

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10858

研究課題名(和文) Notchシグナルの核内転写因子RBP-Jk抑制によるグリオーマ幹細胞の制御

研究課題名(英文) The regulation of glioma stem cell by the transcription factor "RBPJ" suppression in Notch signal

研究代表者

田中 慎吾 (TANAKA, SHINGO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40507084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は原発性悪性脳腫瘍であり予後不良な難治性の疾患である。本研究は膠芽腫幹細胞に対する標的治療研究である。我々はNotchシグナルの活性指標となる核内転写因子RBPJに着目した。膠芽腫組織ではRBPJの発現が正常脳より高いこと、膠芽腫幹細胞は分化型膠芽腫細胞よりもRBPJの発現が高いことを確認した。膠芽腫幹細胞のRBPJ抑制により細胞増殖低下、幹細胞形質喪失を認めた。メカニズムとしてRBPJの阻害により下流因子のインターロイキン6とSTATシグナルの抑制が誘導されたこと突き止めた。動物実験においても腫瘍の縮小を認めた。膠芽腫幹細胞制御にはRBPJの阻害が有効であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Notchシグナルは様々な癌腫において幹細胞性の維持や細胞増殖などの機能を有するとされている。膠芽腫幹細胞においても同様であり、本研究ではNotchシグナルの活性に重要な核内転写因子RBPJが膠芽腫幹細胞で高発現していることを確認した。膠芽腫幹細胞のRBPJを抑制することにより腫瘍細胞の増殖遅延や幹細胞性維持機能の低下が認められた。従って、膠芽腫幹細胞制御にRBPJが重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is a primary malignant brain tumor and is an intractable disease with a poor prognosis. This study is a targeted therapeutic study against glioblastoma stem cells. We focused on the nuclear transcription factor RBPJ, which is an active indicator of Notch signaling. RBPJ expression was higher in glioblastoma tissue than in normal brain, and glioblastoma stem cells had higher RBPJ expression than differentiated glioblastoma cells. RBPJ inhibition of glioblastoma stem cells results in decreased cell proliferation and loss of stem cell phenotype. As a mechanism, we found that inhibition of RBPJ induced inhibition of the downstream factors interleukin 6 and STAT signal. Tumor reduction was also checked in animal studies. It suggested that inhibition of RBPJ is effective for the regulation of glioblastoma stem cells.

研究分野：脳神経外科

キーワード：RBPJ Notchシグナル グリオーマ幹細胞 STATシグナル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 (GBM) は脳腫瘍の中で最も悪性かつ制御困難な腫瘍である。腫瘍摘出術に加え放射線化学療法を施行しても生存期間は 2 年未満の症例が多い。昨今の医療進歩による他臓器癌治療成績の改善を鑑みると、過去 30 年間にわたり治療成績がほぼ不変である膠芽腫に対して新たな治療法の確立は最重要課題である。膠芽腫は正常脳組織へ浸潤して増大していく特徴があるため他臓器固形癌と異なり外科的完全切除は不可能である。そのため外科的切除後の残存腫瘍制御に対し新たな化学療法の確立が必須である。

近年のがん基礎研究では腫瘍の起源となる癌幹細胞の存在が提唱されており、脳腫瘍においてもグリオーマ幹細胞がいち早く同定され(*Nature* 2006)、研究領域が急速に拡大している。Notch シグナルとは、細胞間同士のシグナル伝達経路である。細胞膜上の Notch 受容体へ伝達されたシグナルを核内へ伝達するためには  $\gamma$ -secretase により Notch 受容体の細胞内ドメインの一部(Notch intracellular domain=NICD) を切り離す必要がある。さらに切り離された NICD は核内へ移行し核内タンパクの RBPJ (Recombination signal-binding protein Jk) と結合し下流へシグナル伝達を行う。Notch 下流シグナルには細胞の生存、増殖、cell cycle 等に関与する PI3K/AKT 経路、MAPK/ERK 経路、JAK/STAT 経路を含め他の様々なシグナル経路が関連しているとされる。グリオーマ幹細胞においては腫瘍幹細胞の形質維持、腫瘍形成能、細胞増殖、アポトーシス制御とされている。RBPJ とは Notch シグナルを活性化させる重要な転写因子である。 $\gamma$ -secretase 阻害剤よりも RBPJ 制御が癌幹細胞の腫瘍形成能を強力に抑制できることが報告され、注目されている (*J Exp Med* 2015, *Tumour Biol* 2015)。グリオーマに関しては、RBPJ を抑制することで幹細胞形質の維持抑制、細胞増殖抑制の報告 (*J Clin Invest*, 2016) があるのみで今後更なる解析が期待されている。

### 2. 研究の目的

患者由来グリオーマ幹細胞株に対し shRNA による RBPJ の発現抑制の有効性を評価し膠芽腫に対する新たな分子標的療法の基礎基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

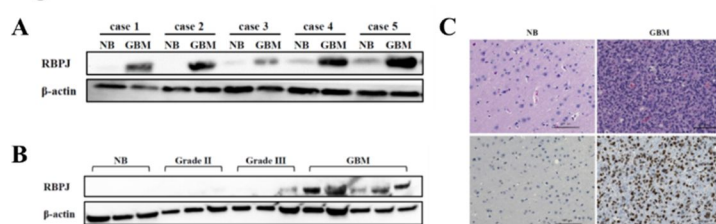
GBM 組織および GBM 幹細胞における RBPJ 発現を確認する。GBM 患者由来のグリオーマ幹細胞株を用いて、Notch シグナルの核内転写因子である RBPJ を shRNA で抑制し Notch 下流シグナルの変化、細胞増殖抑制効果、幹細胞形質維持抑制効果、未分化および分化マーカーの変化を *in vitro* で確認する。*In vitro* で得られた結果を検証するために RBPJ shRNA が導入されたグリオーマ幹細胞の xenograft を行い *in vivo* の結果が *in vitro* の結果を反映しているかどうかを検証する。

### 4. 研究成果

膠芽腫組織の RBPJ 発現レベルの解析と膠芽腫幹細胞に対する RBPJ 発現抑制の解析を行うことにより下記を明らかにした。

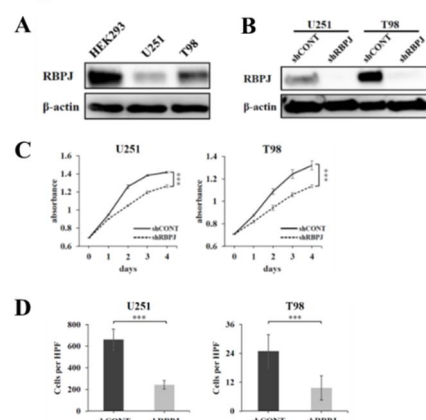
- (1) GBM 組織の RBPJ は蛋白レベルおよび免疫組織染色で正常脳より明らかに高発現を認めた (Figure 1A, 1C)。また、グリオーマの悪性度との比較では GBM (グレード 4) で RBPJ が高発現を呈した (Figure 1B)。

Figure 1



- (2) GBM の細胞株 (U251, T98) を用いて RBPJ の蛋白発現レベルを確認した (Figure 2A)。shRNA を用いて RBPJ の発現を低下させた結果 (Figure 2B) 細胞増殖能低下と細胞浸潤能低下が認められた (Figure 2C, 2D)。  
(\* ) HEK293 は RBPJ のポジティブコントロール

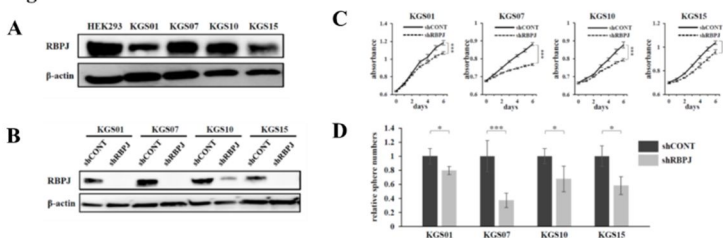
Figure 2



- (3) GBM 幹細胞 (KGS01, KGS07, KGS10, KGS15) の RBPJ の発現は分化型 GBM 細胞よりも高発現を呈した (Figure 3A)。RBPJ を shRNA でノックダウンすること (Figure 3B) により細胞増殖の抑制

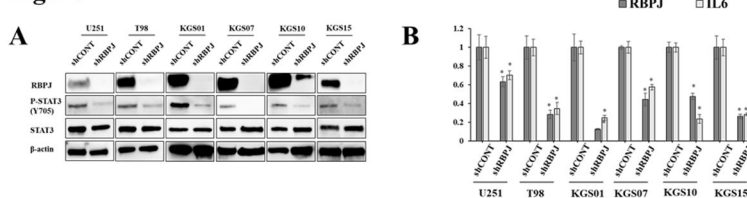
および幹細胞形質維持の抑制を認めた (Figure 3C, 3D)。

Figure 3



(4) GBM の増殖にかかわり Notch シグナルの下流シグナルである STAT3 シグナルの変化をウエスタンブロッティングで確認した。使用した全ての GBM 細胞株及び GBM 幹細胞において RBPJ 抑制によって STAT3 の蛋白発現レベルは不変であったがリン酸化 STAT3 の蛋白発現低下が認められた (Figure 4A)。

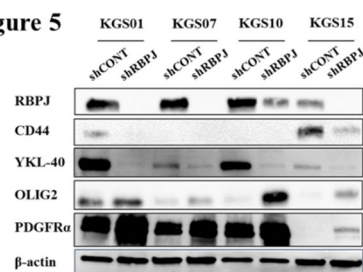
Figure 4



また、STAT3 上流シグナルであるインターロイキン  $\alpha$  (IL-6) の mRNA 発現レベルの低下が認められた (Figure 4B)。

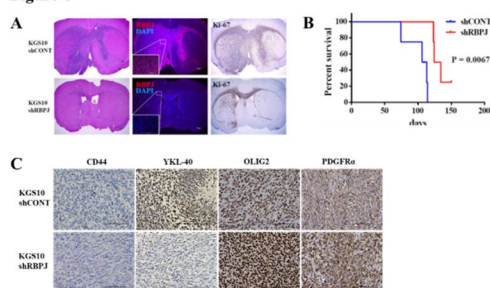
(5) RBPJ 抑制による幹細胞表面マーカーの変化をウエスタンブロッティングで評価した。RBPJ 抑制は Mesenchymal マーカーである YKL-40 の発現低下、Proneural マーカーである OLIG2, PDGFR は発現増加を誘導した。これより RBPJ は GBM の Proneural, Mesenchymal, classical, neural タイプの発現マーカーに関わっている可能性が示唆された (Figure 5)。

Figure 5



(6) RBPJ 抑制 GBM 幹細胞をヌードマウスの脳へ移植したところコントロールと比較して腫瘍増大速度の低下が認められ、生存期間も延長した (Figure 6A, 6B)。

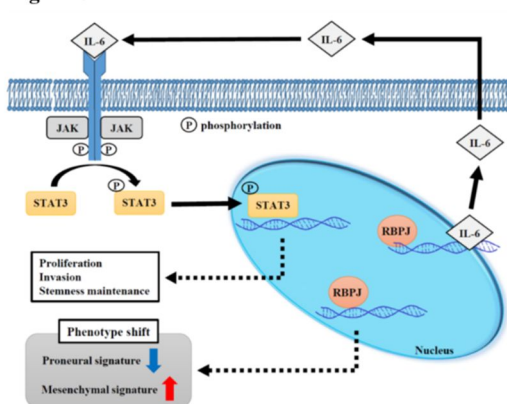
Figure 6



それぞれの免疫組織染色では、RBPJ 抑制 GBM 幹細胞によって発生した腫瘍はコントロールより YKL-40 の発現低下と OLIG2, PDGFR の発現増加を認めた (Figure 6C)。

以上の研究結果から、RBPJ は膠芽腫組織だけでなく、それを形成する膠芽腫幹細胞に高発現が認められた。RBPJ の抑制により細胞増殖機能の低下、幹細胞形質維持の抑制が認められた。このメカニズムとして IL-6-STAT3 のシグナルが関与していることが考えられた。また RBPJ 抑制によって誘導された GBM の幹細胞表面マーカーの変化から RBPJ は GBM 幹細胞の phenotype shift に関与していることが考えられた。in vitro の結果が、in vivo 結果にも反映されたことから RBPJ が幹細胞標的治療の候補となりうると示唆された (Figure 7)。

Figure 7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>田中 慎吾、東馬 康郎、吉川 陽文、木多 真也                            | 4. 巻<br>40              |
| 2. 論文標題<br>頸動脈ステント留置 1 カ月後に症候性ステント内狭窄を認めた 放射線誘発性内頸動脈狭窄症の 1 例 | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>脳卒中  | 6. 最初と最後の頁<br>362 - 366 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3995/jstroke.10555            | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                       | 国際共著<br>-               |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Shabierjiang Jiapaer, Takuya Furuta, Shingo Tanaka, Tomohiro Kitabayashi, Mitsutoshi Nakada | 4. 巻<br>58            |
| 2. 論文標題<br>Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma               | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Neurol Med Chir (Tokyo)   | 6. 最初と最後の頁<br>405-421 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2176/nmc.ra.2018-0141  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shingo Tanaka, Katsuyoshi Miyashita, Sho Tamai, Masashi Kinoshita, Mitsutoshi Nakada             |
| 2. 発表標題<br>Predictive factors for adhesion of supratentorial meningioma to surrounding brain with MR images |
| 3. 学会等名<br>The 16th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology (国際学会)                                  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中 慎吾、宮下 勝吉、玉井 翔、木下 雅史、中田 光俊 |
| 2. 発表標題<br>テント上髄膜腫と周囲脳の癒着を予測するMRI画像の特徴  |
| 3. 学会等名<br>第78回日本脳神経外科学会総会              |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中慎吾、坂東寛紀、張光濤、渡辺哲陽、米山猛、中田光俊                          |
| 2. 発表標題<br>膠芽腫幹細胞と分化細胞に対する診断・治療一体型共焦レーザー顕微鏡を用いた5-ALA光線力学治療の基礎実験 |
| 3. 学会等名<br>第15回日本脳神経外科光線力学学会                                    |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中 慎吾, 木下 雅史, 中田 光俊                     |
| 2. 発表標題<br>後頭蓋窩病変に対する顕微鏡手術と4K3D外視鏡手術の術者姿勢と術野 照度の比較 |
| 3. 学会等名<br>第31回日本頭蓋底外科学会                           |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中慎吾、宮下勝吉、中田光俊                |
| 2. 発表標題<br>嚢胞性聴神経腫瘍に対する嚢胞内顔面神経持続モニタリング支援 |
| 3. 学会等名<br>第28回日本聴神経腫瘍研究会                |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>田中慎吾、鳥越恵一朗、筒井泰史、木下雅史、中田光俊 |
| 2. 発表標題<br>振戦で発症した若年蝶形骨縁髄膜腫の一例       |
| 3. 学会等名<br>第96回 日本脳神経外科学会 中部支部会      |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

|                                |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名<br>田中慎吾、宮下勝吉、木下雅史、中田光俊 |
| 2. 発表標題<br>小児テント上腫瘍の1例         |
| 3. 学会等名<br>第55回北陸脳腫瘍懇話会        |
| 4. 発表年<br>2018年                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中慎吾、宮下勝吉、木下雅史、見崎 孝一、笹川泰生、内山尚之、林 康彦、 中田光俊 |
| 2. 発表標題<br>段階的治療を施行した充実性小脳虫部頭側血管芽腫の1例                |
| 3. 学会等名<br>第95回日本脳神経外科学会中部支部会                        |
| 4. 発表年<br>2018年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中慎吾、宮下勝吉、中田光俊                     |
| 2. 発表標題<br>充実性小脳虫部血管芽腫に対する3Dシミュレーション画像の有用性の検討 |
| 3. 学会等名<br>第23回日本脳腫瘍の外科学会                     |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>田中慎吾、宮下勝吉、玉井 翔、木下雅史、中田光俊  |
| 2. 発表標題<br>膠芽腫RPA分類クラス5における予後良好因子の検討 |
| 3. 学会等名<br>第77回脳神経外科学会学術総会           |
| 4. 発表年<br>2018年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shingo Tanaka, Masashi kinoshita M, Katsuyoshi Miyashita K, Mitsutoshi Nakada |
| 2. 発表標題<br>Analysis of prognostic factors in glioblastoma RPA class and                  |
| 3. 学会等名<br>The 15th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology, (国際学会)              |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中慎吾, 中田光俊                                 |
| 2. 発表標題<br>Notchシグナル活性化促進転写因子RBPJkの抑制による膠芽腫幹細胞悪性形質の制御 |
| 3. 学会等名<br>第36回日本脳腫瘍学会学術集会                            |
| 4. 発表年<br>2018年                                       |

〔図書〕 計1件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>田中慎吾、中田光俊                          | 4. 発行年<br>2018年 |
| 2. 出版社<br>中外医学社                              | 5. 総ページ数<br>120 |
| 3. 書名<br>Clinical Neuroscience 脳腫瘍のゲノムとエピゲノム |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|