

氏 名 (生年月日) ^{もやま} ^{ち あ み}
茂山 千愛美 (1994 年 11 月 5 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 薬 第 228 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 18 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 **Stat5b 阻害によるマウスモデル由来膠芽腫幹細胞の増殖抑制機構の解明**

論 文 審 査 委 員 (主査) 准教授 中 田 晋
(副査) 教 授 加 藤 伸 一
(副査) 教 授 高 田 和 幸

論 文 内 容 の 要 旨

序章 (はじめに)

膠芽腫は、成人発症の悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高い組織型であり、外科的切除、放射線療法、薬物治療による集学的治療が行われるが、術後再発率が高く極めて予後不良である。膠芽腫の高い再発率の要因として、周囲の正常組織への高い浸潤能と薬物治療や放射線治療に対する耐性の獲得が挙げられる。近年、がんにおける薬物治療や放射線治療に対する耐性獲得の機構として、がん幹細胞の存在が指摘されている。膠芽腫においても膠芽腫幹細胞の存在が、治療抵抗性に寄与することが報告されている。したがって、この膠芽腫幹細胞を阻害するために有用な新規治療戦略の確立が求められている。本研究では、膠芽腫組織中での発現レベルと患者の不良な予後に相関が認められた Wnt 関連幹細胞マーカー遺伝子 **Lgr5** の下流遺伝子として同定された **Stat5b** に着目し、ヒト膠芽腫組織およびマウス由来膠芽腫幹細胞モデルにおける **Stat5b** の発現制御機構の解明および機能的役割の解明を目的とした。

第 1 章 低酸素応答シグナルおよび Wnt/ β -Catenin 経路による **Stat5b** の発現制御機構

本章では、ヒト膠芽腫組織およびマウス膠芽腫組織における **Stat5b** の発現様式を解析するために免疫組織化学染色を実施し、**Hif2 α** で標識される低酸素領域に **Stat5b** および **Lgr5** が陽性となる細胞集団が存在することを明らかにした。さらに、マウスモデル由来膠芽腫幹細胞の低酸素条件下での培養により、**Stat5b** mRNA 発現量の増加とリン酸化型 **Stat5** および **Stat5b** タンパク質発現量が増加することを明らかにした。さらに、膠芽腫組織において **Hif2 α** 陽性領域と一致して **Stat5b** の発現が認められたことから、**Hif2 α** が **Stat5b** の発現を制御している可能性を考え、**Hif2 α** を RNA 干渉法でノックダウンした結果、**Stat5b** の発現が抑制されることを明らかにした。また、低酸素応答シグナルによる **Lgr5** の発現制御についても解析するために、低酸素条件下で培養した膠芽腫幹細胞における **Lgr5** mRNA 発現レベルおよび細胞表面の **Lgr5** タンパク質発現量を解析したところ、**Lgr5** 発現レベルが低酸素刺激により増加することをみいだした。膠芽腫幹細胞をウシ胎児血清により分化誘導し樹立した膠芽腫細胞においても、低酸素刺激による **Stat5b** および **Lgr5** の発現増加を明らかにした。さらに、Wnt/ β -Catenin 経路による **Stat5b** 発現制御について解析した結果、**Lgr5** ノックダウンにより **Stat5b** と Wnt/ β -Catenin

経路の重要な転写調節因子である β -Catenin のタンパク質発現がともに抑制されることを明らかにした。また、Wnt/ β -Catenin 経路の阻害薬である ICG-001 の処理により、細胞増殖抑制効果と DNA 合成期細胞の減少およびアポトーシスの一部誘導が認められた。また、ICG-001 は Oct4 や Survivin などの確立された Wnt/ β -Catenin 経路の標的遺伝子とともに Stat5b の発現を抑制した。これらの知見により、膠芽腫幹細胞において Lgr5 および Stat5b はともに低酸素応答シグナルにより発現制御されており、Stat5b は Wnt/ β -Catenin 経路にもその発現が制御されることが示唆された。

第2章 Stat5b 阻害による膠芽腫幹細胞の増殖抑制機構

本章では、Stat5b の膠芽腫幹細胞を標的とした新規治療標的分子としての有用性を検証するために、膠芽腫幹細胞で遺伝子ノックダウンまたは阻害剤により Stat5b の機能を阻害した際の表現型を解析した。まず、膠芽腫幹細胞において Stat5b のノックダウンにより、細胞増殖が抑制されアポトーシスが誘導されることをみいだした。また、マイクロアレイ解析により Stat5b ノックダウンに伴い発現が抑制される遺伝子として Cyclin E2 を同定し、実際に膠芽腫幹細胞において Stat5b ノックダウンにより Cyclin E2 およびリン酸化 Rb の発現抑制と DNA 合成期細胞が減少することを確認した。さらに、Stat5b 阻害剤である IQDMA 処理により、細胞増殖が有意に抑制され ($IC_{50}=1.02\pm0.31\ \mu M$)、DNA 合成期の細胞割合が減少した。また、Annexin V/PI 染色による早期アポトーシスの誘導とウェスタンブロット解析により、IQDMA 処理によるアポトーシスの指標となる PARP と Caspase 3 の切断が確認された。これらの結果は Stat5b ノックダウンで得られた結果と合致しており、膠芽腫幹細胞に対する Stat5b 阻害が細胞増殖の抑制とアポトーシスを誘導するという結果を裏付けていると考えられる。また、アストロサイトに IQDMA を作用させ Caspase 3/7 活性を評価したところ、膠芽腫幹細胞に細胞毒性を示す濃度 ($1\ \mu M$) において、Caspase 3/7 活性の上昇は確認されなかった。さらに、膠芽腫幹細胞をマウス大脳に移植し作製したマウス膠芽腫移植モデルに対する IQDMA の全身投与により、さらなる体重減少を引き起こすことなく腫瘍の成長が抑制され、生存期間の延長を認めた ($p=0.006$)。さらに、Stat5b をノックダウンした膠芽腫幹細胞をマウス大脳に移植した結果、コントロールに比べ腫瘍の成長が有意に抑制され、生存期間が延長した ($p=0.013$)。したがって、Stat5b の阻害は膠芽腫幹細胞の増殖抑制とアポトーシスの誘導を引き起こし、生体内においても腫瘍の進展を有意に抑制することが示唆された。

総括（結論）

本研究により Stat5b は膠芽腫幹細胞の生存および増殖を調節する重要な機能を担っていることを明らかにした。膠芽腫幹細胞における Stat5b の発現は、低酸素応答シグナルおよび Wnt/ β -Catenin 経路により促進されることを発見した。膠芽腫幹細胞における Stat5b 機能の阻害は、増殖抑制とアポトーシスを誘導することを明らかにし、また Stat5b の下流で細胞周期の進行と細胞増殖を促進する Cyclin E2 が減少することを発見した。また、マウス膠芽腫モデルにおいて、RNA 干渉法および阻害剤による Stat5b の阻害は、重篤な副作用を示すことなく腫瘍の成長を抑制し、生存期間の延長を示した。以上の知見は、Stat5b は膠芽腫幹細胞を標的とした新規治療標的分子として有望であることを示しており、膠芽腫の新規治療戦略の開発に寄与するものと考えられる。

審査の結果の要旨

《緒言》

膠芽腫は、成人発症の悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高い組織型であり、外科的切除、放射線療法、薬物治療による集学的治療が行われるが、術後再発率が高く極めて予後不良である。近年、がんにおける薬物治療や放射線治療に対する耐性獲得の機構として、がん幹細胞の存在が指摘されており、膠芽腫においても膠芽腫幹細胞の存在が、治療抵抗性に寄与することが報告されている。したがって、この膠芽腫幹細胞を阻害するために有用な新規治療戦略の確立が求められている。本研究では、膠芽腫組織中での発現レベルと患者の不良な予後に相関が認められた Wnt 関連遺伝子 *Lgr5* の下流遺伝子として同定された *Stat5b* に着目し、マウスモデル由来膠芽腫幹細胞における *Stat5b* の発現制御機構の解明および治療標的分子としての有効性について検証することを目的とした。

《審査結果の要旨》

(1) 低酸素応答シグナルおよび Wnt/ β -Catenin 経路による *Stat5b* の発現制御機構

ヒトおよびマウス膠芽腫組織中で *Stat5b* を発現する細胞は、*Hif2 α* で標識される低酸素領域において、幹細胞マーカータンパク質 *Lgr5* を発現する領域に存在することをみいだした。マウスモデル由来膠芽腫幹細胞において、*Stat5b* 発現が低酸素刺激で誘導されることを示した。また、幹細胞マーカー *Lgr5* の発現が、mRNA およびタンパク質レベルのいずれにおいても低酸素刺激により誘導されることを発見した。さらに、*Lgr5* ノックダウンおよび Wnt/ β -Catenin 経路の阻害剤を用いた実験により、*Stat5b* の発現が Wnt 経路によって制御されることを明らかにした。

(2) *Stat5b* 阻害による膠芽腫幹細胞の増殖抑制機構

膠芽腫幹細胞において、*Stat5b* のノックダウンおよび *Stat5* 阻害剤 IQDMA の作用により、その増殖が抑制されアポトーシスが誘導されることを明らかにした。また、*Stat5b* の機能阻害による増殖抑制機構には、*Cyclin E2* の発現低下を伴う細胞周期進行の阻害が関与することを明らかにした。マウス膠芽腫モデルに対する IQDMA の投与および、*Stat5b* ノックダウンは、膠芽腫幹細胞の生体内腫瘍形成能を抑制し、生存期間を有意に延長することを明らかにした。

《結論》

本研究により、低酸素環境で維持される膠芽腫幹細胞において、*Stat5b* の発現は低酸素応答シグナルおよび Wnt/ β -Catenin 経路下流で促進的に制御され、細胞生存や増殖に重要な機能を担うことが示された。また、*Stat5b* のノックダウンおよび阻害剤による *Stat5b* の機能阻害は、膠芽腫幹細胞の生存および増殖を抑制し、マウス膠芽腫モデルに対する *Stat5* 阻害剤投与および生体内 *Stat5b* ノックダウンにより、膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能の抑制と生存期間の有意な延長をもたらしたことから、*Stat5b* は膠芽腫幹細胞を阻害するための新規治療標的として有用である可能性が示された。したがって、本研究の成果は、膠芽腫幹細胞における *Stat5b* の発現制御機構の一端を明らかにし、*Stat5b* を標的とした膠芽腫に対する新規治療戦略の可能性を示し、その創出に寄与するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。