseminated type それぞれから RNA を抽出し、RNA-seq 法による全トランスクリプトーム解析を行い、サブタイプの違いによる特徴的な遺伝子発現プロファイルを明らかにする。

(2) サブタイプ毎に治療効果を有する作用機序の解明と臨床応用性の検討

ADM マウスの脳腫瘍及び腫瘍幹細胞の solid type では EGFR による細胞増殖シグナルに依存しているため EGFR 阻害薬が有用であり、disseminated type では calcitriol による増殖抑制が顕著であった。そのため、それぞれの腫瘍幹細胞と候補薬剤を用いて、それぞれの薬剤の作用機序を探索し、更に脳移植モデルを用いて、in vivo での効果判定を行なった。

4. 研究成果

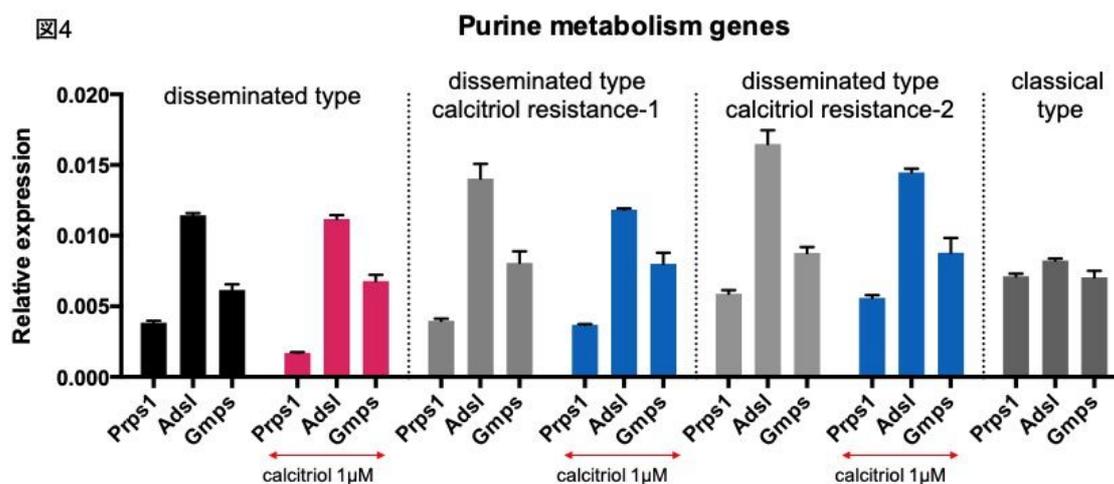
(1) サブタイプを規定する因子について

GeneSpring で各サブタイプ間の発現変動している遺伝子群を同定し、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) でパスウェイ解析を行う予定であったが、解析の結果、それぞれのサブタイプを規定するような特徴的な遺伝子群は同定出来なかった。

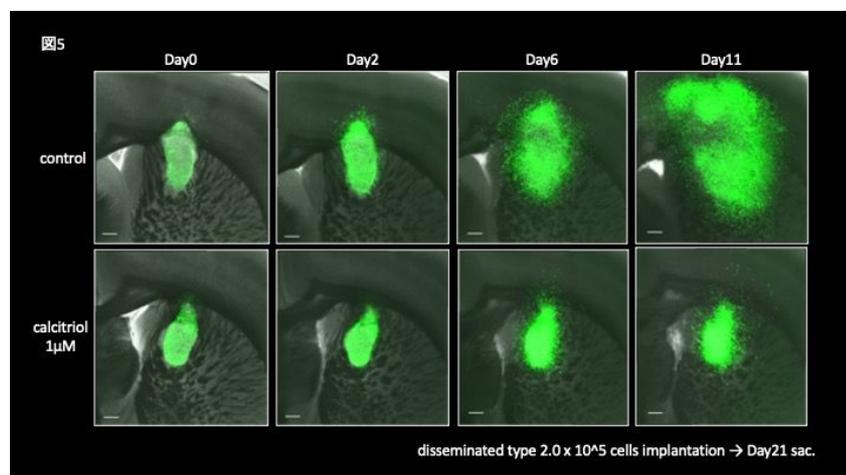
(2) 特異的薬剤の作用機序の解明と臨床応用性について

solid type (classical type) の腫瘍幹細胞に対しては EGFR 阻害薬、disseminated type (proneural type) には calcitriol を用いて、コントロール群と薬剤投与群で薬剤投与による遺伝子発現の変化を RNA-seq 法で解析した。その結果、solid type では EGFR 阻害薬によって、EGFR 下流の各種増殖因子の阻害効果によって細胞増殖抑制が認められ、disseminated type では calcitriol によってプリン体合成経路の阻害によって細胞増殖抑制が引き起こされることが明らかになった。特に、プリン体合成経路の酵素遺伝子群の内、PRPS1 の抑制効果によるもの可能性が示唆された (図4)。

図4



また、脳移植実験系において、solid type の腫瘍幹細胞は EGFR 阻害薬によって腫瘍増殖が抑制され、disseminated type の腫瘍幹細胞は calcitriol によって腫瘍増殖が抑制される事が明らかになった (図5)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------